

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 007 685**

51 Int. Cl.:

A23C 9/154 (2006.01)
A23C 9/156 (2006.01)
A23G 1/56 (2006.01)
A23G 3/34 (2006.01)
A23J 1/20 (2006.01)
A23J 3/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2017** **PCT/EP2017/083353**
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2018** **WO18114826**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2017** **E 17835654 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024** **EP 3554250**

54 Título: **Un método para producir un concentrado lácteo con agregación de proteínas de cationes divalentes libres**

30 Prioridad:

19.12.2016 EP 16205142

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2025

73 Titular/es:

SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.00%)
Entre-deux-Villes
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

SCHMITT, CHRISTOPHE, JOSEPH, ETIENNE;
BOVETTO, LIONEL, JEAN, RENÉ;
SYRBE, AXEL;
KREUSS, MARKUS;
VAGHELA, MADANSINH, NATHUSINH y
KOŁODZIEJCZYK, ERIC, STANISŁAS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 3 007 685 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un método para producir un concentrado lácteo con agregación de proteínas de cationes divalentes libres

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir un concentrado lácteo como se define en la reivindicación 1.

10 Antecedentes

Se sabe que la adición de proteínas proporciona textura y sensación en boca a los alimentos y bebidas y sigue existiendo la necesidad de alimentos y bebidas que presenten un equilibrio nutricional de macronutrientes y que al mismo tiempo aporten gran sabor y textura.

15 La cremosidad y sensación en boca, así como la reducción de la grasa, son factores fundamentales del gusto en el caso de los productos lácteos, tales como la nata y los productos derivados de esta. En la actualidad, existe el reto de aumentar la sensación en boca/cremosidad de las natas actuales, en particular, para lograr este aumento de la sensación en boca/cremosidad utilizando formulaciones completamente naturales o, idealmente, actuando en la propia matriz del producto, en lugar de añadir ingredientes al producto. Esto es particularmente cierto en los productos con bajo contenido en grasa o sin ella.

25 En el documento CN104489097A se describe un proceso para obtener preparaciones protectoras de secado por termoconvección de bacterias lácticas o probióticas, que consiste en tratar térmicamente a 60 °C una preparación láctea enriquecida con calcio para inducir la agregación de proteínas, y posteriormente someter la preparación a un tratamiento de homogeneización mecánica. Esta solicitud de patente no se refiere a concentrados lácteos. En el documento WO07040113A se describe la producción de un ingrediente que presenta alto contenido en lípidos complejos derivados de la leche. Este se obtiene al precipitar las fracciones de proteína de suero de mantequilla a un pH de 4,0 - 5,0 en presencia de calcio y filtrar el sobrenadante para concentrar los lípidos complejos.

30 En el documento WO 06065135 A2 se desvela la producción de un producto alimenticio líquido rico en cationes divalentes libres en el que el 20 % de los restos de lisina transportados por las proteínas se glucosilan para aumentar su resistencia a la agregación en presencia de calcio. Por lo tanto, el documento WO 06065135 A2 se refiere a impedir la agregación de proteínas en presencia de cationes divalentes, calcio entre otros.

35 En el documento US20130011515 A1 se describe un proceso para la producción de un concentrado de proteína láctea que se enriquece con proteínas de suero de leche. La leche desnatada se calienta en el intervalo de pH 6,5-7,0 a fin de promover la agregación de proteínas de suero de leche junto con las caseínas. Posteriormente, el producto calentado se somete a filtración para concentrar agregados de proteína y eliminar la lactosa.

40 D. L. Van Hekken et al., [Rheology and Microstructure of Chemically Superphosphorylated Whole Casein, 1997, J. Dairy Sci. 80 2740-2750] describen el efecto de la adición de calcio libre sobre la viscosidad de caseínas superfosforiladas. Se demostró que la viscosidad de un 4 % en peso de caseínas superfosforiladas (190 % de fosforilación) aumentó por la adición de 30 mM de calcio con un pH de 8,4. Este estudio no se refiere a concentrados lácteos. Además, para los concentrados lácteos, las caseínas superfosforiladas no son tan relevantes como ingrediente químicamente modificado y costoso.

45 C. Holt, en su artículo [An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk, 2004, Eur. J. Phys., 33, 421-434] describió que la cantidad de iones libres de calcio en la leche bovina con un pH de 6,70 era de 10,2 mM y que este valor disminuía a 8 mM cuando el pH de la leche disminuía a 6,0.

50 I.R. McKinnon et al. [Diffusing-wave spectroscopy investigation of heated reconstituted skim milks containing calcium chloride, 2009, Food Hydrocolloids, 1127-1133] investigaron el efecto de la adición de cloruro de calcio a la leche desnatada reconstituida al 10 % en peso en el intervalo de pH 6,0 - 7,2 y el posterior efecto sobre la viscosidad cuando la leche se calentaba durante 10 minutos a 60, 75 y 90 °C. Estos autores informaron que al calentar la leche a 90 °C se observaba un pH inestablemente crítico de 5,9 para un contenido de cloruro de calcio de hasta 10 mM.

55 L. Ramasubramanian et al. [The rheological properties of calcium-induced milk gels, 2014, J. Food Engineering, 45-51] determinaron el impacto de la adición de cloruro de calcio en la leche entera (3,5 % de grasa) después del calentamiento a 70 °C. Se informó que la adición de cloruro de calcio por debajo de 12,5 mM condujo a dispersiones viscosas mientras que las concentraciones más altas de cloruro de calcio indujeron la formación de geles más fuertes. De manera interesante, el pretratamiento de la leche a 90 °C durante 10 minutos antes de la adición de cloruro de calcio y el posterior calentamiento a 70 °C condujo a la formación de geles más fuertes. La formación de gel no es deseable en muchos productos alimenticios y de bebida semisólidos.

65

T. Phan Xuan et al. [Tuning the structure of protein particles and gels with calcium or sodium ions. 2013, Biomacromolecules, 14, 6, 1980-1989] notificaron que el tratamiento de la proteína de suero de leche al 100 % (beta-lactoglobulina) con una adición de cloruro de calcio a un pH de 7,0 condujo a la formación de microgeles o gel, al calentarse a 68 u 85 °C cuando el contenido de calcio era de 5-6 mM para una concentración de proteína del 4 % en peso. Nuevamente, la formación de gel no es deseable en muchos productos alimenticios y de bebida semisólidos.

En el documento WO2016/102503 se desvela la producción de bebidas RTD (*ready to drink*, listas para tomar) a base de leche. El componente lácteo comprende caseína y proteínas de suero de leche. Las proteínas lácteas se añaden parcialmente en presencia de hidrocoloides como sistema estabilizador y pueden añadirse sales de calcio queladas para enriquecer los productos.

El documento WO2016/174651 se refiere a una composición nutricional líquida termotratada que comprende de 8 a 20 g de proteína por 100 ml de la composición, en donde al menos el 40 % en peso de la proteína es caseína micelar y al menos el 10 % en peso de la proteína es proteína de suero de leche hidrolizada.

El documento WO2016/102500 se refiere a un concentrado lácteo que comprende caseínas y proteínas de suero de leche en una proporción de 90:10 a 60:40, en donde los agregados de caseína/proteína de suero de leche tienen un valor de diámetro medio basado en el volumen Dv50 de al menos 1 µm medido por difracción láser.

El documento WO2012/017043 se refiere a un producto de bebida que comprende un sistema proteico parcialmente desnaturalizado que incluye kappa-caseína y beta-lactoglobulina, en donde dicho producto tiene un pH comprendido entre 5,6 y 6,3.

Las enseñanzas de la técnica anterior muestran que, aunque puede obtenerse viscosidad con la adición de calcio, la gelificación es un efecto muy conocido que puede ser indeseable en la producción de alimentos.

Además, el pH del producto puede variar e influir en el proceso y puede conducir a la inestabilidad del producto. La técnica anterior no muestra cómo proporcionar productos alimenticios y de bebida que ofrezcan sabor y textura deseables.

Por tanto, se necesitan productos alimenticios y de bebida que presenten un equilibrio nutricional de macronutrientes y, al mismo tiempo, aporten un gran sabor, textura y estabilidad en anaquel.

Objetivo de la invención

Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un concentrado lácteo con textura y sensación en boca mejoradas y un método para elaborarlo de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona la mejora mediante el uso de agregados basados en proteínas lácteas por tratamiento termoespecífico en presencia de una concentración específica de cationes divalentes añadidos. Se descubrió, sorprendentemente, que existe un intervalo crítico de adición de cationes divalentes que conduce a la adición óptima de proteínas sin precipitación o gelificación de los agregados formados después del calentamiento.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir un concentrado lácteo, que comprende las etapas de:

proporcionar una composición de ingredientes que comprende caseínas micelares y proteínas de suero de leche y que tiene un pH de 6,1 - 7,1 y una concentración de 3 - 25 % en peso de proteínas, y en donde la composición de ingredientes tiene una relación entre caseína y proteína de suero de leche de 90/10 - 60/40, añadir 3 - 25 mM de cationes divalentes para proporcionar una concentración de 3 - 8 mM de cationes divalentes libres en la composición de ingredientes; homogeneizar la composición de ingredientes; y posteriormente pasteurizar y agitar la composición de ingredientes a una temperatura de 80 ° - 105 °C durante un período de 0,5 - 3 min para formar proteínas aglomeradas que comprenden caseínas y beta-lactoglobulina a partir de las proteínas de suero de leche, teniendo los aglomerados un tamaño de 3 - 50 micrómetros medido por diámetro medio $D_{(4,3)}$, y en donde la composición de ingredientes es un concentrado que comprende 6 - 55 % en peso de sólidos lácteos, y en donde los cationes divalentes son Ca.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los tubos de vidrio después del tratamiento térmico de 3,5 % en peso de leche a 90 °C durante 15 minutos después de la adición de cloruro de calcio. Las etiquetas en los tubos representan la cantidad de calcio libre en mM añadida en la muestra. La concentración crítica de calcio libre para inducir la formación de agregados de proteína que conduce al aumento de la viscosidad fue de 3,7 mM, correspondiente a la adición de 4 mM de

CaCl₂.

La Figura 2 muestra la distribución de tamaño de partícula de las emulsiones estabilizadas mediante 3 % en peso de aislado de caseína micelar con un pH de 7,0 o después de la adición de 5 mM de CaCl₂ y calentamiento a 95 °C durante 15 min como se describe en el Ejemplo 2. (A) 2,5 % en peso de emulsión de aceite, (B) 5 % en peso de emulsión, (C) 10 % en peso de emulsión.

La Figura 3 muestra una micrografía confocal láser de barrido de 3 % en peso de emulsión de girasol de alto contenido oleico estabilizada con concentrado de proteína láctea después del tratamiento térmico y cizallamiento a 95 °C durante 15 min con un pH de 7,0. (A) 2,5 % en peso de aceite, (B) 5 % en peso de aceite, (C) 10 % en peso de aceite. La barra de escala es de 10 micrómetros.

La Figura 4 muestra una micrografía confocal láser de barrido de 3 % en peso de emulsión de girasol de alto contenido oleico estabilizada con concentrado de proteína láctea después del tratamiento térmico y cizallamiento a 95 °C durante 15 min en presencia de 5 mM de CaCl₂. (A) 2,5 % en peso de aceite, (B) 5 % en peso de aceite, (C) 10 % en peso de aceite. Las gotículas de aceite y la fase de proteína se muestran con flechas. La barra de escala es de 10 micrómetros.

La Figura 5 muestra una curva de flujo a 20 °C para 3 % en peso de emulsión de girasol de alto contenido oleico al 5 % en peso estabilizada con concentrado de proteína láctea después del tratamiento térmico y cizallamiento a 95 °C durante 15 min con un pH de 7,0 o en presencia de 5 mM de CaCl₂.

La Figura 6 muestra la viscosidad a un índice de cizallamiento de 10 s⁻¹ para 3 % en peso de emulsiones de girasol de alto contenido oleico estabilizadas con concentrado de proteína láctea después del tratamiento térmico y cizallamiento a 95 °C durante 15 min con un pH de 7,0 o en presencia de 5 mM de CaCl₂.

La Figura 7 muestra la distribución de tamaño de partícula de leche doblemente concentrada calentada en presencia de 5 mM de cloruro de calcio después de la reconstitución del polvo a 13 % de sólidos totales.

La Figura 8 muestra una micrografía confocal de láser de barrido de leche doblemente concentrada calentada en presencia de 5 mM de cloruro de calcio después de la reconstitución del polvo con 13 % de sólidos totales. Las barras de escala son de 20 y 10 micrómetros en (A) y (B), respectivamente.

La Figura 9 muestra una curva de flujo a 25 °C del 50 % de TS (*total solids*, sólidos totales) de la leche en polvo de la invención reconstituida con 5 mM de cloruro de calcio añadido. Círculos blancos: curva de flujo con aumento del índice de cizallamiento (parte superior). Círculos negros: curva de flujo con aumento del índice de cizallamiento (parte inferior).

La Figura 10 muestra la distribución de tamaño de partícula de la leche de control secada al 50 % de TS (A) y de la muestra de la presente invención (B) secada al 37 % de TS en presencia de 6,5 mM de CaCl₂ después de su reconstitución al 13 % de TS.

La Figura 11 muestra una curva de flujo a 20 °C de la leche de control secada al 50 % de TS y de la muestra de la presente invención secada a 37 % de TS en presencia de 6,5 mM de CaCl₂ después de su reconstitución al 50 % de TS.

Descripción detallada de la invención

Cuando se realizaron experimentos sobre el efecto de la adición de cationes divalentes, particularmente calcio, en la leche entera sobre la agregación de proteínas y la viscosidad acumulada, se descubrió, sorprendentemente, que existe un intervalo crítico de adición de cationes divalentes que conduce a la agregación óptima de proteínas sin precipitación o gelificación de los agregados formados después del calentamiento. Cuando se pasó esta concentración óptima de calcio, el sistema presentó sobreagregación con precipitación o disminución de tamaño del agregado.

Sin ceñirse a ninguna teoría, es probable que la adición de cloruro de calcio a las proteínas conduzca a un intercambio entre los protones adsorbidos en la superficie de las proteínas y los iones de calcio que tienen una mayor afinidad. Este fenómeno dio como resultado una disminución del pH de la dispersión y, de esta manera, una disminución de repulsiones electrostáticas entre las proteínas. En estas condiciones, el tratamiento térmico posterior de la leche o de las emulsiones y dispersiones a base de leche, conduce a una agregación controlada de las proteínas, que se demostró que afectaba positivamente a la textura y a las propiedades sensoriales de los productos acabados.

Una ventaja importante de esta invención es que permite texturizar los concentrados basados en proteína láctea reducida en grasa y permite una reducción o eliminación del uso de hidrocoloides y/o emulsionantes adicionales.

En el presente contexto, los aglomerados creados con el método de acuerdo con la invención y presentes en el producto de la invención tienen un tamaño de 3 - 50 micrómetros, preferentemente de 5 - 50 micrómetros, con mayor preferencia de 5 - 10 micrómetros medido por el diámetro medio $D_{(4,3)}$. La distribución del tamaño de partícula (PSD,

particle size distribution) del aglomerado se mide con un granulómetro láser, tal como un Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido). Para las mediciones, una muestra puede, p. ej., dispersarse en la celda de medición Hydro SM hasta obtener una velocidad de oscurecimiento de 9-10 % y después analizarla en el Mastersizer.

5 Adicionalmente, en el presente contexto, los cationes divalentes libres pueden medirse con un electrodo selectivo. Por ejemplo, la concentración de calcio libre (iónico) se determina con semiceldas de la serie DX perfección™ del electrodo selectivo de calcio Toledo Mettler con conector BNC P/N 51344703 conectado a un pHmetro/medidor de iones 692 (Metrohm Suiza).

10 Adicionalmente, en el presente contexto, a menos que se indique de otra manera, el % de un componente significa el % en peso basado en el peso de la composición, es decir, % peso/peso.

Además del "concentrado lácteo" puede haber un producto culinario lácteo, una sopa o base para sopa, un postre, una nata batida, una crema o potenciador de té o café, un componente lácteo en mezclas de café y un componente lácteo para su uso en un sistema de bebidas, tal como un sistema expendedor de bebidas.

15 Además, en el presente contexto, "agitación" significa mover la composición de ingredientes. La agitación puede dar como resultado un cizallamiento de la composición de ingredientes. Si se hace, se prefiere que esto se haga sin destruir los aglomerados.

20 En una realización preferida de la invención, los agregados tienen 5 - 30 micrómetros, preferentemente 5 - 10 micrómetros. Esto proporciona al producto una sensación agradable en la boca sin que los agregados proporcionen una sensación arenosa.

25 Los cationes divalentes son cationes de calcio.

Ventajosamente, los cationes divalentes se añaden hasta que la concentración de cationes divalentes libres sea de 3,5 - 6,5 mM de cationes divalentes. Se ha observado que las cantidades que deben añadirse al concentrado lácteo son de 3 - 25 M.

30 Además, se prefiere que los cationes divalentes se añadan en forma de una sal mineral de calcio seccionada del grupo que consiste en cloruro de calcio, lactato de calcio, gluconato de calcio o fosfato de calcio. En una realización particular preferida de la invención, la sal de calcio es cloruro de calcio.

35 En una realización totalmente natural de la invención, el calcio se obtiene a partir de minerales concentrados lácteos después de la separación de la proteína, grasa y lactosa, p. ej., por fraccionamiento de membrana.

De acuerdo con la invención, el pH de la composición de ingredientes es, preferentemente, de 6,2 - 7,1 antes de añadir los cationes de calcio.

40 Se prefiere que el contenido de proteína soluble en la composición de ingredientes sea menor o igual al 30 % en relación con el contenido total de proteína, lo que indica que la mayor parte de las proteínas está en forma de agregados.

45 En una realización de la invención, la composición de ingredientes comprende de 0 - 50 % en peso de grasa, preferentemente de 1,0 - 20 % en peso, con mayor preferencia de 3,0 - 15 % en peso, con la máxima preferencia de 5 - 10 % en peso de grasa. Se ha observado que incluso con bajas cantidades de grasa, la textura del producto se sigue percibiendo cremosa debido a la aglomeración creada dentro del producto.

50 Las caseínas y proteínas de suero de leche en la composición de ingredientes se proporcionan, preferentemente, en una forma seleccionada del grupo que consiste en leche cruda, leche pasteurizada, leche concentrada a baja temperatura, leche en polvo a baja temperatura, concentrado de proteína láctea, aislado de proteína láctea en forma líquida o en polvo o una combinación de estas, mientras que las proteínas de suero de leche adicionales se proporcionan en una forma seleccionada del grupo que consiste en suero de leche dulce, concentrados de proteína de suero de leche, aislados de proteína de suero de leche en forma líquida, concentrada o en polvo o una combinación de estas.

55 Se ha descubierto que el método de acuerdo con la invención es particularmente útil para elaborar concentrados lácteos. La composición de ingredientes es un concentrado que comprende 6 - 55, preferentemente 25 - 50 % en peso de sólidos lácteos.

60 En una realización particularmente preferida de la invención, el concentrado se seca en polvo mediante liofilización, secado por pulverización o secado por rodillo.

65 Se ha descubierto, sorprendentemente, que la adición de cationes divalentes y las condiciones de proceso de la presente invención forman aglomerados con las micelas de caseína, lo que aumenta el tamaño de partícula coloidal,

la unión al agua y la viscosidad general. Sorprendentemente, después del secado de la composición, se conserva la estructura y la función. Se observó que las condiciones actuales de secado por pulverización a alta presión para la fabricación de leche en polvo estándar daban como resultado un efecto de alto cizallamiento que destruía la agregación controlada de proteínas y, por tanto, la funcionalidad durante el proceso de secado por pulverización. Se conocen diversos tipos de atomización para el secado por pulverización, tales como la rueda centrífuga, boquilla hidráulica de (alta) presión, atomización sónica y neumática (boquilla bifásica). La expresión "sistema de secado a baja presión" se refiere a sistemas de atomización neumática o de rueda centrífuga que protegen la estructura de los agregados de proteína de suero de leche-caseína. Se observó que los atomizadores de alta presión, tales como la atomización por boquilla de (alta) presión hidráulica, dan como resultado un efecto de cizallamiento que destruye así los agregados de proteína de suero de leche-caseína y por lo tanto su funcionalidad única. Tales atomizadores de alta presión son útiles para fabricar polvos de leche convencionales; sin embargo, tal sistema de alta presión no es adecuado para producir muestras de la presente invención. Sin embargo, se ha descubierto que el secado por pulverización utilizando un sistema de secado a baja presión, conserva la funcionalidad del producto. Las boquillas de baja presión pueden funcionar por debajo de 10 MPa (100 bar), con mayor preferencia por debajo de 5,0 MPa (50 bar), preferentemente por debajo de 2 MPa (20 bar).

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Agregados a base de proteína láctea obtenidos por adición de cloruro de calcio en leche entera calentada.

Material y métodos:

Crema S.A. (Le Mont-sur-Lausanne, Suiza) proporcionó leche entera congelada, pasteurizada y microfiltrada (3,5 % en peso de grasa). Ésta tenía un pH inicial de 6,77, medido a 25 °C. Para la adición de calcio, se preparó una solución de $\text{CaCl}_2 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$ (Merck, Darmstadt, Alemania) a 200 mM en agua MilliQ. Se introdujo un volumen de 50 ml de leche en un frasco de vidrio Pyrex de 50 ml (tipo Schott Duran, Alemania) para cada adición de solución de cloruro de calcio para cubrir una adición de calcio libre que variaba de 1 – 16 mM. Se realizó agitación magnética a 300 rpm y a temperatura ambiente de 20-23 °C.

Después de la adición de cloruro de calcio, se introdujeron 20 ml de leche en un tubo de vidrio sellado de 22 ml que contenía un agitador magnético. Los tubos cerrados se sumergieron parcialmente (2/3) durante 15 minutos en un baño de agua regulado a 92,5 °C a fin de alcanzar una temperatura de producto de 90 °C en 3 minutos. La incubación se realizó con agitación magnética (500 rpm) para garantizar el cizallamiento de las muestras. Después de la incubación, los tubos se transfirieron a agua helada para enfriarlos.

La viscosidad capilar se determinó con un reómetro Rheotest LK 2.2 (Medingen GmbH, Dresde, Alemania) y la distribución del tamaño de partícula (PSD) con un analizador de tamaño de partículas Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido).

El aspecto visual directo de los tubos se realizó para detectar la primera concentración de cloruro de calcio libre donde se formaron agregados de proteína. La concentración de calcio iónico (libre) después del calentamiento se determinó con semiceldas de la serie DX perfección™ del electrodo selectivo de calcio Toledo Mettler con conector BNC P/N 51344703 conectado a un pHmetro/medidor de iones 692 (Metrohm Suiza).

Resultados

Tabla 1: pH inicial, diámetros medios de partícula y viscosidad de la leche entera antes y después de calentar a 90 °C durante 15 minutos.

CaCl ₂ añadido (mM)	pH	D [4,3] - Volumen medio ponderado (µm)	D [3,2]- Superficie media ponderada (µm)	η (mPas) 20 °C	+/-	Ca++ libre (mM)	pH final	D [4,3] - Volumen medio ponderado (µm)	D [3,2]- Superficie media ponderada (µm)	η (mPas) 20 °C	+/-
0	6,77	0,632	0,359	1,99	0,04	1,99	6,63	0,648	0,369	2,06	0,07
0,5	nd	nd	nd	nd	nd	2,20	6,67	0,599	0,308	2,13	0,06
1	nd	nd	nd	nd	nd	2,53	6,66	0,609	0,315	2,11	0,06
2	nd	nd	nd	nd	nd	2,93	6,63	0,598	0,302	2,07	0,06

(continuación)

CaCl ₂ añadido (mM)	pH	D [4,3] - Volumen medio ponderado (μm)	D [3,2]- Superficie media ponderada (μm)	η (mPas) 20 °C	+/-	Ca++ libre (mM)	pH final	D [4,3] - Volumen medio ponderado (μm)	D [3,2]- Superficie media ponderada (μm)	η (mPas) 20 °C	+/-
3	nd	nd	nd	nd	nd	3,41	6,58	0,624	0,294	2,08	0,05
4	nd	nd	nd	nd	nd	3,77	6,54	42,80	6,20	2,43	0,06
5	nd	nd	nd	nd	nd	4,24	6,50	217,27	190,52	3,52	0,04
6	nd	nd	nd	nd	nd	4,50	6,46	296,74	207,63	3,92	0,02
7	6,61	0,625	0,349	1,88	0,02	5,25	6,44	207,09	35,19	3,93	0,08
8	nd	nd	nd	nd	nd	5,80	6,41	138,98	40,72	4,80	0,11
9	nd	nd	nd	nd	nd	6,36	6,40	134,17	44,42	5,31	0,13
10	nd	nd	nd	nd	nd	6,91	6,37	113,03	41,19	6,30	0,20
11	nd	nd	nd	nd	nd	7,55	6,34	123,64	37,74	6,27	0,19
13	nd	nd	nd	nd	nd	8,09	6,30	177,75	55,80	5,79	0,51
14	nd	nd	nd	nd	nd	8,89	6,28	155,64	54,94	6,27	0,24
15	nd	nd	nd	nd	nd	9,35	6,27	269,81	79,34	6,12	0,40
16	6,36	0,528	0,253	1,86	0,05	10,10	6,24	173,10	58,53	5,89	0,20

nd: no determinado

En la Tabla 1 puede observarse que la leche original ya contenía 2 mM de calcio iónico libre en forma de calcio coloidal soluble. La adición de CaCl₂ en la leche no solo condujo a un aumento del calcio iónico libre sino también a una disminución del pH después del calentamiento. Hasta una concentración de cloruro de calcio añadido de 4 mM (correspondiente a 3,8 mM de calcio libre medido) el tamaño de partícula en la leche caliente permaneció alrededor de 600 nm para D43 y 300 nm para D32, que corresponde al tamaño de las gotículas de grasa de leche recubierta con proteína y al de las micelas de caseína. Por encima de este valor crítico de CaCl₂, se forman partículas más grandes que llegan a cientos de micrómetros para D43 y D32. Estos agregados son visibles en la superficie de los tubos de vidrio de la Figura 1. Sorprendentemente, el tamaño de los agregados a base de proteínas alcanzó un máximo de aproximadamente 6 mM de CaCl₂ y después disminuyó constantemente mientras más calcio había en el sistema. La viscosidad del sistema aumenta con el aumento del contenido de cloruro de calcio. Los sistemas no se gelificaron, lo que demuestra que las interacciones entre los agregados de proteína podrían controlarse aplicando cizallamiento en los tubos mientras se calientan.

Ejemplo 2:

Adición de calcio en emulsiones estabilizadas de concentrado de proteínas lácteas

Material y métodos:

La solución madre de dispersión de caseínas micelares se preparó con una concentración de proteína de 10 % en peso. El concentrado de caseínas micelares Promilk852B (lote 13610656) se adquirió en Ingredia (Arras, Francia). La composición en polvo fue (g/100 g de polvo húmedo): proteína (Nx6,38) 82,3, Ca 2,6, Mg 0,1, Na 0,07, K 0,29, Cl 0,05, P 1,56. La masa de polvo necesaria para preparar la dispersión se calculó en función del contenido de proteína en el polvo.

El polvo de caseína micelar se hidrató en agua MilliQ durante 3 horas con agitación a temperatura ambiente. Después de 3 horas, la dispersión de proteína se homogeneizó con un homogeneizador unifásico EmulsiFlex C-5 (Avestin, Canadá®) a alta presión. Este tratamiento disminuyó el tamaño de partícula promedio de las caseínas micelares y aumentó la cantidad de caseínas no sedimentables (κ , α s1; y α s2) en el suero, lo que permitió estabilizar la solución e impedir la sedimentación del MCI.

Después de la homogeneización, utilizando un Nanosizer ZS (Malvern Instruments®, Reino Unido), se determinó el diámetro de partícula promedio que era monodisperso y de aproximadamente de 250 nm.

Preparación de emulsiones

- Se prepararon emulsiones de *OW* (*oil/water*, aceite en agua) añadiendo aceite de girasol de alto contenido oleico (Oleificio Sabo, Manno, Suiza) a las dispersiones de proteínas, de manera que la muestra total dio como resultado un contenido de aceite de 2,5, 5 y 10 % en peso y un contenido de proteínas constante de 3 % en peso. Posteriormente, las mezclas se prehomogeneizaron con un Ultra Turrax T25 basic (IKA®, Suiza) a 11,000 rpm/min durante 1 minuto para un volumen de 500 ml. Las emulsiones prehomogeneizadas se homogeneizaron después a alta presión con un PandaPLUS HomoGenius 2000 (GEA®, Alemania) ajustado a 5 MPa (50 bares) para la primera válvula y a 25 MPa (250 bares) para la segunda, para obtener una presión total de 30 MPa (300 bares).
- Las emulsiones se homogeneizaron dos veces con este método. Después de la homogeneización, el pH y la concentración de CaCl₂ se ajustaron a valores específicos definidos. Muestras con diferentes pH se calentaron a una temperatura de 95 °C durante 15 min en un baño de agua caliente justo después de haberse preparado y 1 hora después a diferentes concentraciones de CaCl₂. Después, las emulsiones se enfriaron en agua helada durante 20 min y se conservaron a 4 °C durante 1 hora.
- Posteriormente, las muestras se sometieron a cizalla a 16,000 rpm durante 2 min utilizando un dispersor Ultra Turrax T25 basic (IKA®, Suiza) en un vaso de precipitados de un volumen de 60 ml, se aplicaron treinta círculos para tener el mismo cizallamiento en todo el volumen. Las emulsiones se conservaron después a 4 °C hasta que se realizaron los análisis.
- Distribución de tamaño de partícula
- Para evaluar la distribución de tamaño de partícula, las dispersiones y emulsiones se analizaron después del cizallamiento mediante dispersión dinámica de luz utilizando un MasterSizer 3000 (Malvern Instruments Ltd®, Reino Unido). La muestra de emulsión se dispersó en la celda de medición Hydro SM hasta obtener una velocidad de oscurecimiento de 9-10 %. Se analizaron muestras no calentadas y calentadas. Las mediciones se realizaron tres veces y se registró el promedio de las tres repeticiones.
- Microestructura de agregados de proteína
- Crio-seccionamiento de muestras
- Para analizar las muestras mediante microscopia confocal láser de barrido, CLSM (por sus siglas en inglés), se realizaron cortes criogénicos. Para ello, se añadieron sacarosa y formaldehído a las muestras con objeto de conservarlas (PRICE and JEROME, 2011). Los porcentajes son, para la sacarosa 30 % en peso del volumen total y 3,7 % en peso para el formaldehído. Las muestras se homogeneizaron con un vórtice y se conservaron durante la noche a 4 °C antes de comenzar los análisis.
- Después, se fijaron las muestras. Esta etapa consistió en añadir 0,5 g de la muestra en 1 g de compuesto de temperatura de corte óptima (OCT, por sus siglas en inglés) para su seccionamiento en criostato, Tissue-Tek®. La composición se homogeneizó y se añadieron 0,1 g al portamuestras del criostato, el mismo que ya contenía el compuesto OCT para el seccionamiento en criostato, Tissue-Tek®.
- El portamuestras del criostato se sumergió en un vial de plástico que contenía 80 ml de 2-metilbutano (99 % de Sigma Aldrich®, EE. UU.), y se sumergió en una caja Sagex de nitrógeno líquido. La solución de 2-metilbutano garantiza una buena congelación de la muestra y la protege del secado.
- Después, las muestras se colocaron en un criostato CM 3050 (Leica®, Suiza). A continuación, se realizaron cortes en el microtomo a un grosor de 7 µm de grosor a -21 °C. Los portaobjetos del microscopio se conservaron en un congelador a -20 °C hasta que se realizaron los análisis.
- Los portaobjetos del microscopio se trataron previamente con HistoGrip (50 veces concentrado de ThermoFisher Scientific®, EE. UU.) para adherir el tejido al portaobjetos de vidrio y evitar eliminar los tejidos durante procesos agresivos.
- Microscopía confocal láser de barrido
- Para diferenciar las proteínas y los glóbulos de grasa, las muestras individuales 100/0 (MCI/SPI) y 0/100 (MCI/SPI) se marcaron con colorantes.
- Para dar color a las proteínas se utilizó Fast Green y Nile Red para los glóbulos de grasa. De acuerdo con FOWLER et al., 1985, Nile Red es un colorante excelente para la detección de gotículas de lípidos intracelulares mediante microscopia de fluorescencia, es sumamente hidrófobo y fluorescente. Se disolvieron 25 mg de Nile Red en 100 ml de etanol. La longitud de onda de excitación se consiguió utilizando emisión de 488 nm del láser de diodo y la luz emitida se recogió entre 488 nm y 630 nm.
- Fast Green es un colorante orgánico, atraído electrostáticamente a grupos cargados en proteínas (MERRIL y

WASHART, 1998). Puede unirse de manera no covalente al biopolímero de interés mediante interacciones electrostáticas (AUTY, 2013). La longitud de onda de excitación se ajustó utilizando emisión de 633 nm del láser de diodo y la luz emitida se recogió entre 633 nm y 740 nm. Se utilizó Fast Green al 1 % en peso en agua.

5 Las muestras se tiñeron con una mezcla de Nile Red (100 µl) y Fast Green (3 ml). La mezcla se colocó en portaobjetos de microscopio durante 10 min y se aclaró. Los portaobjetos se montaron utilizando un conjunto de montaje en medio de montaje Vectashield Hard Set Mounting (Vector Laboratories®, EE. UU.).

10 Los portaobjetos del microscopio se analizaron después con un Microscopio confocal de barrido Zeiss® LSM 710 (Zeiss®, Alemania). La CLSM está equipada con láseres que permiten las excitaciones de diversas sondas fluorescentes al mismo tiempo, esta capacidad permite obtener imágenes múltiples de una muestra seleccionando la longitud de onda de excitación y los filtros para recoger la luz de emisión de un colorante concreto. Para todas las imágenes se utilizó 10×/0,45 ∞ /0,17/PL APO y 63×/1,4 aceite/DIC 420782-9900/PL APO.

15 Propiedades de flujo

Un día después del cizallamiento, se realizaron experimentos de flujo con un reómetro de tensión controlada Physica MCR501 (Anton Paar®, Austria) con geometría de cilindros concéntricos CC27-SS/S (diámetro = 27 mm, espacio = 1,14 mm de Anton Paar®, Austria).

20 Se realizaron mediciones de flujo en estado estacionario a una temperatura constante de 25 °C, se aplicó una tensión de cizallamiento de 100 1/s a las muestras durante 5 min, seguido de cuatro índices de cizallamiento, uno de 0,1 – 500 1/s y otro de 500 – 0,1 1/s, estos se realizaron dos veces y se efectuaron 15 mediciones cada 30 s. La viscosidad aparente se registró en función del índice de cizallamiento.

25 Para cada medición, se vertió en el vaso una alícuota (19 ml) de la muestra de emulsión. Las mediciones se realizaron tres veces y se obtuvo el promedio de las tres repeticiones.

Contenido de proteína soluble

30 Para caracterizar el contenido en las proteínas solubles en los productos de la invención, las emulsiones se centrifugaron a 16,000 g a temperatura ambiente durante 20 min utilizando una centrífuga Eppendorf® 5418 (Vaudaux-Eppendorf AG®, Suiza), un día después de la producción. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se conservó a 4 °C para analizarlo mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase inversa (RP-UPLC, por sus siglas en inglés).

35 El sistema UPLC (Waters Corp Milford Ma, EE. UU.) consistió en una bomba binaria, un automuestreador con control de temperatura (gestor de muestras UPSMPM6R) y un detector de matriz de fotodiodos (UPPDA-E). El equipo se controló con el programa informático Empower® 3, versión Pro.

40 Las separaciones se realizaron en una columna analítica de fase inversa Acquity UPLC® BEH300 C4 1,7 µm 2,1x150 mm (Waters Corp Milford Ma, EE. UU.) y en una pre-columna VANGUARD™ BEH300 C4 1,7 µm 2,1 x 5 mm (Waters Corp Milford Ma, EE. UU.). Los viales de UPLC se mantuvieron a una temperatura constante de 8 °C ± 2 °C y se inyectaron mediante el sistema de tratamiento de muestras. Se utilizó una jeringa de inyección de 500 µl y un bucle de inyección de 250 µl.

45 Se prepararon estándares de caseínas a concentraciones de 0,1, 0,3, 1, 3 y 5 % en peso por dilución en agua milliQ a partir de una solución de referencia al 10 % en peso. A un microtubo Eppendorf® de 1,5 ml, se añadieron 200 µl de la muestra y 800 µl del tampón {clorhidrato de guanidina 7,5 M; Citrato trisódico 6,25 mM; DTT 23 mM}. Las masas de la muestra y del tampón se pesaron con precisión. Después, la composición se homogeneizó con un vórtice y se incubó en un mezclador Thermomixer Compact Eppendorf® (Vaudaux-Eppendorf AG®, Suiza) a 60 °C durante 10 min a 650 rpm.

50 Después de la incubación, las muestras se homogeneizaron y se centrifugaron a 16,000 g durante 10 min a temperatura ambiente utilizando una centrífuga Eppendorf 5418 (Vaudaux-Eppendorf AG®, Suiza). El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se introdujo en un vial de UPLC, vigilando la capa de grasa y también que los sedimentos, caso de haberlos, no se suspendieran. El volumen de inyección fue variable, de 30 µl – 150 µl, adaptado al contenido de proteína de la muestra (determinado por el método Kjeldahl, Nx6.38) para tener suficiente señal. Los estándares también se inyectaron con volúmenes ajustados para tener en cuenta la variabilidad.

55 Se llevó a cabo una elución por gradiente con dos disolventes mezclados durante la elución. El disolvente A consistía en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % en agua y el disolvente B era ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % en acetonitrilo/agua (90/10) (v: v). Las separaciones se realizaron con un gradiente lineal de B al 15 - 35 % en 4 min (B al 5 % min⁻¹), B al 35 - 47 % en 24 min (B al 0,5 % min⁻¹) y de B al 47 % - 80 % en 4 min (B al 8,25 % min⁻¹). A esto le siguió una elución isocrática a 80 % de B durante 1 min. Después, regresó linealmente a la condición inicial en 2 min, seguido del reequilibrio de la columna durante 5 min.

El caudal fue de 0,6 ml min⁻¹ y la temperatura de la columna se mantuvo constante a 40 ± 1 °C. La adquisición se consiguió a una λ = 214 nm (resolución de 2,4 nm – 20 puntos/segundo - Tiempo de exposición automático).

5 Cada cromatograma se integró manualmente. Para las curvas de calibración, el área total se representó en función de la cantidad de proteínas inyectadas. El contenido de proteínas solubles se calculó a partir de la proporción entre la cantidad de proteína presente en el sobrenadante después de la centrifugación y la cantidad total de proteína presente en la emulsión sin centrifugación y se expresó en porcentaje.

10 Resultados

Distribución de tamaño de partícula

15 La Figura 2 muestra que después del tratamiento térmico y del cizallamiento, la distribución de tamaño de las emulsiones a un pH de 7,0 muestra un pico de aproximadamente 400-600 nm para el contenido de aceite de girasol 3 probado. Por el contrario, cuando el tratamiento térmico se realiza en presencia de 5 mM de calcio libre añadido, se forman partículas más grandes. Por lo tanto, existe un cambio claro de la distribución de tamaño a aproximadamente 15-25 micrómetros, lo que indica que las gotículas de aceite iniciales se añadieron en partículas basadas en proteínas más grandes.

20 Microestructura

25 La microestructura de los agregados a base de proteínas se muestra claramente en la Figura 3. Se obtuvieron agregados más numerosos cuando se incrementó el contenido de aceite en la emulsión (Figura 3A a 3C). De manera interesante, una mayor ampliación de las partículas muestra que estas están compuestas por gotículas de aceite incluidas con firmeza en una matriz de proteína circundante (Figura 4). Cuanto mayor es el contenido de aceite de girasol en la emulsión, más compacta y esférica es la forma de las partículas (Figura 4C). Por el contrario, se obtuvieron partículas más ramificadas y alargadas para el contenido de aceite más bajo (Figura A). Se descubrió que el contenido de proteína soluble en la emulsión al 5 % en peso de aceite era del 76 % a un pH de 7,0, mientras que después del tratamiento térmico en presencia de 5 mM de cloruro de calcio, se descubrió mediante análisis de UPLC, que era de 30 aproximadamente el 3 %.

Propiedades de flujo

35 Las propiedades de flujo de la emulsión producida con 5 % en peso de aceite se compararon después del tratamiento térmico y cizallamiento a un pH de 7,0 y después de la adición de 5 mM de CaCl₂. Las propiedades de flujo se muestran en la Figura 5.

40 La emulsión producida a un pH de 7,0 mostró un comportamiento de flujo newtoniano con una independencia de la viscosidad en función del índice de cizallamiento. Esto se explica por el hecho de que la viscosidad es impulsada principalmente por la fracción de volumen de aceite y de que las gotículas de aceite no están interaccionando. En la muestra de la presente invención que contiene 5 mM de calcio, el comportamiento de flujo es de fluidificación por cizallamiento, lo cual es una indicación de que se han producido partículas sensibles al cizallamiento, que afectan al comportamiento de flujo general. La viscosidad de la muestra se compara con respecto a los contenidos de aceite de girasol 3 probados a un índice de cizallamiento de 10 s⁻¹ que es relevante para las condiciones en la boca (véase la 45 Figura 6). Puede observarse que, a un pH de 7,0, la viscosidad aumenta ligeramente con el aumento del contenido de aceite. Para las muestras de la presente invención preparadas en presencia de calcio, la viscosidad fue aproximadamente 10 - 100 veces mayor que la de la muestra correspondiente a un pH de 7,0. Esto indica claramente que las partículas de la presente invención permiten generar viscosidad a un contenido mucho más bajo de aceite, lo que permite reducir la grasa en los productos alimenticios, véase la Figura 5.

50 Ejemplo 3:

Adición de calcio en leche doblemente concentrada, tratamiento térmico y secado por pulverización

55 Material y métodos:

Se produjo un conjunto de 2 muestras de acuerdo con el siguiente procedimiento, que implica: concentrar una leche entera comercial a un contenido de sólidos totales (TS) del 35 %, añadiendo una cantidad variable de CaCl₂ (5 y 10 mM) en la leche concentrada, un procesamiento térmico estandarizado que incluye una etapa de inyección de vapor directo y secado por pulverización para obtener una leche en polvo funcionalizada.

60 La leche entera homogeneizada, pasteurizada y microfiltrada, disponible en el comercio (3,5 % de contenido de grasa, Cremo, Le Mont-sur-Lausanne, CH) está concentrada a un contenido total de sólidos como se indica en la Tabla 2, con un evaporador de cono giratorio de película fina Centritherm® CT1-09 (Flavourtech Inc., AU).

El proceso de concentración se realiza mediante recirculación en modo por lote, comenzando con la leche a 4 °C. La

leche se bombea con una bomba de cavidad progresiva desde un tanque tamponador a través de un intercambiador de calor de placa ajustado a una temperatura de salida de 40 °C y el evaporador Centritherm® CT1-09, y nuevamente al tanque tamponador. Por lo tanto, la leche en el tanque tamponador aumenta gradualmente en concentración de sólidos y temperatura. Cuando se alcanza al umbral de concentración crítico, la leche se lleva al contenido de sólidos totales deseado mediante una última pasada por el evaporador sin volver a mezclar y se recoge en un tanque de retención distinto.

Se utilizan los siguientes parámetros de proceso: caudal 100 l/h, temperatura de entrada del evaporador 40 °C, presión de vacío del evaporador 0,004 - 0,01 MPa (40 – 100 mbar), temperatura de vapor del evaporador 90 °C. Esto da como resultado temperaturas de salida de concentrado de aproximadamente 35 °C y caudales de evaporado que disminuyen gradualmente de aproximadamente 50 l/h - 30 l/h con un aumento de la concentración de leche. Los altos caudales de producto de aproximadamente 100 l/h y una temperatura de entrada de producto estable de 40 °C son importantes para evitar las impurezas del concentrado lácteo en la superficie del intercambiador de calor del dispositivo Centritherm®.

El concentrado lácteo se enfría a 10 °C y agitando se añade a la leche la cantidad necesaria de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en polvo (Merck, Darmstadt, Alemania). El período de tiempo habitual para la adición de calcio en polvo a un lote de 40 kg es de aproximadamente 15 minutos.

El concentrado lácteo enfriado y cargado con calcio, se procesó con calor en modo semicontinuo en una planta piloto OMVE HT320-20 DSI SSHE disponible en el comercio (OMVE Netherlands B.V., Holanda). Las etapas del proceso son: precalentar el intercambiador de calor tubular OMVE a 60 °C, inyección de vapor directo a una temperatura de salida de 95 °C, 300 segundos de período de retención en caliente a 95 °C en dos intercambiadores de calor de superficie rascada de la línea OMVE conectados en serie y funcionando a rpm máximas y posterior enfriamiento a una temperatura de salida del producto de aproximadamente 23 °C en el intercambiador de calor tubular OMVE enfriado con agua helada. El caudal se ajusta a 14 l/h para obtener una suma de aproximadamente 300 segundos de tiempo de permanencia en las unidades intercambiadoras de calor de superficie rascada. El tiempo de permanencia en el enfriador OMVE es de aproximadamente 2 minutos. Los tiempos de permanencia son promedios de los caudales volumétricos y del volumen muerto de los elementos de la línea (intercambiador de calor tubular, intercambiador de calor de superficie rascada).

La obstrucción del inyector DSI es un fenómeno crítico, y la línea debe controlarse cuidadosamente en ese aspecto. No se aplica evaporación instantánea (*flash*) y el vapor condensado permanece por completo en el producto.

El concentrado lácteo termoprocesado con 5 mM de calcio añadido, se secó por pulverización en una torre de pulverización de la planta piloto Niro SD 6.3 (GEA NIRO Process Engineering, DK), equipada con un atomizador rotatorio FS1. Los parámetros de funcionamiento son: velocidad de suministro del producto de 10 - 20 kg/h, temperatura de entrada del producto en el atomizador giratorio de 25 - 30 °C, velocidad del atomizador giratorio de 25000 rpm, flujo de aire de 350 - 400 kg/h (control de flujo de masa), temperatura de entrada de aire 160 °C, temperatura del aire de escape 80 °C y humedad relativa del aire de escape 15 %. El producto en polvo acabado se envasa inmediatamente en bolsas herméticas y tiene una humedad residual inferior al 4 %.

Para caracterizar la distribución de tamaño, la microestructura y las propiedades de flujo de la muestra, se utilizaron los mismos métodos que los del Ejemplo 2. Para los experimentos llevados a cabo en polvo secado por pulverización que contenía 5 mM de CaCl_2 , la muestra se reconstituyó al 13 o 50 % de TS antes de las mediciones. Se vertió agua destilada en un vaso de precipitados y se calentó a 42 °C – 44 °C con un baño de agua. Se midió un volumen de 150 ml de agua destilada a 42 °C - 44 °C y utilizando un cilindro volumétrico se transfirió a un vaso de precipitados de vidrio. A los 150 ml de agua destilada se añadió una cantidad de 22,5 g de leche en polvo a 42 °C y se mezcló con una cuchara durante 30 segundos.

Resultados

Muestras líquidas

Tabla 2: Media de diámetros promedio D_{43} y D_{32} y viscosidad a un índice de cizallamiento de 13 s^{-1} medido a 25 °C para leche doblemente concentrada (25 % de TS) antes y después del tratamiento térmico en presencia de CaCl_2 a 95 °C durante 300 segundos.

Muestra	pH	$D(4,3)$ (micrómetros)	$D(3,2)$ (micrómetros)	Viscosidad de cizallamiento a 13 s^{-1} (mPa.s)
Leche no calentada con 25 % de TS, 5 mM de CaCl_2	6,38	0,836	0,569	6,2
Leche calentada con 25 % de TS, 5 mM de CaCl_2	6,39	28,40	9,42	349

(continuación)

Muestra	pH	D(4,3) (micrómetros)	D(3,2) (micrómetros)	Viscosidad de cizallamiento a 13 s ⁻¹ (mPa.s)
Leche no calentada con 25 % de TS, 10 mM de CaCl ₂	6,23	0,816	0,542	4,23
Leche calentada con 25 % de TS, 10 mM de CaCl ₂	6,24	66,,80	11,20	150

En la Tabla 2 puede observarse que, después del tratamiento térmico, las muestras de la presente invención presentan un marcado aumento del tamaño de partícula, lo que conduce a un aumento de la viscosidad. Puede observarse que en presencia de la adición de 10 mM de cloruro de calcio, el valor de D(4,3) aumentó a 66,8 micrómetros, lo que condujo a una ligera arenosidad de la muestra. Para esta concentración de leche, se obtuvieron las mejores condiciones y perfil de agregación con la adición de 5 mM de CaCl₂, lo que puede inferirse también por la mayor viscosidad alcanzada (349 mPa.s) en comparación con la adición de 10 mM de CaCl₂ (150 mPa.s). Después del secado por pulverización, las muestras se caracterizaron al reconstituirse en agua MilliQ.

Distribución de tamaño de partícula

La distribución de las partículas después de la reconstitución presenta un pico a aproximadamente 20 micrómetros (véase la Figura 7) que está muy cerca del tamaño de partícula obtenido antes del secado por pulverización (D(4,3) = 28,4 micrómetros, Tabla 2). La ligera reducción en el tamaño de partícula puede deberse al efecto de cizallamiento que se produce durante el secado por pulverización del producto. Sorprendentemente, el contenido de proteína soluble obtenido después de la reconstitución del polvo al 13 % de TS fue del 7 % de las proteínas totales, lo que indica que la mayoría de las proteínas lácteas estaban implicadas en la estructura del agregado.

Microestructura

En las Figuras 8 A y B puede observarse la microestructura de las partículas. Los agregados eran más bien compactos y estaban compuestos por proteínas y gotículas de grasa sin indicios de proteínas no reactivas, lo que confirma la baja cantidad de proteínas solubles. Un mayor aumento de las partículas en la Figura 8B muestra gotículas de grasa bien embebidas con un tamaño promedio de 1-2 micrómetros embebidas en una densa matriz de proteínas. Hay pocos indicios de coalescencia de gotículas de grasa, lo que indica que la formación de agregados surgió por un mecanismo de floculación.

Propiedades de flujo después de la reconstitución al 50 % de TS

La leche en polvo secada por pulverización de acuerdo con la presente invención, se reconstituyó al 50 % de TS, que es generalmente el TS en el que la leche entera se seca por pulverización. En la Figura 9 puede observarse que el comportamiento de flujo es fuertemente de fluidificación por cizallamiento, presentando una pronunciada pendiente negativa y una viscosidad de cizallamiento baja elevada. Esto es un indicio de que después de la reconstitución, el producto había construido alguna estructura y que los agregados de proteína podían interactuar entre sí. Sorprendentemente, la estructura pudo recuperarse al liberar la tensión en la muestra ya que las curvas ascendente y descendente estaban casi superpuestas.

Ejemplo 4:

Adición de calcio en leche triplemente concentrada, tratamiento térmico y secado por pulverización

Material y métodos:

Leche de referencia

Leche entera homogeneizada, pasteurizada, disponible en el comercio (3,5 % de contenido de grasa, Emmi, Lucerne, CH) se concentró en un evaporador de película descendente de 3 efectos Scheffers (de Scheffers B.V.) al 50 % de sólidos totales. El concentrado lácteo se enfrió con un intercambiador de calor de placa a 4 °C y el pH del concentrado lácteo líquido homogeneizado medido era de 6,5. La composición se precalentó de nuevo a 60 °C con un intercambiador de calor de placa y posteriormente se calentó a 85 °C con un sistema de inyección de vapor directo (autoconstruido por Nestlé) con un tiempo de retención de 15 segundos. Después del tratamiento térmico, el concentrado lácteo se enfrió rápidamente con un intercambiador de calor de superficie rascada 3VT460 CREPACO (de APV Invensys Worb) a 40 °C. Después, el concentrado lácteo se secó por pulverización en un Egron de 3,5 m de Nestlé (autoconstruido) mediante un sistema de boquillas bifásico (boquilla de 1,8 mm) hasta un contenido máximo de humedad del 3 % y se envasó en bolsas herméticas. Las condiciones de secado por pulverización fueron: flujo del producto de 413 kg/h a 37 °C de temperatura del producto, temperatura de entrada de aire caliente de 270 °C, flujo de

aire de 4664 kg/h y temperatura del aire de salida de 88 °C.

Composición de la presente invención

- 5 Leche entera homogeneizada, pasteurizada, disponible en el comercio (3,5 % de contenido de grasa, Emmi, Lucerna, CH) se concentró con un evaporador de película descendente de 3 efectos Scheffers (de Scheffers B.V.) al 37 % de sólidos totales. El concentrado lácteo se enfrió con un intercambiador de calor de placa a 4 °C y se añadió 6,5 mM de cloruro de calcio. El concentrado lácteo ajustado en calcio se precalentó de nuevo a 60 °C con un intercambiador de calor de placa y posteriormente se calentó a 95 °C con un sistema de inyección de vapor directo (autoconstruido por
- 10 Nestlé) con un tiempo de retención de aproximadamente 300 segundos. Después del tratamiento térmico, el concentrado lácteo se enfrió rápidamente con un intercambiador de calor de superficie rascada 3VT460 CREPACO (de APV Invensys Worb) a 40 °C. Después, el concentrado lácteo se secó por pulverización en un secador por pulverización NIRO SD6 3N mediante un sistema de boquillas de disco giratorio a 17,000 rpm hasta un contenido máximo de humedad del 3 % y se envasó en bolsas herméticas. Las condiciones de secado por pulverización fueron:
- 15 flujo del producto de 20 l/h a 40 °C de temperatura del producto, temperatura de entrada de aire caliente de 160 °C, flujo de aire de 360 m³/h y temperatura del aire de salida de 80 °C.

Mediciones de distribución de tamaño

- 20 Los polvos lácteos de la presente invención se compararon con las referencias anteriores y se caracterizaron mediante difracción láser para determinar la distribución del tamaño de partícula, PSDS (por las siglas del inglés).

- 25 Las muestras en polvo se reconstituyeron antes de las efectuar las mediciones. Se vertió agua destilada en un vaso de precipitados y se calentó a 42 °C – 44 °C con un baño de agua. Se midió un volumen de 150 ml de agua destilada a 42 °C – 44 °C y utilizando un cilindro volumétrico se transfirió a un vaso de precipitados de vidrio. A los 150 ml de agua destilada, se añadió una cantidad de 22,5 g de leche en polvo a 42 °C y se mezcló con una cuchara durante 30 segundos.

- 30 La dispersión de la muestra líquida o en polvo reconstituida en agua destilada o desionizada y las mediciones de la distribución del tamaño de partícula se realizaron mediante difracción láser.

Las configuraciones de las mediciones utilizadas fueron índice de refracción de 1,46 para las gotículas de grasa y de 1,33 para el agua a una absorción de 0,01. Todas las muestras se midieron a un índice de oscuridad de 2,0 – 2,5 %.

- 35 Propiedades de flujo

- 40 Utilizando el proceso descrito anteriormente se reconstituyeron muestras al 50 % de TS. Los experimentos de flujo se realizaron con un reómetro de tensión controlada Physica MCR501 (Anton Paar®, Austria) con una geometría de cilindros concéntricos CC27-SS/S (diámetro = 27 mm, espacio = 1,14 mm, de Anton Paar®, Austria). Las mediciones de flujo en estado estacionario se realizaron a una temperatura constante de 25 °C, se aplicó una tensión de cizallamiento de 100 1/s a las muestras durante 5 min, seguido de cuatro índices de cizallamiento, uno de 0 a 100 1/s y otro de 100 a 0 1/s, estos se realizaron dos veces; se realizaron 15 mediciones cada 30 segundos. La viscosidad aparente se registró en función del índice de cizallamiento.

- 45 Para cada medición, se vertió en el vaso una alícuota (19 ml) de la muestra de emulsión. Las mediciones se realizaron 3 veces.

Resultados

- 50 Distribución del tamaño de partícula

- 55 La distribución del tamaño de partícula de leche entera secada por pulverización al 50 % de TS se determinó después de la reconstitución al 13 % de TS (Figura 10). En la Figura 10A puede observarse que se descubrió un pico mayor de 0,5 micrómetros, seguido de una cola de hasta 6 micrómetros. Esto indica que las gotículas de grasa de leche y la caseína micelar de la leche se miden concomitantemente, de manera que no se ha producido agregación significativa en el sistema. Para la muestra de la presente invención que se trató en presencia de 6,4 nM de cloruro de calcio añadido, la distribución del tamaño se cambió a diámetros de partícula más grandes. El valor de D(4.3) alcanzó 11 micrómetros, lo que explica la presencia de agregados de proteína, mientras que un pequeño pico residual de aproximadamente 0,5 micrómetros probablemente representaba las caseínas micelares que no habían reaccionado
- 60 (Figura 10B). Los niveles de proteínas solubles fueron de 33,5 % en la muestra de leche de control, mientras que en la muestra producida en presencia de calcio añadido fueron del 15,5 %. De nuevo, esto demuestra que la presente invención favorece la agregación de proteínas y el atrapamiento de gotículas de aceite en los agregados de proteína.

- 65 Propiedades de flujo

Los dos polvos de leche se reconstituyeron al 50 % de TS y se compararon sus propiedades de flujo. La leche entera

- 5 de control que se secó por pulverización al 50 % de TS mostró un comportamiento de fluidificación por cizallamiento y una meseta de viscosidad de cizallamiento baja de aproximadamente 100 Pa.s (véase la Figura 11). Cuando la leche de la presente invención se reconstituyó al 50 % de TS, también mostró un perfil de fluidificación por cizallamiento, pero la viscosidad de cizallamiento baja fue 100 veces mayor y la región de fluidificación por cizallamiento tuvo una pendiente mucho más pronunciada. Esto es un indicio de muestra sumamente estructurada, así como la prueba de la interacción entre los agregados de proteínas. Esto también demuestra que la presente invención es claramente capaz de generar una viscosidad más alta con un contenido de grasa equivalente y, por lo tanto, tiene potencial para la reducción de grasa en los productos alimenticios.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un concentrado lácteo, que comprende las etapas de:

- 5 proporcionar una composición de ingredientes que comprende caseínas micelares y proteínas de suero de leche y que tiene un pH de 6,1 - 7,1 y una concentración de 3 - 25 % en peso de proteínas, y en donde la composición de ingredientes tiene una relación entre caseína y proteína de suero de leche de 90/10 - 60/40, añadir 3 - 25 mM de cationes divalentes para proporcionar una concentración de 3 - 8 mM de cationes divalentes libres en la composición de ingredientes;
- 10 homogeneizar la composición de ingredientes; y posteriormente pasteurizar y agitar la composición de ingredientes a una temperatura de 80 ° - 105 °C durante un período de 0,5 - 3 min para formar proteínas aglomeradas que comprenden caseínas y beta-lactoglobulina a partir de las proteínas de suero de leche, teniendo los aglomerados un tamaño de 3 - 50 micrómetros medido por diámetro medio $D_{(4,3)}$, y en donde la composición de ingredientes es un concentrado que comprende 6 - 55 % en peso de sólidos lácteos, y en donde los cationes divalentes son Ca.
- 15
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los agregados tienen 5 - 30 micrómetros, preferentemente 5 - 10 micrómetros.
- 20
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los cationes divalentes se añaden hasta que la concentración de cationes divalentes sea de 3,5 - 6,5 mM de cationes divalentes.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los cationes divalentes se añaden en forma de una sal mineral.
- 25
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la sal de calcio se selecciona del grupo que consiste en cloruro de calcio, lactato de calcio, gluconato de calcio y fosfato de calcio.
- 30
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pH de la composición de ingredientes es de 6,2 - 7,1 antes de añadir los cationes de calcio.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el contenido de proteína soluble en la composición de ingredientes es menor o igual al 30 % en relación con el contenido de proteína total.
- 35
8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición de ingredientes comprende 0 - 50 % en peso de grasa, preferentemente 1,0 - 20 % en peso, con mayor preferencia 3,0 - 15 % en peso, con la máxima preferencia 5 - 10 % en peso de grasa.
- 40
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las caseínas y proteínas de suero de leche en la composición de ingredientes se proporcionan en una forma seleccionada del grupo que consiste en leche cruda, leche pasteurizada, leche concentrada a baja temperatura, leche en polvo a baja temperatura, concentrado de proteína láctea, aislado de proteína láctea en forma líquida o en polvo o una combinación de estas mientras que las proteínas de suero de leche adicionales se proporcionan en una forma seleccionada del grupo que consiste en suero de leche dulce, concentrados de proteína de suero de leche, aislados de proteína de suero de leche
- 45 en forma líquida, concentrada o en polvo o una combinación de estas.
10. Un método de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en donde el concentrado se seca en polvo mediante liofilización, secado por pulverización o secado por rodillo.

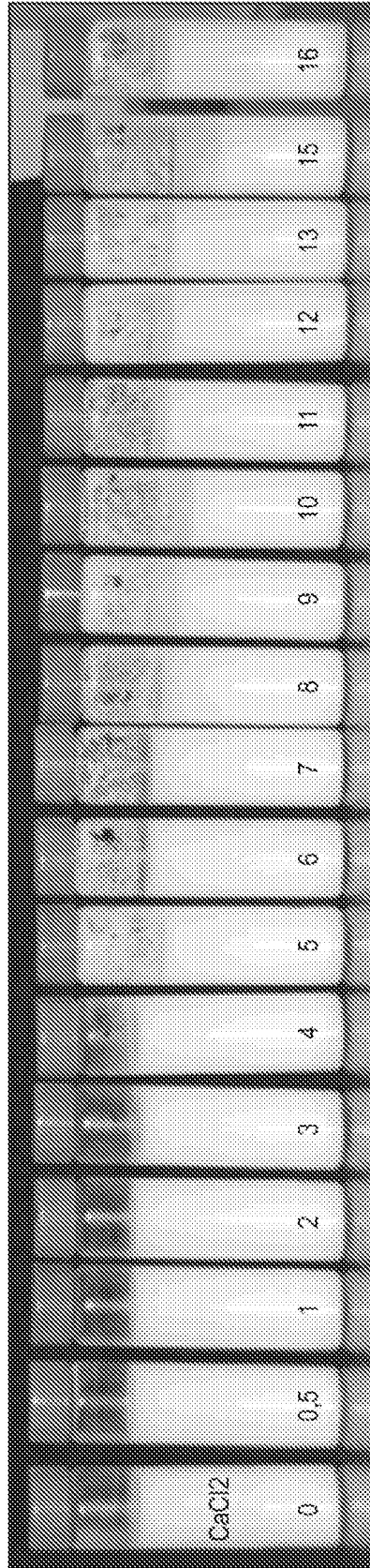
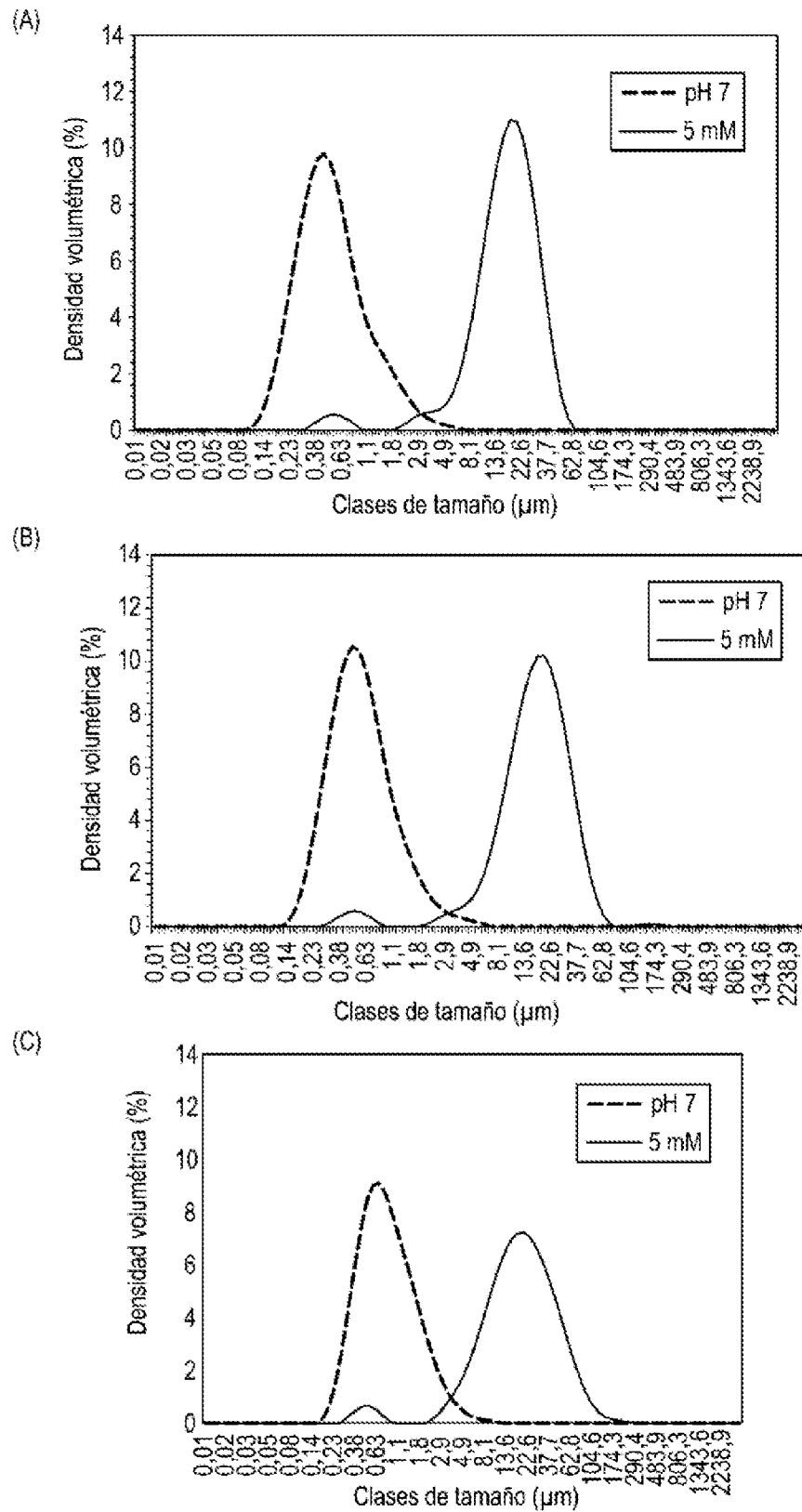


FIG. 1



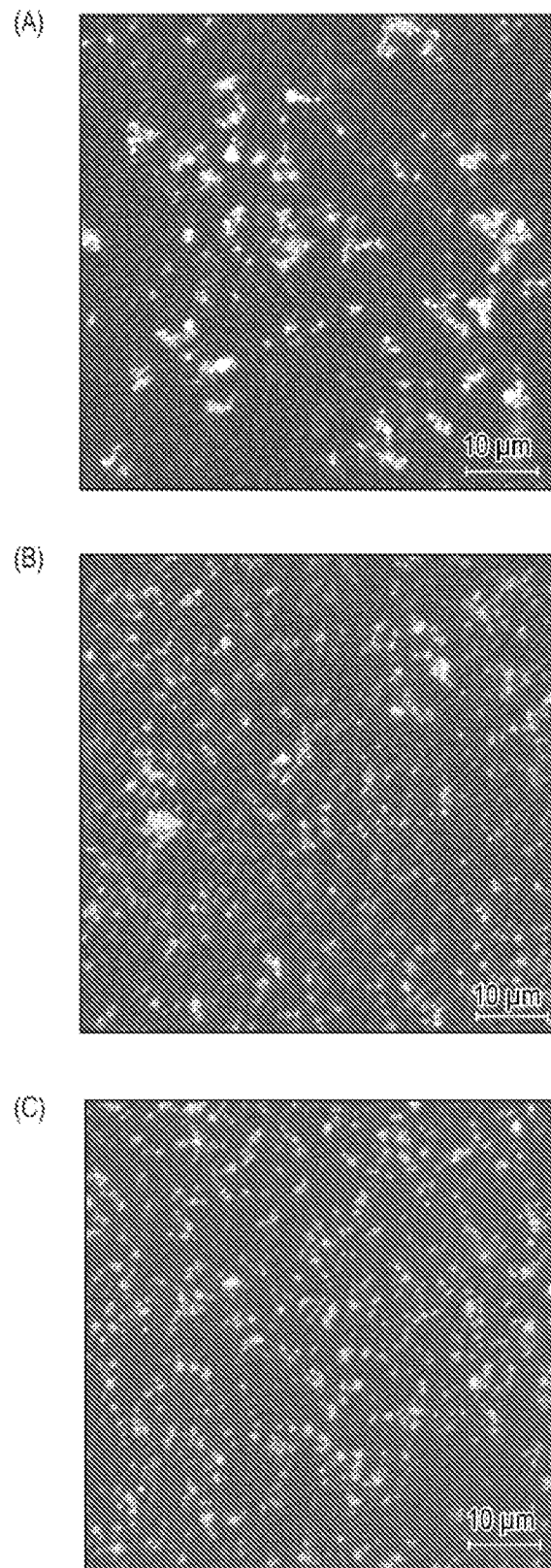


FIG. 3

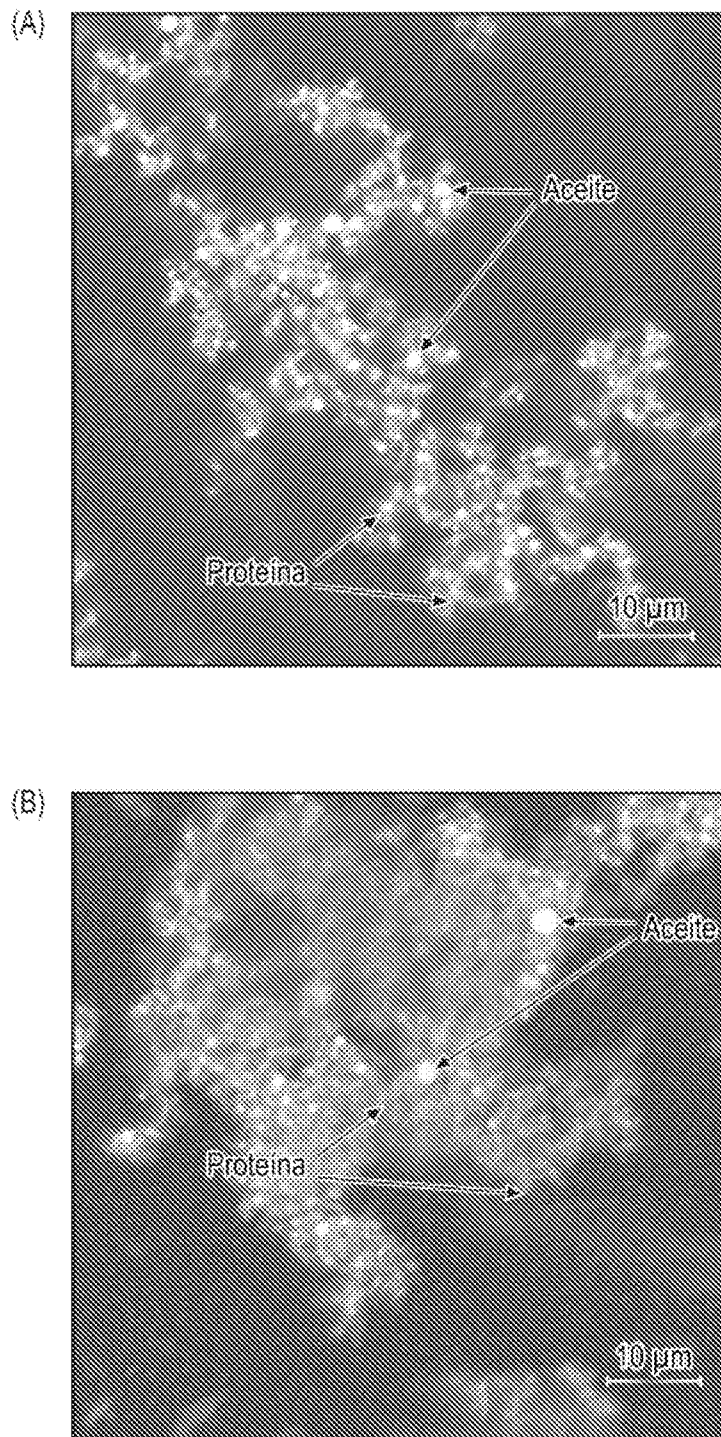


FIG. 4

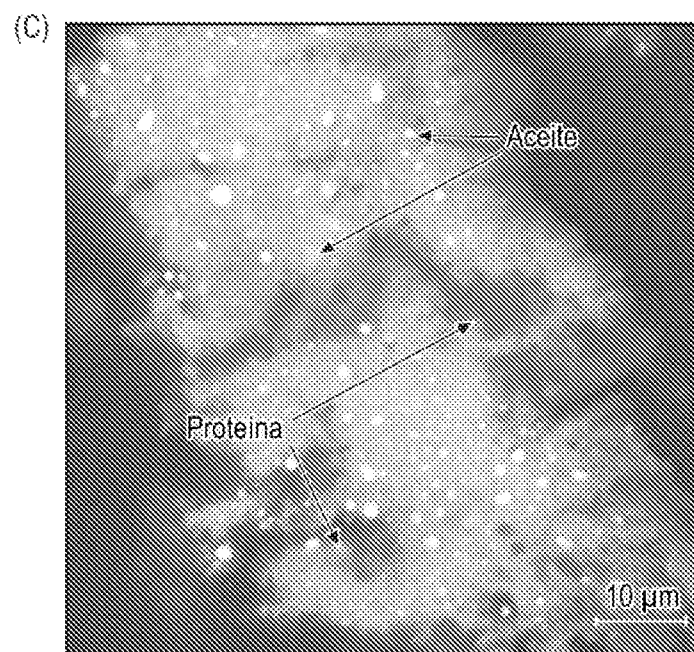


FIG. 4 (cont.)

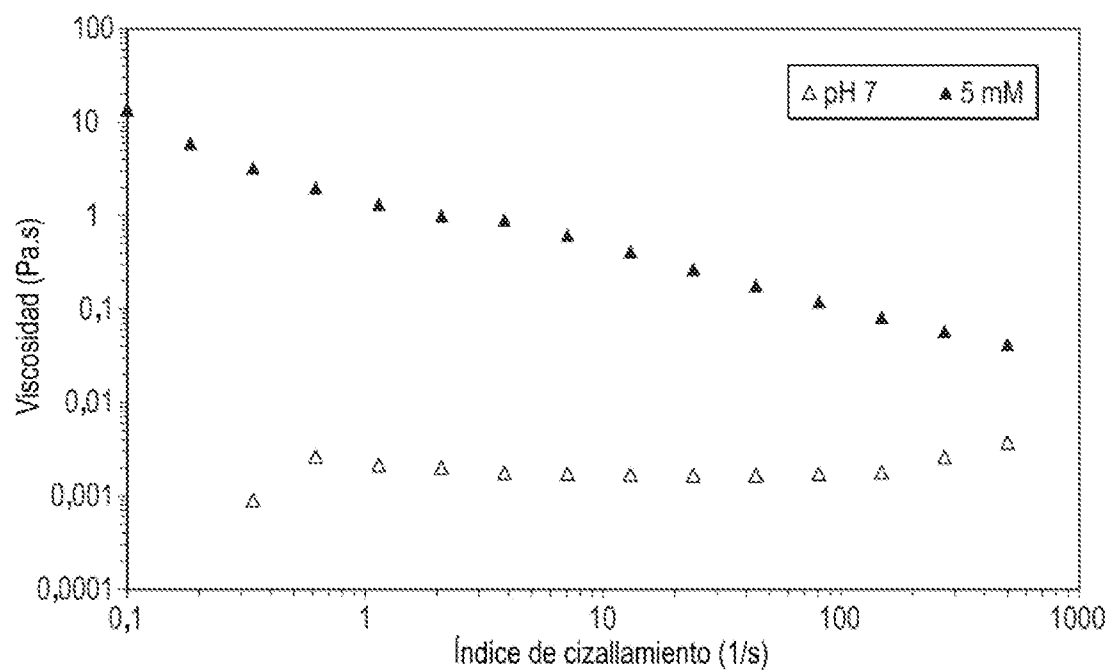


FIG. 5

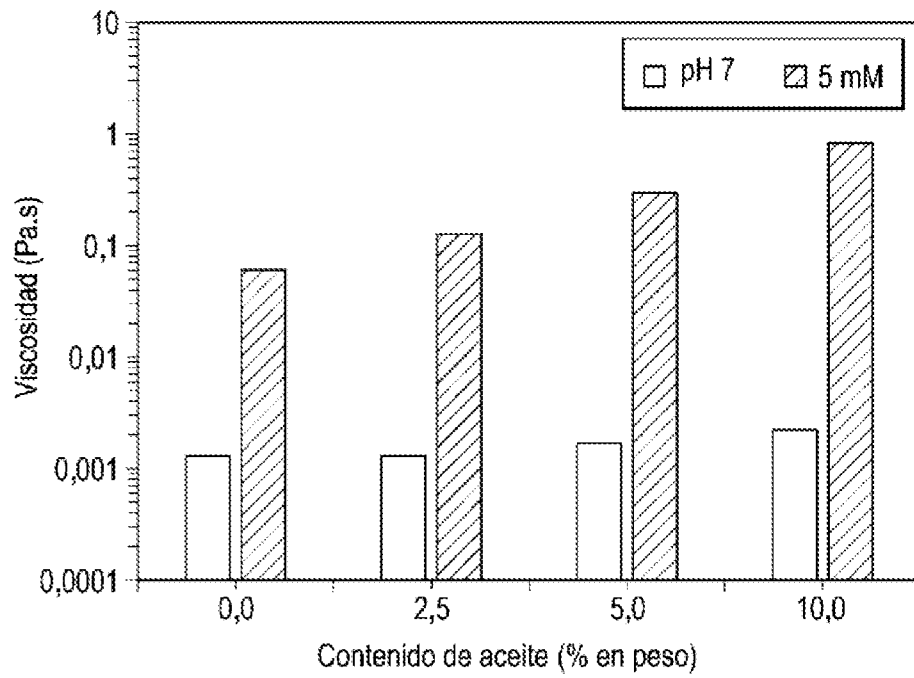


FIG. 6

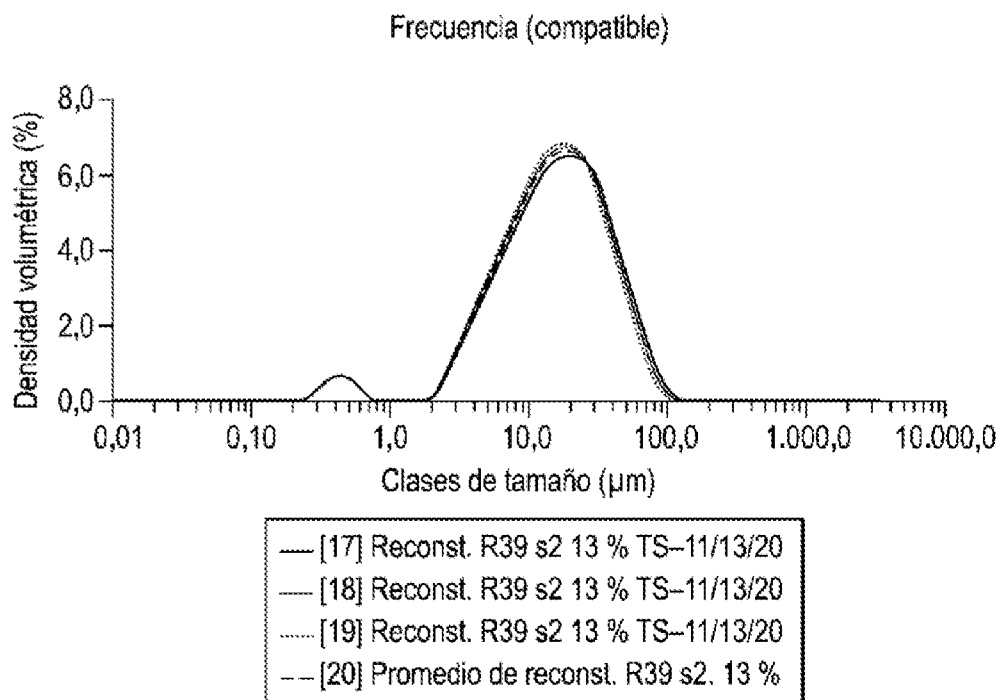


FIG. 7

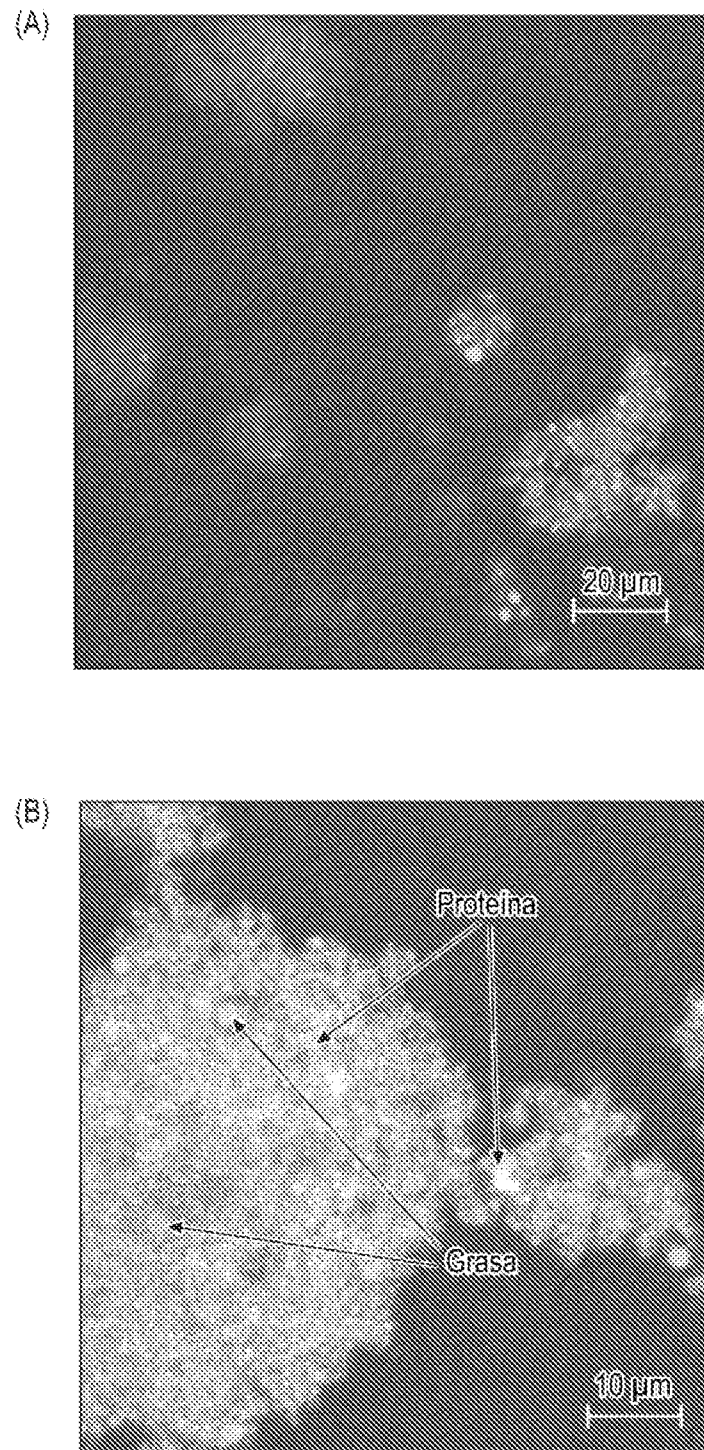


FIG. 8

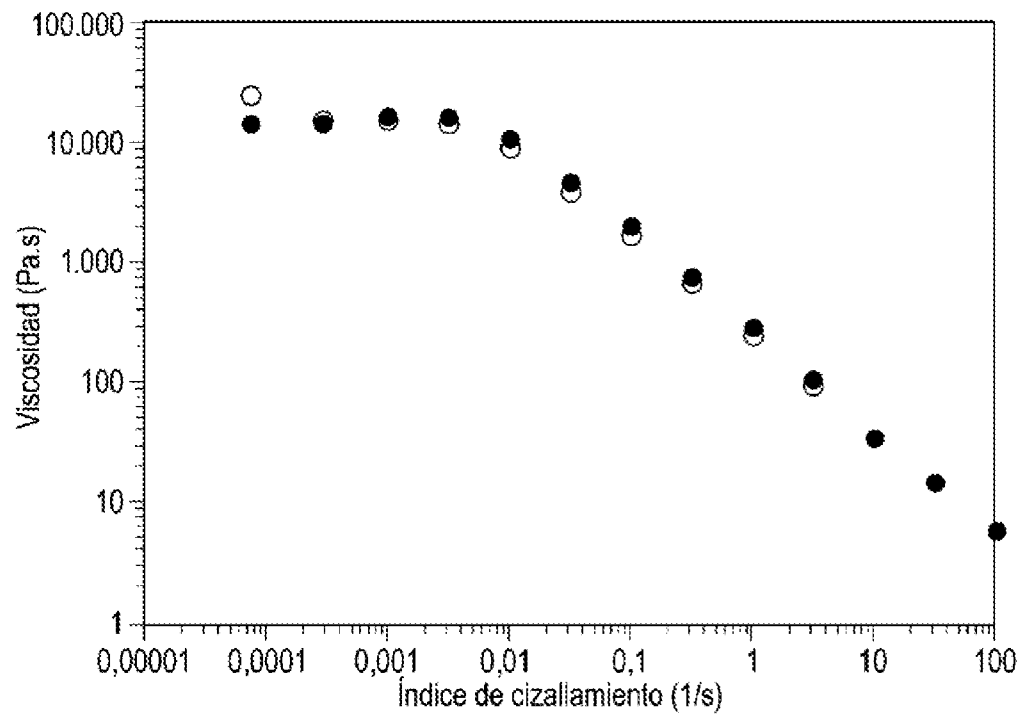


FIG. 9

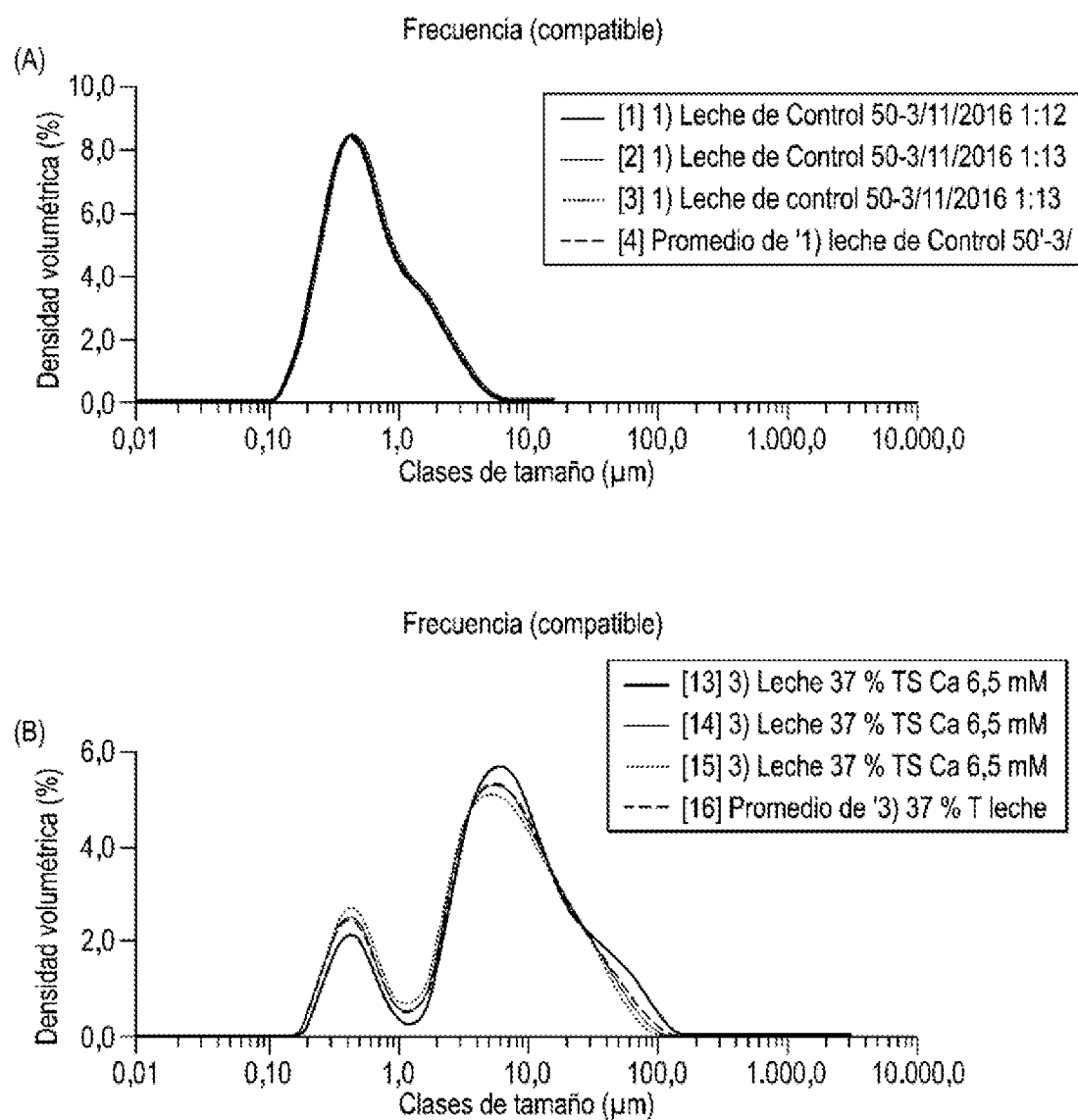


FIG. 10

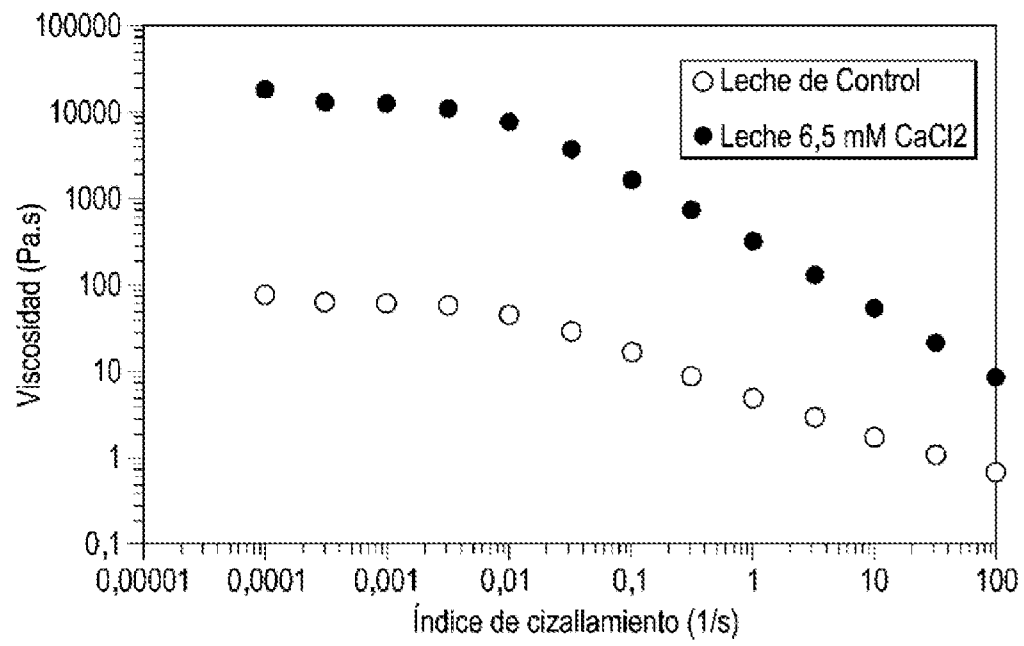


FIG. 11