

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 197**

51 Int. Cl.:

G01N 21/35 (2006.01)

G01N 33/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2007 E 07788829 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2032966**

54 Título: **Método de determinación de la calidad nutricional de los lípidos de la leche**

30 Prioridad:

07.06.2006 FR 0605075

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

17.04.2013

73 Titular/es:

**VALOREX (100.0%)
LA MESSAYAIS
35210 COMBOURTILLE, FR**

72 Inventor/es:

CHESNEAU, GUILLAUME

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 401 197 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

Método de determinación de la calidad nutricional de los lípidos de la leche.

5 La invención se refiere a un método de determinación de la calidad nutricional de los lípidos de la leche, en el que se considera un número determinado de muestras de leche de referencia, se determina, para cada una de estas muestras de referencia, un perfil de ácidos grasos y un espectro infrarrojo obtenido por reflexión sobre la muestra de referencia de una radiación en el infrarrojo, y se asocian respectivamente los perfiles de ácidos grasos a los espectros infrarrojos, se somete la leche a analizar, de la cual se quiere determinar la calidad nutricional de los lípidos, a una radiación infrarroja para, mediante reflexión, deducir un espectro infrarrojo, y se compara el espectro infrarrojo con los obtenidos con los espectros infrarrojos de las muestras de referencia, para deducir un perfil de ácido graso de la leche a analizar.

15 El método se basa por lo tanto en el emparejamiento, o la asociación, de un ácido graso y de una longitud de onda en el infrarrojo que corresponde a la radiación reflejada por el ácido considerado, y que traduce por lo tanto su existencia.

20 Los productos lácteos son la primera fuente cuantitativa de lípidos en las dietas del ser humano. En forma de mantequilla, queso, bebida láctea y otros productos frescos, los productos lácteos aportan, en Francia por ejemplo, más de 30 g de ácidos grasos de un total de 100 g por adulto y por día.

25 Sin embargo, la materia grasa láctea no tiene una muy buena reputación en nutrición humana y experimenta desde hace muchos años una disminución de consumo. Los industriales lácteos buscan continuamente unas vías de valorización y de diferenciación que les llevan, hoy en día, a interesarse por la calidad de su materia grasa.

A diferencia de los aceites vegetales, que contienen una veintena de ácidos grasos mayores diferentes, las materias grasas lácteas están compuestas de un número muy grande de ácidos grasos diferentes.

30 Se conocen cerca de 400 ácidos grasos diferentes en los lípidos de la leche. Las proporciones relativas de estos ácidos grasos son extremadamente variables en función de numerosos parámetros: la raza de las vacas, el individuo, la temporada, el estado de lactancia, el número de parto de la vaca y sobre todo, la alimentación de las vacas.

35 Los dos ácidos grasos más importantes de la leche son un ácido graso saturado: el ácido palmítico (C16:0), y un ácido graso insaturado: el ácido oleico (C18: 1 n-9). Estos dos ácidos grasos representan aproximadamente el 50% de los ácidos grasos de la leche. Sus proporciones en los ácidos grasos totales son extremadamente variables. El ácido palmítico representa del 18 al 45% de los ácidos grasos totales. El ácido oleico representa del 12 al 35% de los ácidos grasos totales.

40 Aparte de estos dos ácidos grasos, la leche contiene también:

- a. unos ácidos grasos saturados de cadena corta (número de átomos de carbono de la cadena comprendido entre 2 y 10);
- 45 b. unos ácidos grasos saturados de cadena mediana: ácido láurico (C12:0) y ácido mirístico (C14:0);
- c. unos ácidos monoeno cis y trans (principalmente el ácido vaccénico C18:1 trans 11)
- 50 d. unos ácidos grasos conjugados (principalmente el CLA cis9 trans 11);
- e. unos ácidos grasos ramificados;
- f. unos ácidos grasos poliinsaturados de la familia omega 3 (principalmente el ácido alfa-linolénico C18:3 n-3);
- 55 g. unos ácidos grasos poliinsaturados de la familia omega 6 (principalmente el ácido linoleico C18:2 n-6).

60 La gran variedad y la gran dispersión de composición de los ácidos grasos de la leche, por un lado, y la importancia cuantitativa del consumo de los lípidos de la leche, por otro lado, hacen muy importante la evaluación de la calidad nutricional de los lípidos de la leche.

Para los nutricionistas, no existen buenos o malos ácidos grasos en las dietas del ser humano, sino sólo unos ácidos grasos en exceso y otros en defecto. Todas las guías nutricionales están de acuerdo en recomendar:

- a. un aumento del consumo de ácido oleico (C18: 1 n-9),
- 65 b. un aumento del consumo de ácido alfa-linolénico (C18: 3 n-3),
- c. una limitación del consumo de ácido palmítico (C16: 0),

- d. una limitación del consumo de ácido linoleico (C18: 2 n-6),
- e. un aumento de la relación C18: 1 n-9/C16: 0,
- f. una disminución de la relación C18: 2 n-6/C18: 3 n-3.

5 Unos efectos interesantes estarían atribuidos también al consumo de ácidos grasos conjugados (CLA cis 9 trans 11).

Parece por lo tanto muy interesante poder evaluar de manera rápida y completa la calidad nutricional de los lípidos de la leche, a través de su perfil en ácidos grasos.

10 Esta evaluación es muy difícil por numerosas razones:

- a. número de ácidos grasos de la leche a medir,
- 15 b. gran variación de la composición en ácidos grasos (por ejemplo los valores medidos para el ácido alfa-linolénico omega 3 van del 0,1% al 2% según las leches),
- c. dificultades y coste de las técnicas analíticas empleadas (cromatografía en fase gaseosa).

20 El estado de la técnica en la técnica se ilustra mediante los documentos US-A-2005/0250212, US-A-5.343.044 y US-A-5.252.829.

La presente invención tiene por objeto principal un método de determinación de la calidad nutricional de los lípidos de la leche, en el que:

- 25 - se considera un número determinado de muestras de leche de referencia, y se determina, para cada una de estas muestras de referencia, un perfil de ácidos grasos y un espectro infrarrojo obtenido por reflexión sobre la muestra de referencia, de una radiación en el infrarrojo;
- se asocian respectivamente los perfiles de ácidos grasos con los espectros infrarrojos;
- 30 - se somete una leche a analizar, de la cual se quiere determinar la calidad nutricional de los lípidos, a una radiación infrarroja para, por reflexión, deducir un espectro infrarrojo, y se compara el espectro infrarrojo obtenido con los espectros infrarrojos de las muestras de referencia, para deducir un perfil de ácido graso de la leche a analizar,

35 que consiste en

- utilizar la radiación infrarroja en el intervalo de longitud de onda 2500 - 10000 nm;
- 40 - limitar la determinación del perfil de ácidos grasos de la leche a analizar por tratamiento infrarrojo a ciertos ácidos grasos de calibración satisfactoria; y
- deducir por predicción el contenido de algunos otros ácidos grasos a partir del de los ácidos grasos determinado por tratamiento infrarrojo.

45 Según unas características ventajosas y no limitativas de este procedimiento:

- se crea una base de datos por determinación de los espectros infrarrojos de un número elevado de muestras de leche de referencia que presentan un perfil de ácidos grasos conocido y determinado por cromatografía en fase gaseosa (CPG).
- 50 - se ha creado la base procediendo a ácido graso por ácido graso.
- la base se ha creado con, para cada uno de los ácidos grasos, una pluralidad de muestras de referencia de contenido determinado por CPG.
- 55 - la base de datos comprende una pluralidad de conjuntos de cuatro elementos que comprenden un ácido graso, su contenido, la longitud de onda y una potencia de calibración.

60 **Modelo de determinación de la composición en ácidos grasos de los lípidos de la leche**

a. Introducción

65 La determinación del perfil en ácidos grasos de los lípidos de la leche se efectúa mediante el método de cromatografía en fase gaseosa (CPG). Permite separar unas mezclas gaseosas tras un equilibrio entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria. El método se refiere a unas moléculas volátiles naturalmente, pero también a

unas moléculas que se llevan a unas temperaturas que no provocan su descomposición.

Cronológicamente, el método se basa en:

- 5
- 1- una etapa de extracción de la materia grasa,
 - 2- una preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos,
 - 3- un análisis por cromatografía en fase gaseosa de estos ésteres metílicos de ácidos grasos.

10 La duración y el coste de este método de determinación la hacen difícilmente operacional para los industriales lácteos que buscan una valorización de la materia grasa láctea por su calidad nutricional.

Es así como se ha pensado en un método tan fiable, pero mucho más rápido y menos oneroso: el análisis infrarrojo.

15 b. Material

El material infrarrojo con transformada de Fourier (I.R.T.F.) permite una definición espectral en el infrarrojo.

20 El material I.R.T.F. que opera en el infrarrojo próximo, a unas longitudes de ondas de 1000 a 2500 nm, se puede utilizar para la determinación de perfiles de ácidos grasos de diferentes aceites o alimentos sólidos. Adolece sin embargo de dos inconvenientes principales:

- el método es impreciso y carente de resolución, ya que las longitudes de ondas, características de diferentes ácidos grasos, coinciden;
- 25 - está mal adaptado a unos productos líquidos, para los cuales se necesita un perfecto dominio de la temperatura.

30 Más allá de la cromatografía en fase gaseosa y del análisis en el infrarrojo próximo, la solicitante propone por lo tanto ahora un análisis en el infrarrojo medio, a unas longitudes de ondas de 2500 a 10000 nm.

Es una evolución audaz, ya que el análisis por infrarrojos no era satisfactorio.

35 El método de determinación de un modo de realización preferido de la invención consiste, en primer lugar, en crear una base de datos determinando los espectros infrarrojos de un número elevado de muestras de leche de referencia que presentan un perfil de ácidos grasos conocido y determinado mediante el método de cromatografía en fase gaseosa.

40 En otras palabras, en un modo de realización preferido de la invención, la solicitante ha considerado un gran número de muestras de leche de referencia y ha procedido ácido graso por ácido graso.

45 En un modo de realización preferido de la invención, para cada ácido graso, se ha tomado una pluralidad de muestras de referencia con un contenido determinado por CPG. Se han bombardeado estas muestras con una radiación IR media y se ha obtenido por reflexión tantos espectros como muestras de leche de referencia hay en el ácido graso considerado. Estos espectros coinciden en un punto -o una pequeña zona de longitudes de onda- que corresponde a la longitud de onda del ácido graso considerado.

50 Proceder así para todos los ácidos grasos seleccionados consiste en contrastar o calibrar el método de determinación. Cuanto más pequeñas y asimilables son las zonas de solapamiento de los espectros en un punto, más potente y precisa es la calibración.

En un modo de realización preferido de la invención, la base de datos está constituida por una pluralidad de conjuntos de cuatro elementos (ácido graso, contenido, longitud de onda, potencia de calibración). El contenido puede ser el porcentaje molecular entre el ácido graso considerado y el total de los ácidos grasos.

55 Incidentalmente, la solicitante ha utilizado como material IRTF el aparato FT 6000 de la compañía Foss. Está bien adaptado a la leche y presenta una buena estabilidad.

60 La medición se efectúa por análisis de la señal de transmisión infrarroja media a través de la muestra situada en una célula de medición. El sistema óptico aceptado está constituido por un interferómetro de Michelson. La señal global obtenida se descompone después por transformada de Fourier para obtener el espectro completo de absorción de la muestra.

65 Este espectro está relacionado directamente con la composición química global de la muestra, y por lo tanto no es específica de tal o cual molécula, a pesar de que existen en el campo infrarrojo medio unas zonas de absorción específicas de las uniones C-H, C=O, C-OH o N-H, características de la química orgánica presente en la muestra.

El desarrollo consiste por lo tanto en buscar en los espectros el peso de las absorciones de cada una de las longitudes de onda que permiten definir el ácido graso estudiado.

Se concibe que la calidad de una calibración infrarroja, para analizar nuevas muestras de leche, es decir para determinar la calidad nutricional de sus lípidos, depende en gran medida de la calidad de la base de datos utilizada para ello. Ésta depende del número y de la representatividad de las muestras que la componen así como de la calidad de los valores obtenidos para los compuestos buscados por el método de referencia. Además, este banco de datos debe recubrir todo el intervalo de medición considerado y las muestras de referencia deben representar todas las matrices diferentes que podrán ser sometidas al ensayo.

La base de datos realizada por la solicitante comprende cerca de 150 muestras de leche de referencia procedentes de zonas de cría (oeste, este, norte y sur de Francia), de rebaños lecheros (razas, genética, nivel de producción, etc.), de estación (primavera, invierno) y de sistemas de racionamiento (ración completa, semi-completa) y de alimentación (ensilado de maíz, hierba de pasto, ensilado de hierba, hierba encintada, heno, alfalfa, concentrados energéticos y proteicos, fuente de aporte lipídico) muy variados, sistemas representativos de todos los modos de producción y teniendo en cuenta todos los factores de variación de la calidad de los lípidos de la leche.

Estas muestras de referencia, tratadas en el infrarrojo medio, producen unos espectros característicos en una longitud de onda dada o en una banda suficientemente estrecha para ser bien distinguida de las demás.

La solicitante, teniendo en cuenta los propósitos anteriores, se ha dado cuenta por tanto de que la potencia, o la precisión, de la calibración variaba de un ácido graso a otro, de que podía ser satisfactoria para uno y no para otro. Así, para el ácido palmítico C16:0, con suficientes muestras, la precisión de la calibración puede alcanzar el 90%, incluso superarlo, pero no para los ácidos grasos de la familia omega 3.

Es por ello que la solicitante, al darse cuenta también de que las proporciones de los diversos ácidos grasos estaban correlacionadas entre sí, ha considerado también aprovecharse de esta correlación para definir unas ecuaciones de predicción en regresión por ejemplo lineal, y determinar así el contenido de algunos ácidos grasos del de otros ácidos grasos determinados por tratamiento infrarrojo con una mejor precisión, y por lo tanto limitar a ciertos ácidos grasos de calibración satisfactoria, la determinación del perfil de ácido graso de la leche a analizar mediante tratamiento infrarrojo.

Se presenta a continuación un ejemplo de determinación de la composición de una muestra de leche en ácidos grasos (AG) menores predichos estadísticamente por regresión a partir de la determinación en ácidos grasos mayores por tratamiento infrarrojo.

La determinación se propone a partir de la tabla de las ecuaciones de predicción siguiente, en la que

AGS representa los ácidos grasos saturados,
 AGI representa los ácidos grasos insaturados
 AGPI representa los ácidos grasos poliinsaturados,
 AGMI representa los ácidos grasos monoinsaturados, y
 r representa la precisión de resultado (coeficiente de correlación).

Ecuaciones de predicción

AGS + AGI = 100	r=1,00
AGPI + AGMI = AGI	r=1,00
AGMI = 0,672 + 0,852 * AGI	r=0,98
C14:0=18,284-0,256*C18:1 totales	r=0,80
C16:0=35,35+0,231*AGS-0,587*AGI	r=0,87
C18:1 totales=1,032*AGMI-5,157	r=0,98
C18:1 cis totales=0,76*C18:1 totales+0,646*AGMI-0,554*AGI+2,512	r=0,98
C18:1 cis 9=1,143*C18:1 cis ttx-0,204*AGI-0,031*C18 :1 ttx+2,028	r=0,99
C18:1 totales=C18:1 cis totales + C18:1 trans totales	r=1,00
C18:3=0,005*AGI+0,193*AGPI-0,01*C16:0-0,029 (Cuando C16:0 > 25,5%)	r=0,86
C18:3=11,917 e ^(-0,1041C16:0) (Cuando C16:0 < 25,5%)	r=0,83
CLA:cis9 trans11=0,366*AGPI-0,381*C18:3-0,364	r=0,78
C18:1 trans ttx=0,477*CLA cis9 trans11-0,043*AGS+1,362*C18 :1 trans11+3,428	r=0,96
C18:2=0,657*AGPI-0,718*C18 :3-0,006*AGI-0,477*CLA cis9 trans11+0,292	r=0,80
C18:1 trans 11=2,319*CLA cis9 trans11+0,409*C18 :3-0,109*AGPI+0,034	r=0,94
C18:1 trans 10=0,438*C18 :1 trans ttx+0,091*CLA cis9 trans 11-0,556*C18 :1 trans11-0,114	r=0,94

Se han verificado y validado los diferentes parámetros de predicción de la tabla anterior entre los diferentes ácidos grasos de la leche con respecto a los mecanismos conocidos de síntesis de los ácidos grasos de la leche en la panza y en la ubre de las vacas.

Ejemplo de determinación de la calidad nutricional de los lípidos de leche

- 5 1. Determinación por tratamiento infrarrojo de los ácidos grasos saturados (AGS) de la leche,
 2. Determinación mediante diferencia de los ácidos grasos insaturados (AGI) de la leche $AGI = 100 - AGS$
 3. Determinación predictiva por regresión lineal de los ácidos grasos mono-insaturados (AGMI) de la leche:
 10 $AGMI=0,672+0,852*AGI$, con una precisión de resultado $r = 0,98$
 4. Determinación por diferencia de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) $AGPI = AGMI - AGI$.
 5. Determinación por tratamiento infrarrojo del C16:0 y de los C18:1 totales de la leche
 - 15 6. Determinación predictiva por regresión lineal del C14:0 de leche $C14:0=18,284-0,256*C18:1$ totales $r=0,80$
 7. Determinación predictiva por regresión lineal del C18:3 n-3 de la leche $C18:3=0,005*AGI+0,193*AGPI-0,01*C16:0-0,029$ $r=0,86$
 - 20 8. Determinación predictiva por regresión lineal del CLA c9 t11 (o CLA1) de la leche $CLA1=0,366*AGPI-0,381*C18:3-0,364$ $r=0,78$
 9. Determinación predictiva por regresión lineal del C18:2 n-6 de la leche $C18:2=0,657*AGPI-0,718*C18:3-0,006*AGI-0,477*CLA1+0,292$ $r=0,82$
 - 25 10. Determinación predictiva por regresión lineal del C18:0 de la leche $C18:0=0,146*AGI-0,006*C18:1$ totales $+2,041*C18:3+4,92$ $r=0,628$
 - 30 11. Determinación predictiva por regresión lineal del C18:1 t11 de la leche $C18:1$ *trans*11= $2,319*CLA1+0,409*C18:3-0,109*AGPI+0,034$ $r=0,94$
 12. Determinación predictiva por regresión lineal del C18:1 *cis* totales de la leche $C18:1$ *cis* totales= $0,76*C18:1$ totales $+0,646*AGMI-0,554*AGI+2,512$ $r=0,98$
 - 35 13. Determinación predictiva por regresión lineal del C18:1 *cis*9 de la leche $C18:1$ *cis*9= $1,143*C18:1$ *cis* ttx- $0,204*AGI-0,031*C18:1$ ttx $+2,028$ $r=0,99$
 - 40 14. Determinación predictiva por regresión lineal del C18:1 *trans* totales de la leche $C18:1$ *trans* ttx= $0,477*CLA1-0,043*AGS+1,362*C18:1$ *trans*11 $+3,428$ $r=0,96$
 15. Determinación predictiva por regresión lineal del C18:1 *trans*10 de la leche $C18:1$ *trans*10= $0,438*C18:1$ *trans* ttx $+0,091*CLA1-0,556*C18:1$ *trans*11- $0,114$ $r=0,94$
 - 45 Gracias a la técnica de análisis descrita anteriormente, es posible conocer rápidamente la calidad nutricional de los lípidos de la leche anteriores el mismo día de su producción.
- Los productores de leche y la industria láctea disponen así de una herramienta muy fiable, muy rápida y muy práctica de usar que permitirá acelerar el proceso de mejora de la calidad nutricional de los lípidos de la leche.
- 50

REIVINDICACIONES

1. Método de determinación de la calidad nutricional de los lípidos de la leche, en el que:

- 5
- se considera un número determinado de muestras de leche de referencia, y se determina, para cada una de estas muestras de referencia, un perfil de ácidos grasos y un espectro infrarrojo obtenido por reflexión sobre la muestra de referencia, de una radiación en el infrarrojo;
 - se asocian respectivamente los perfiles de ácidos grasos con los espectros infrarrojos;
- 10
- se somete una leche a analizar, de la cual se quiere determinar la calidad nutricional de los lípidos, a una radiación infrarroja para, por reflexión, deducir un espectro infrarrojo, y se compara el espectro infrarrojo obtenido con los espectros infrarrojos de las muestras de referencia, para deducir un perfil de ácido graso de la leche a analizar,

15 que consiste en

- utilizar la radiación infrarroja en el intervalo de longitud de onda 2500 - 10000 nm;
- limitar a ciertos ácidos grasos de calibración satisfactoria la determinación del perfil de ácidos grasos de la leche a analizar por tratamiento infrarrojo; y
- deducir por predicción el contenido de otros ácidos grasos a partir del de los ácidos grasos determinado por tratamiento infrarrojo.

25 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque se crea una base de datos mediante determinación de los espectros infrarrojos de un número elevado de muestras de leche de referencia que presentan un perfil de ácidos grasos conocido y determinado mediante cromatografía en fase gaseosa.

30 3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque se ha creado la base procediendo ácido graso por ácido graso.

35 4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque la base se ha creado con, para cada ácido graso, una pluralidad de muestras de referencia con contenido determinado por cromatografía en fase gaseosa.

5. Método según una de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado porque la base de datos comprende una pluralidad de conjuntos de cuatro elementos que comprenden un ácido graso, su contenido, la longitud de onda y una potencia de calibración.