



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 241 364**

51 Int. Cl.:

A23J 1/20 (2006.01)

A23C 9/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **99969650 .3**

96 Fecha de presentación : **29.09.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1124436**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2001**

54 Título: **Tratamiento de un material proteico.**

30 Prioridad: **30.09.1998 FI 982114**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.10.2005**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.12.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.12.2008**

73 Titular/es: **Valio Ltd.**
Meijeritie 6
00370 Helsinki, FI

72 Inventor/es: **Vaarala, Outi;**
Tossavainen, Olli;
Kerojoki, Outi;
Salminen, Kari y
Eriksson, Marika

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 241 364 T5

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de un material proteico.

5 La invención se refiere a un método de elaboración de material proteínico, más exactamente a un método de separación de insulina bovina de un material proteínico procedente de leche de vaca. La invención se refiere también a un material proteínico substancialmente libre de insulina bovina producido por el citado método y a su utilización como componente proteínico de formulaciones para niños pequeños o para otra preparación nutritiva especial o como materia prima para leche de consumo, otras bebidas lácteas o diferentes preparaciones lácteas. En la producción de esos productos, se puede utilizar, como componente proteínico, el material proteínico libre de grasa, substancialmente libre de insulina bovina, procedente de leche de vaca producido por el citado método.

15 El material proteínico libre de grasa, substancialmente libre de insulina bovina, preferiblemente el suero procedente de leche de vaca y obtenido según la invención, es un componente proteínico muy adecuado en los anteriores productos, ya que el procedimiento de la invención no altera substancialmente el sabor del producto.

20 La *diabetes mellitus* dependiente de insulina (IDDM) es una enfermedad causada por la destrucción de las células beta que producen insulina en los islotes de Langerhans del páncreas, mientras que otras células de los islotes permanecen intactas (Castano L. y Eisenbarth GS. *Annu. Rev. Immunol.* 8 (1990) 647-79).

25 Se cree que en el riesgo de que los niños contraigan la IDDM intervienen tanto factores genéticos como medioambientales. El factor genético es importante, pero no suficiente, para explicar el desarrollo de IDDM. El riesgo de contraer IDDM en la vida es solo de un 30 a un 50% en uno de dos gemelos monozigóticos, si el otro tiene IDDM. Solamente el 10% de nuevos casos de IDDM ocurren en familias que tienen IDDM, y el 90% de nuevos casos son diagnosticados en pacientes sin historia familiar de IDDM. En otras palabras, los factores del entorno pueden tener incluso una importancia más significativa que los factores genéticos en el desarrollo de IDDM.

30 Varios estudios epidemiológicos muestran que la exposición a proteínas de leche de vaca en la primera infancia incrementa el riesgo de contraer IDDM (Gerstein H., *Diabetes Care* 17 (1994) 13-19). Se han utilizado observaciones epidemiológicas para presentar varias hipótesis concernientes a los mecanismos en los que las proteínas de leche de vaca podrían actuar como factores diabetogénicos. Uno de las últimas es una hipótesis según la cual la insulina de la leche de vaca puede causar una respuesta inmune que se dirige erróneamente contra la producción de la propia insulina del niño (Vaarala, O., Paronen, J., Otonkoski, T., Åkerblom, H.K., *Scand. J. Immunol.* 47 (1998) 131-135).

35 La insulina heteróloga administrada por vía oral, ligeramente diferente de la insulina autóloga, puede trastornar la tolerancia inmunológica frente a células beta. La formación de linfocitos que identifican insulina puede ser nociva en personas que tienen susceptibilidad hereditaria a IDDM, y la activación de tal población de linfocitos puede más adelante en la vida dar lugar a un ataque autoinmune frente a células que producen insulina. Los autores de la presente invención han demostrado que la administración de una formulación para niños induce la producción de anticuerpos para insulina bovina (Vaarala, O., Paronen, J., Otonkoski, T., Åkerblom, H.K., *Scand. J. Immunol.* 47 (1998) 131-135). Estos anticuerpos reaccionan cruzadamente con insulina humana. Dado que la presencia de auto-anticuerpos de insulina (IAA) precede y predice la aparición de IDDM, la inmunización a insulina causada por productos lácteos puede ser nociva e incrementar el riesgo de contraer IDDM. Según esto, los productos lácteos que no contienen insulina bovina inmuno-reactiva pueden considerarse nutrientes no-diabetogénicos.

45 Siendo el factor activante de la auto-inmunización la insulina bovina, que está presente en pequeñas cantidades en la leche de vaca, sería de crucial importancia eliminarla de las formulaciones para niños pequeños con el fin de evitar la aparición de IDDM en niños. Según esto, existe la necesidad de productos comerciales de leche de vaca y productos basados en leche de vaca que no contengan la citada insulina bovina inmunoreactiva. Esto se refiere en particular a formulaciones para niños pequeños, que son los primeros productos basados en leche de vaca que consumen los niños pequeños. Además, se refiere a otras preparaciones nutritivas especiales y diferentes bebidas lácteas y productos lácteos tales como helados, yogures y queso.

55 Sería deseable, además, que la parte de proteína utilizada en los productos no cambiara substancialmente su sabor familiar.

60 Los autores de la presente invención han demostrado previamente que la insulina bovina puede separarse de un material proteínico sin grasa proveniente de leche de vaca, tal como suero o leche desnatada, mediante intercambio catiónico seguido de hidrólisis opcional y, después de la hidrólisis, tratamiento cromatográfico opcional, que puede ser tratamiento de adsorción en resina, por ejemplo (Solicitud de Patente finesa 971872). La Patente finesa 94089 de los autores de la presente invención también describe el tratamiento de adsorción en resina de un hidrolizado de proteína.

65 Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que la insulina bovina se puede separar de un material proteínico líquido sin grasa proveniente de leche de vaca, tal como suero o leche desnatada, de forma directa por medio de tratamiento de adsorción en resina. Este nuevo método separa la insulina bovina del citado material proteínico de forma más completa y económica que el método anteriormente utilizado.

El nuevo método no requiere ni incluso hidrólisis de la proteína. Esto evita los costes extra debidos a la etapa de hidrólisis y el cambio de sabor causado por los productos de hidrólisis. Los productos de hidrólisis obtenidos son proteínas escindidas que cambian el familiar sabor del producto que se produce. Por ejemplo la leche, cuya parte proteínica se reemplaza al menos parcialmente por suero, que se hidroliza y por tanto contiene proteínas escindidas, no sabe lo mismo que la leche. Por el contrario, la leche, cuya parte proteínica se reemplaza al menos parcialmente por suero tratado por el método de la invención y que contiene las proteínas completas, tiene substancialmente el mismo sabor que la leche.

La leche de vaca contiene habitualmente pequeñas cantidades de insulina bovina. El contenido varía dependiendo del método de ensayo, pero ha sido detectado un contenido de aproximadamente 1 ng/ml por ejemplo por el método ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) y el método RIA (Radio inmuno Assay).

En esta invención, la insulina bovina se ensayó en muestras empleando el método RIA. La solución de muestra se liofilizó, se disolvió en una solución concentrada y se ensayó por RIA. El método ELISA se utilizó como un segundo método independiente, donde los anticuerpos utilizados no eran los mismos que en el ensayo RIA. El análisis por RIA ha de realizarse antes del tratamiento por calor para obtener resultados fiables. Los métodos RIA y ELISA dieron resultados del mismo orden.

La cromatografía de líquidos y una columna de fase inversa (Kroeff y col. *J. Chromatogr.* 461 (1989) 45-61; Poll y Harding, *J. Chromatogr.* 539 (1991) 37-45; Cox, *J. Chromatogr.* 599 (1992) 195-203; Welinder, *J. Chromatogr.* 542 (1991) 83-99), filtración de gel o una columna de intercambio aniónico (WO 90/00176 y WO 90/00177) o una columna de intercambio de catión débil (DE 3511270 A1 y GB 2173503 A) han sido habitualmente empleadas en la purificación de insulina a partir de los licores de producción y extracción. Ninguna de las publicaciones ha discutido en modo alguno la separación directa de insulina bovina de leche desnatada o suero, excepto en la Solicitud de Patente Finesa 971872 de los autores de la presente invención. Como tal, la cromatografía de fase inversa o cromatografía de filtración por gel no es adecuada para tratamiento de la leche ya que la leche tratada deberá ser adecuada para productos alimenticios y de precio razonable.

La insulina se puede inactivar fácilmente inmunológicamente con tratamiento por calor. Por ejemplo se puede inactivar por pasteurización (72°C) y tratamiento ultra elevado (tratamiento UHT, 135-140°C) la mayor parte de la insulina a una forma no detectable por RIA. Sin embargo, hay que señalar que los niños pequeños a quienes se les ha dado preparaciones con estas formulaciones han alcanzado inmunización a insulina bovina a través de las formulaciones (Vaarala, O., Paronen, J., Otonkoski, T., Åkerblom, H.K., Scand. J. Immunol. 47 (1998) 131-135), en cuya producción la mayor parte de la insulina ha pasado a no-detectable por el ensayo RIA en la etapa de calentamiento.

El solicitante ha descubierto ahora cómo separar la insulina bovina más de forma más eficaz que la anterior a partir de un material proteínico líquido libre de grasa proveniente de leche de vaca. En este caso, se obtiene una composición de proteína, con costes razonables, la cual deriva de leche de vaca y es adecuada para productos alimenticios y está substancialmente libre de insulina bovina, siendo por tanto adecuada para utilizarla como la parte proteínica de una formulación para niños pequeños en particular, pero también en otras preparaciones nutritivas especiales, o como materia prima en leche de consumo, otras bebidas lácteas y varios productos lácteos tales como helados, yogur o queso, y que no cambia ese sabor que es tan familiar.

El método de la invención para separar la insulina bovina desde un material proteínico líquido libre de grasa que proviene de leche de vaca se caracteriza por:

contacto del material proteínico líquido libre de grasa que proviene de leche de vaca, material que tiene un pH de 2 a 8, a una temperatura por debajo de 65°C, con una resina de adsorción, siendo la relación en peso del material proteínico para ser tratado a resina de adsorción de 100:1 como máximo,

combinación del tratamiento con la citada resina con al menos un tratamiento de ultra- y dia-filtración del material proteínico, y

si es necesario, concentración del material líquido así obtenido hasta un concentrado de proteína y opcionalmente secado hasta polvo.

La separación de grasa y caseína de la leche da por resultado un suero que contiene proteínas del suero. De la proteína total de la leche, aproximadamente un 20 por ciento es proteína de suero y el resto caseína. El suero obtenido en la producción del queso se conoce como suero del queso y el suero obtenido en la producción de caseína es a su vez conocido como suero de caseína.

La mejor utilización de la invención es para tratamiento de suero. El suero utilizado en la invención puede ser cualquier suero proveniente de la leche de vaca, tal como suero de queso, suero de caseína de cuajo, suero de caseína ácido o suero de caseína agrio. El suero es, preferiblemente suero de queso.

El material proteínico que se origina de la leche de vaca puede ser suero ultra- y dia-filtrado, es decir, un concentrado de proteína de suero. En este caso, el volumen de líquido que se va a tratar con resina es más pequeño y el grado de separación de insulina bovina es aproximadamente el mismo que en el tratamiento de suero.

Además de los anteriores, en la invención se puede utilizar leche desnatada o una solución acuosa hecha de leche en polvo sin grasa o una solución acuosa hecha de caseína de leche, es decir, una solución de caseína, como el material proteínico libre de grasa proveniente de leche de vaca. Sin embargo, en este caso el grado de separación de insulina bovina no es del mismo orden que en el tratamiento de suero.

De acuerdo con la invención, se separa la insulina bovina desde un material proteínico libre de grasa que deriva de leche de vaca, preferiblemente de suero o un concentrado de proteína de suero, por contacto del material a tratar con una resina de adsorción. Una resina de adsorción a base de estireno o a base de compuesto acrílico, que es preferiblemente microporosa, es la resina de adsorción a la que se une la insulina bovina. Las resinas de adsorción adecuadas incluyen Dowex XUS 40285,00 (tamaño de poro de aproximadamente 50 Å; fabricante: Dow Inc. Alemania) y Amberlite XAD 7 (tamaño de poro entre 450 y 500 Å; fabricante: Rhm & Haas, Francia).

El tratamiento con resina de adsorción se puede llevar a cabo ya sea haciendo pasar el material proteínico que se va a tratar a través de una columna rellena con una resina de adsorción, o por contacto del citado material proteínico con una resina de adsorción en un recipiente de mezclado. En el tratamiento con resina de adsorción, el pH es de 2 a 8, adecuadamente 4 a 6,7, y la temperatura por debajo de 65°C, normalmente 2 a 30°C, y adecuadamente 2 a 10°C.

Cuando se lleva a cabo el tratamiento con resina de adsorción en una columna, la columna se rellena con una resina de adsorción, que es regenerada adecuadamente con NaOH y HCl. El material proteínico que se va a tratar se hace pasar a través de una columna, rellena con resina de adsorción, a una velocidad de flujo de 1 a 20 volúmenes de columna (BV)/h, siendo adecuada una velocidad de flujo de 6 a 8 BV/h. La relación en peso del material proteínico que se va a tratar en el citado tratamiento de resina a resina de adsorción es como máximo 100:1, adecuadamente 10:1 a 40:1.

Cuando el tratamiento con resina de adsorción se lleva a cabo en un recipiente de mezclado, se introducen la resina de adsorción regenerada de la manera antes descrita y el material proteínico que se va a tratar en el recipiente de mezclado en el cual se ponen en contacto entre sí, adecuadamente bajo mezclado suave. La relación en peso del material proteínico a tratar en el citado tratamiento de resina a resina de adsorción es de casi 100:1, adecuadamente 10:1 a 40:1, y la duración del contacto es inferior a 2 horas, adecuadamente 60 minutos.

Con el anterior tratamiento de adsorción de resina se combina al menos un tratamiento de ultra o dia-filtración del material proteínico líquido libre de grasa proveniente de leche de vaca. Con la ultra- y dia-filtración, el material líquido se puede concentrar para secarlo o para someterlo a otro tratamiento, pero, simultáneamente, la ultra- y dia-filtración se pueden utilizar para completar la separación de insulina bovina del material a tratar. En la ultra- y dia-filtración se emplean membranas semipermeables de interceptación de 5.000 a 25.000 D, adecuadamente membranas de interceptación de 10.000 D. Los materiales de membrana adecuados para ultrafiltración incluyen polisulfona, poliétersulfona y materiales recubiertos hidrofílicamente.

El grado de separación de insulina obtenido por ultra- y dia-filtración aumenta a medida que se eleva la relación de concentración. Para cada caso particular se selecciona una relación de concentración apropiada.

El suero u otro material de partida diluido se puede concentrar mediante las mencionadas ultra- y dia-filtración hasta obtener un concentrado de proteína de suero u otro material de partida concentrado, respectivamente, antes del tratamiento con resina de adsorción antes mencionado. Por otra parte, la ultra y dia-filtración se puede llevar a cabo después del tratamiento de resina de adsorción previamente mencionado, obteniéndose un concentrado de proteína que se puede secar hasta un polvo, mediante pulverización o liofilización.

En el tratamiento del material de partida, la relación de concentración total puede ser, por ejemplo, aproximadamente 24 (relación de concentración primero 6 y después 4), pero en la concentración del material hasta un concentrado de proteína, la relación de concentración total puede ser, por ejemplo, aproximadamente 120 (relación de concentración primero 10 y después 12).

En un modo de realización preferido del método de la invención, se lleva a cabo ultra y dia-filtración antes y/o después del tratamiento de resina de adsorción.

Antes del contacto con una resina de adsorción, el material proteínico líquido libre de grasa proveniente de leche de vaca, preferiblemente suero, se puede tratar previamente por clarificación a una temperatura por debajo de 65°C, adecuadamente por microfiltración, ultrafiltración o centrifugación. Dicho pre-tratamiento se lleva a cabo preferiblemente por filtración del material que se va a tratar, a través de membranas de microfiltración, siendo las membranas de 0,05 a 1,4 micras, preferiblemente membranas de 0,1 micras. En este caso se puede separar, en particular desde el suero, el polvo de caseína o las proteínas del suero desnaturalizadas, que opcionalmente están presentes, y junto con lo cual hay una parte de proteínas macromoleculares a las que va frecuentemente unida la insulina. En la ultrafiltración se pueden utilizar a su vez membranas con un valor de interceptación de 50.000 a 200.000 D, siendo preferiblemente la velocidad de rotación en la centrifugación entre 1.000 y 10.000 revoluciones por minuto.

El tratamiento de clarificación rebaja también ligeramente el contenido de insulina bovina del material que se trata. El contenido de insulina bovina del suero, por ejemplo, decrece en 6 a 10% en el tratamiento de clarificación antes mencionado.

En el modo de realización de la invención más preferido, el suero se trata con resina de adsorción y este tratamiento de resina se combina con un tratamiento de ultra y día filtración que se lleva a cabo antes o después del tratamiento con resina. Se han hecho estudios que han demostrado que el anterior procedimiento daba lugar a la separación de insulina bovina del suero por tratamiento de suero de queso o suero de caseína con una resina de adsorción, tal como
 5 Dowex XUS 40285,00 (Dow Inc., Alemania) o Amberlite XAD 7 (Rohm & Haas, Francia). Por tratamiento del suero a pH 2 a 8 a través de resina de adsorción regenerada con NaOH y HCl, la insulina se unía a la resina. El suero así tratado se ultrafiltró a pH 6,5 hasta un concentrado de proteína de suero que se hizo evaporar y se secó hasta un polvo. El tratamiento se llevó a cabo también por realizar primero una ultra- y día-filtración del suero y tratando entonces el contenido de proteína obtenido por la resina de adsorción. En el tratamiento, el contenido de insulina del suero se
 10 reducía de 21 a 3 ng/g de proteína, definido por el ensayo RIA, es decir, aproximadamente 85% respecto de la proteína.

El suero tratado de la manera anterior producía una preparación de proteína de suero que, con respecto a la insulina bovina, era crucialmente más puro que la correspondiente formulación en polvo para niños pequeños convencional (aproximadamente 22 a 30 ng/g de proteína), leche en polvo (aproximadamente 30 ng/g de proteína) o polvo de
 15 proteína de suero ultra o diafiltrado (contenido en proteína 70 a 80%) (15 a 25 ng/g de proteína). La preparación de proteína de suero sustancialmente libre de insulina bovina así obtenida es adecuada para su utilización como materia prima y única fuente de proteína en formulaciones para niños pequeños, dado que, nutricionalmente, la proteína de suero es de calidad extremadamente alta y no necesita otras proteínas para completar el valor nutritivo. Además, el material proteínico sustancialmente libre de insulina bovina obtenido según la invención es adecuado para su
 20 utilización como materia prima y parte proteínica de diversas preparaciones nutricionales especiales, diversas bebidas lácteas, tales como leche de consumo y varias otras preparaciones lácteas, tales como helados, yogur y queso.

Convencionalmente las formulaciones para niños pequeños, los primeros productos a base de leche de vaca consumidos por los niños pequeños están compuestas de leche, nata, aceite vegetal, suero en polvo bajo en sal, minerales
 25 y vitaminas, de los que la leche, nata y suero en polvo bajo en sal contienen insulina bovina.

El método de la invención permite la reducción substancial del contenido de insulina bovina en las formulaciones para niños pequeños y en otras preparaciones nutritivas especiales a base de leche de vaca, bebidas lácteas y otras preparaciones lácteas, y en sus materiales de partida.

El método de la invención para la preparación de una formulación para niños pequeños que está sustancialmente libre de insulina u otra preparación nutritiva especial o leche de consumo, otra bebida láctea u otra preparación láctea o su materia prima, se caracteriza por el empleo de material proteínico libre de grasa, libre de insulina, proveniente de
 30 leche de vaca y se prepara por el método de la invención como la parte proteínica en la producción de un producto.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

40 (Comparativo)

Separación de insulina bovina a partir de suero mediante una resina de adsorción microporosa a base de poliestireno, Dowex XUS 40285,00 a pH 5,8

45 La resina de adsorción XUS 40285.00 se regeneró con NaOH al 2% + HCl al 2%, se lavó hasta neutralidad y se colocó como empaquetamiento de una columna de 20 ml. Se hicieron pasar 20 volúmenes de columna (BV), es decir, 400 ml de suero de queso fresco a través de la columna a un pH 5,8.

En el tratamiento se separó el 45% de la insulina bovina del suero. El rendimiento en proteína en el tratamiento era del 93%, es decir, el contenido de insulina decrece en un 42% respecto a la proteína.

Ejemplo 2

(Comparativo)

55 *Separación de insulina bovina del suero con la resina de adsorción XUS 40285,00 a valores del pH 4, 5,8 y 6,4*

La resina de adsorción XUS 40285 se regeneró con NaOH al 2% + HCl al 2% y se lavó hasta neutralidad. Se introdujeron 145 ml de suero de queso ajustado a un valor de pH de 4, 5,9 o 6,4 y 25 ml de resina en un matraz
 60 Erlenmeyer colocado en una sacudidora. Al cabo de 60 minutos de agitación por sacudida se separó la resina desde el suero y se determinó el contenido de insulina bovina del suero por un ensayo RIA.

En el tratamiento, se separaron 57% de insulina bovina a pH 4,0, 71% a pH 5,8 y 58% a pH 6,4. El rendimiento en proteína fue del 69% a pH 4,0, 66% a pH 5,8 y 63% a pH 6,4, es decir en relación con la proteína, el contenido de insulina había decrecido 39%, 47% y 37%, respectivamente. El ensayo muestra que la insulina bovina se puede
 65 separar del suero mediante una resina de adsorción dentro de un amplio intervalo de pH.

ES 2 241 364 T5

Ejemplo 3

(Comparativo)

5 Separación de insulina bovina del suero con una resina acrílica macroporosa de adsorción, Amberlite XAD 7

La resina de adsorción XAD 7 se regeneró con NaOH al 4% + HCl al 0,09%, se lavó hasta neutralidad y se colocó como empaquetamiento en una columna de 20 ml. Se hicieron pasar a través de la columna 20 volúmenes de columna (BV), es decir 400 ml de suero de queso fresco, a pH 6,4.

En el tratamiento se separaron 76% de la insulina bovina. El rendimiento en proteína en el tratamiento fue de 90%, es decir, el contenido de insulina había decrecido 68% en relación con la proteína.

Ejemplo 4

15 Separación de insulina bovina de un concentrado de proteína bovina mediante resina de adsorción XUS 40285.00 a pH 5,8

La resina de adsorción XUS 40285,00 se regeneró con NaOH al 4% + HCl al 0,09%, se lavó hasta neutralidad y se colocó como empaquetamiento en una columna de 20 ml. Se hicieron pasar 20 volúmenes de columna (BV), es decir 400 ml de un concentrado de proteína de suero microfiltrado (1.4 micras) (5% de materia seca, 32% de proteína de la materia seca) a través de la columna a pH 5,8. En el tratamiento, se separó el 46% de la insulina bovina del concentrado de proteína de suero. El rendimiento de proteína en el tratamiento era de 98%, es decir, el contenido de insulina había decrecido 45% en proporción con la proteína.

Ejemplo 5

30 Separación de insulina bovina de un concentrado de proteína de suero con una resina de adsorción macroporosa a base de compuesto acrílico, Amberlite XAD 7

La resina de adsorción XAD 7 se regeneró con NaOH al 4% + HCl al 0,09%, se lavó hasta neutralidad y se colocó como empaquetamiento de una columna de 20 ml. Se hicieron pasar 20 volúmenes de columna (BV), es decir, 400 ml de un concentrado de proteína de suero fresco (contenido de proteína del 2%) a través de la columna a pH 6,4.

En el tratamiento, se separaron 86% de insulina bovina del concentrado de proteína del suero. El rendimiento de proteína en el tratamiento era de 85%, es decir, el contenido de insulina había decrecido 73% en relación con el de proteína.

Ejemplo 6

(Comparativo)

45 Separación de insulina bovina de leche desnatada mediante una resina de adsorción Amberlite XAD 7 a pH 6,7

La resina de adsorción XAD 7 se regeneró con NaOH al 4% + HCl al 0,09%, se lavó hasta neutralidad y se colocó como empaquetamiento de una columna de 20 ml. Se hicieron pasar 20 volúmenes de columna (BV), es decir, 400 ml, de leche desnatada (materia seca 9%, proteína 35% de la materia seca) a través de la columna a pH 6,7.

En el tratamiento, se separó 40% de la insulina bovina en relación con la proteína. El ensayo muestra que la insulina bovina se puede separar también a partir de la leche, pero el grado de separación de insulina es más bajo que en el tratamiento de suero.

Ejemplo 7

(Comparativo)

55 Separación de insulina bovina desde una solución de caseína con la resina de adsorción Amberlite XAD 7 a pH 6,7

La resina de adsorción XAD 7 se regeneró con NaOH al 4% + HCl al 0,09%, se lavó hasta neutralidad y se colocó como empaquetamiento de una columna de 20 ml. Se hicieron pasar 20 volúmenes de columna (BV), es decir 400 ml, de solución de caseinato de sodio (3% de materia seca, 89% de proteína de la materia seca), a través de la columna a pH 6,7.

En el tratamiento, se separaron 50% de la insulina bovina.

ES 2 241 364 T5

Ejemplo 8

Se sometieron a ultra- y dia-filtración 14 litros de suero de queso fresco a 40°C empleando membranas GR81PP (membranas de interceptación de 6.000 D) con un ultrafiltro Labstack a una relación de concentración de 6, se diluyó al volumen inicial y volvió a filtrar a una relación de concentración de 4, es decir, la relación de concentración total era 24. Se determinó el contenido de insulina bovina por el ensayo RIA y se ensayó el contenido de proteína del suero de partida y el concentrado de proteína del suero obtenido como resultado final. El suero de partida contenía 21,2 ng de insulina bovina por gramo de proteína, y el concentrado de proteína del suero obtenido después de ultra- y dia-filtración contenía 14,8 ng de insulina por gramo de proteína.

Según esto, la ultra- y dia-filtración reducía el contenido de insulina bovina en un 30% respecto a la proteína.

Ejemplo 9

(Comparativo)

Se disolvieron, en 60 litros de agua (50°C), 5.040 kg de proteína de suero en polvo obtenida de suero tratado según el Ejemplo 1, 11,423 kg de una mezcla de grasa vegetal, 11,232 de lactosa purificada, 12.260 kg de maltodextrina (DE 21), 135 g de una premezcla de vitaminas y minerales (que contenía vitaminas A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido fólico, ácido pantoténico, biotina, ácido ascórbico, colina, inosita, gluconato ferroso, sulfato de zinc, sulfato de manganeso, selenito de sodio, gluconato de cobre), y 70 gramos de cloruro de calcio, 300 gramos de fosfato de calcio, 65 gramos de sulfato de magnesio, 125 gramos de cloruro de sodio y 620 gramos de citrato de potasio en 60 litros de agua (50°C). El contenido en materia seca de la mezcla era de aproximadamente 40%.

La mezcla así obtenida se llevó a una homogeneizadora (150/50 bar) y se secó hasta polvo en un secador de pulverización a temperaturas de secado de 180/75°C sobre lecho fluidizado a 70/120/30°C. La composición, aspecto y sabor del producto eran iguales a los de una formulación en polvo convencional para niños pequeños.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de separación de insulina bovina desde un material proteínico líquido libre de grasa proveniente de leche de vaca, **caracterizado** por
- 10 contacto del material proteínico líquido libre de grasa conteniendo insulina bovina proveniente de leche de vaca, material que tiene un pH 2 a 8, a una temperatura de menos de 65°C, con una resina de adsorción microporosa a base de estireno o a base de compuesto acrílico, donde la relación de pesos del material proteínico que se va a tratar a resina de adsorción es como máximo 100:1, y
- combinación con el citado tratamiento de resina de al menos un tratamiento de ultra- y dia-filtración del material proteínico, y
- 15 si es necesario, concentración del material líquido así obtenido hasta un concentrado de proteína y secado opcional hasta polvo.
- 20 2. Un método según la reivindicación 1, **caracterizado** por la utilización de suero, concentrado de proteína de suero, leche desnatada o una solución de caseína, preferiblemente suero, como material proteínico líquido libre de grasa conteniendo insulina bovina proveniente de leche de vaca.
3. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque la relación en peso del material proteínico que se va a tratar a resina de adsorción es, adecuadamente, de 10:1 a 40:1.
- 25 4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por la introducción del material proteínico a través de una columna, rellena con una resina de adsorción, a una velocidad de flujo de 1 a 20 volúmenes de columna (BV)/h, adecuadamente 6 a 8 BV/h, a una temperatura de 2 a 30°C, adecuadamente 2 a 10°C.
- 30 5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el contacto del material proteínico con la resina de adsorción a una temperatura de 2 a 30°C, adecuadamente 2 a 10°C, en una vasija de mezclado, siendo el tiempo de contacto bajo mezclado suave por debajo de 2 horas, adecuadamente 60 minutos.
- 35 6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por la ultra- y dia-filtración del material proteínico líquido libre de grasa conteniendo insulina bovina proveniente de la leche de vaca utilizando membranas de una interceptación de 5.000 a 25.000 D, antes de poner en contacto el material proteínico con la resina de adsorción y/o después del tratamiento con resina de adsorción.
- 40 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** por el pre-tratamiento del material proteínico líquido libre de grasa conteniendo insulina bovina proveniente de leche de vaca, antes de ponerlo en contacto con la resina de adsorción, por clarificación del mismo, adecuadamente, por microfiltración, ultrafiltración o centrifugación, preferiblemente por filtración a través de membranas de microfiltración de 0,05 a 1,4 micras, preferiblemente membranas de 0,1 micras.
- 45 8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado** porque se concentra el material líquido, tratado con resina de adsorción, por ultra- y dia-filtración utilizando membranas de interceptación de 5.000 a 25.000 D, adecuadamente membranas de interceptación de 10.000 D, a un concentrado de proteína, que se seca opcionalmente hasta un polvo, adecuadamente por pulverización o liofilización.
- 50
- 55
- 60
- 65