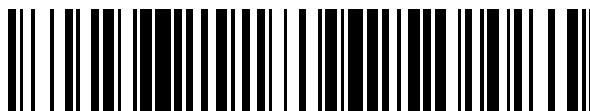


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 504**

51 Int. Cl.:

A23L 1/29 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2009 E 09815663 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2330925**

54 Título: **Fórmula nutricional acidificada**

30 Prioridad:

24.09.2008 EP 08165032

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

23.01.2014

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**KREB, NICO y
BREEUWER, PIETER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 439 504 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

Fórmula nutricional acidificada

5 La presente invención hace referencia a una fórmula nutricional acidificada con un sabor mejorado, y a un proceso de elaboración de tal fórmula nutricional.

Antecedentes de la materia

10 La leche materna se recomienda a todos los neonatos. No obstante, en algunos casos la lactancia materna es inadecuada, infructuosa o no recomendable por razones médicas, o la madre decide no alimentar al neonato con leche materna. Para estas situaciones, se han desarrollado fórmulas infantiles.

15 Generalmente, las fórmulas infantiles están disponibles en forma de polvos, en forma de líquido concentrado o en forma de líquido listo para tomar. Las fórmulas infantiles en polvo son la forma más popular; principalmente debido a su coste y a su calidad nutricional. La desventaja clave de las fórmulas infantiles en polvo es el inconveniente de su preparación. La fórmula en polvo debe servirse con cucharadas en un recipiente de bebida esterilizado, y entonces se vierte agua hervida y refrigerada en el recipiente de bebida para reconstituir la fórmula, el recipiente de bebida entonces se sella y se agita para asegurarse de que el polvo se ha disuelto. Para evitar el crecimiento bacteriano, la fórmula se debe consumir inmediatamente tras la reconstitución.

20 Si se prepara y se consume de este modo, las fórmulas infantiles en polvo se proporcionan como un buen sustituto seguro y nutricional de la leche materna en las situaciones descritas con anterioridad. No obstante, principalmente debido al inconveniente de la preparación, muchos padres o cuidadores no preparan las fórmulas adecuadamente y, por consiguiente exponen a los niños al riesgo de infección u otros riesgos. Por ejemplo, el agua puede no estar hervida antes de su utilización, en cuyo caso cualquier patógeno presente en el agua puede inocularse al niño. Habitualmente, las fuentes de agua de los países desarrollados son seguras pero esto puede no ocurrir en todo el mundo. Por otro lado, pueden prepararse lotes de fórmula infantil y almacenarse hasta que se necesiten. Desafortunadamente, si algún patógeno ha contaminado la fórmula, éste tendrá tiempo de replicarse.

25 Algunas bacterias patógenas que pueden causar diarrea infantil incluyen Escherichia coli, Salmonella y Shigella, por ejemplo. No obstante, los virus (rotavirus, calicivirus) y los parásitos protozoicos tales como Cryptosporidium también se asocian frecuentemente con la diarrea infantil. La alimentación con fórmula puede aumentar el riesgo de infecciones gastrointestinales si no se tienen en cuenta de manera escrupulosa las instrucciones para la reconstitución.

30 Un modo de abordar el problema es la adición de agentes antimicrobianos específicos, tal y como se realiza en la patente WO 96/25054. No obstante, debe evitarse el consumo de agentes antimicrobianos de forma regular en los niños dado el daño potencial a nivel hepático y, además, porque los agentes antimicrobianos a menudo presentan efectos secundarios indeseables.

35 Una forma efectiva y nutricionalmente segura de inhibir el crecimiento de bacterias en una fórmula infantil reconstituida es la acidificación. Se comercializan varias fórmulas infantiles en polvo que tienen un pH relativamente bajo cuando se elaboran, por ejemplo bajo las marcas registradas Pelargon®, Bionan® y Bioguigoz®. No obstante, el proceso mediante el cual se logra la acidificación consume muchos recursos económicos y tiempo: los ingredientes básicos de una fórmula infantil se fermentan con bacterias de ácido láctico hasta que se logra un pH específico, la fermentación se interrumpe, el líquido se pasteuriza y se procesa hasta formar un polvo. La fermentación debe controlarse cuidadosamente dado que, en sí, pueden proporcionarse posibilidades de crecimiento de bacterias patógenas y también de bacteriófagos que pueden interferir con el proceso de fermentación. Además, el pH de tales fórmulas no puede ajustarse con mucha precisión o con una fiabilidad estandarizada a un valor específico.

40 Recientemente, y tal y como se describe en la patente WO2004/054371, se ha desarrollado un proceso para la acidificación de composiciones nutricionales tales como fórmulas infantiles mediante la adición directa de ácido láctico L(+) con la intención de producir una composición en la que, cuando se reconstituye para su consumo, ésta presenta un pH de entre 3,5 y 6, preferiblemente entre 3,5 y 5,5, más preferiblemente de entre 4,0 y 5,3, aún más preferiblemente entre 4,5 y 5,0, tal como de 4,6 y 4,8 por ejemplo. No obstante, el sabor de tales productos no es completamente satisfactorio.

60 Resumen de la invención

Sorprendentemente, se ha hallado un modo de aumentar el pH de fórmulas nutricionales acidificadas directamente y así se mejora el sabor y, además, se preserva el grado requerido de actividad bacteriostática.

65

Consecuentemente, la presente invención proporciona una fórmula nutricional con un pH en estado líquido de entre 4,8 y 5,2, y tal fórmula incluye, en base a la materia seca, ácido láctico en una cantidad de entre el 1,00 y el 1,20% y de entre el 0,90 y 1,40% de lactato cálcico.

5 Se conoce que los ácidos orgánicos débiles como el ácido láctico pueden inhibir el crecimiento bacteriano y fúngico. Tales ácidos existen en solución en un equilibrio dependiente de pH entre el estado no disociado y disociado. La reducción del pH varía el equilibrio hacia el estado del ácido no cargado y no disociado, y así se logra la actividad inhibitoria óptima a pH bajo, dado que el ácido no disociado es permeable de manera libre a través de la membrana plasmática y es capaz de introducirse en las células bacterianas. Cuando la molécula se encuentra un pH superior en el interior de la célula, ésta se disocia y se liberan los protones y aniones cargados. Para lidiar con el descenso de pH, las células consumen energía metabólica y así se inhibe el crecimiento. Sin intención de limitarse por la teoría, los presentes inventores piensan que mediante el suplemento de la concentración de lactato a un pH determinado, aumenta la concentración de ácido láctico no disociado y, por consiguiente el efecto bacteriostático. Se cree que el efecto bacteriostático mejorado (en comparación con una solución no suplementada al mismo pH) se debe a la concentración mayor de ácido no disociado en solución. De este modo, puede lograrse un efecto bacteriostático equivalente a la solución no suplementada a un pH menor con una mejora consecuente en el sabor de la composición. En relación a esto, debe tenerse en cuenta que, dado que el pH se expresa en escala logarítmica, los cambios relativamente pequeños en el pH del orden de 0,1 o 0,2 tienen un impacto significativo en el sabor.

20 La evaluación del sabor es un asunto complejo que requiere mucha evaluación: por ejemplo en niños, cuando sea posible, tal evaluación requiere una observación cuidadosa de los sujetos. El inventor ha observado que tanto la acidez (pH) como el potencial de tamponamiento de la composición pueden tener un impacto en el sabor percibido. Sin limitarse por la teoría, se cree que la composición particular de la invención proporciona en tal respecto un equilibrio óptimo entre el pH y el potencial de tamponamiento. Además, se ha observado que es crítico para la presente invención que ésta proporcione tanto un nivel adecuado de actividad bacteriostática como la preservación del sabor aceptable para el grupo diana de consumidores, especialmente para los niños. La presente invención presenta un equilibrio óptimo fino entre estas dos consideraciones. En una realización, el equilibrio se complica adicionalmente por la necesidad de preservar la bioactividad y la supervivencia del probiótico que puede estar presente en el compuesto.

Descripción breve de las ilustraciones

35 La figura 1 compara el crecimiento de *E. sakazakii* en varias fórmulas infantiles a 30°C tras un periodo de 6 horas;

La figura 2 compara el crecimiento de *S. typhimurium* en varias fórmulas infantiles a 30°C tras un periodo de 6 horas;

40 La figura 3 compara el crecimiento de *S. aureus* en varias fórmulas infantiles a 30°C tras un periodo de 6 horas;

45 La figura 4 compara el crecimiento de *B. cereus* en varias fórmulas infantiles a 30°C tras un periodo de 6 horas;

La figura 5 compara el crecimiento de *P. aeruginosa* en varias fórmulas infantiles a 30°C tras un periodo de 6 horas;

50 La figura 6 compara el crecimiento de *E. coli* en varias fórmulas infantiles a 37°C tras un periodo de 6 horas;

La figura 7 compara el crecimiento de *P. aeruginosa* en varias fórmulas infantiles a 37°C tras un periodo de 6 horas.

55 Descripción detallada de la invención

En esta especificación, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

60 "en el estado líquido" hace referencia a una fórmula nutricional lista para su consumo, ya sea porque se ha realizado y almacenado en forma de líquido o porque se reconstituye con agua u otro líquido si se ha realizado y almacenado como polvo. Debe entenderse que el pH de la composición en polvo de la invención se medirá una vez se reconstituya hasta formar una composición líquida. Por consiguiente, las mediciones y valores de pH hacen referencia a la composición líquida (ya sea natural o reconstituida). La reconstitución debe llevarse a cabo de acuerdo con las instrucciones habituales para el consumo de la

composición. En ausencia de instrucciones, la reconstitución se lleva a cabo con agua, en una proporción adecuada para lograr la densidad calórica deseada.

"ácido láctico L (+)" hace referencia a ácido S(+)-2-hidroxiopropiónico.

5

Todos los porcentajes son porcentajes de peso, a menos que se indique lo contrario.

Las sales adecuadas de ácido láctico incluyen el lactato sódico, el lactato potásico y el lactato cálcico, aunque se prefiere el lactato cálcico.

10

La fórmula nutricional incluye entre el 1,00 y el 1,20% de ácido láctico. La fórmula nutricional incluye entre el 0,90 y el 1,40% de lactato cálcico.

15

Preferiblemente, el contenido de lactato total (es decir, que incluye iones de lactato que derivan tanto del ácido láctico como de las sales de ácido láctico) de la fórmula nutricional es de, al menos, un 70% de lactato L(+).

La fórmula nutricional puede ser una fórmula infantil. Los términos "fórmula nutricional" y composición nutricional aquí se utilizan de forma intercambiable, con el mismo significado.

20

Una fórmula infantil de acuerdo con la presente invención puede incluir una fuente de proteínas en una cantidad de entre 1,8 g y 3,5 g de proteínas/100 Kcal de la composición. En una realización, la composición nutricional de la invención incluye una fuente de proteínas en una cantidad de no más de 2,0 g de proteínas/100 Kcal de la composición, preferiblemente entre 1,8 y 2,0 g de proteínas/100 Kcal. Se cree que el tipo de proteína no es crítico para la presente invención dado que se cumplen los requerimientos mínimos de aminoácidos esenciales y se asegura el crecimiento satisfactorio, aunque se prefiere que más del 50% del peso de la fuente de proteínas sea suero de la leche. Así, se pueden utilizar las fuentes de proteína basadas en suero de la leche, caseína y mezclas de las mismas, así como fuentes de proteína basadas en soja. Por lo que respecta a las proteínas del suero de la leche, la fuente de proteínas puede estar basada en suero de la leche ácido, suero de la leche dulce o mezclas de las mismas y puede incluir alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina en cualesquiera que sean las proporciones deseadas.

25

30

Las proteínas pueden ser proteínas intactas, hidrolizadas o una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas. Puede desearse la proporción de proteínas parcialmente hidrolizadas (grado de hidrólisis de entre el 2 y el 20%), por ejemplo en niños con riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. Si se requieren proteínas hidrolizadas, el proceso de hidrólisis puede realizarse como se desee y tal y como se conoce en la materia. Por ejemplo, se puede preparar un hidrolizado de proteínas del suero de la leche mediante la hidrólisis enzimática de la fracción del suero de la leche en uno o más pasos. Se observa que, si la fracción del suero de la leche utilizada como material de inicio está esencialmente libre de lactosa, la proteína sufre mucho menos bloqueo de lisinas durante el proceso de hidrólisis. Esto permite que se reduzca el porcentaje de bloqueo de lisinas desde aproximadamente el 15% del peso de lisinas totales hasta menos de aproximadamente el 10% del peso de lisinas; por ejemplo, aproximadamente el 7% del peso de lisinas, lo cual mejora mucho la calidad nutricional de la fuente de proteínas.

35

40

La fórmula infantil puede incluir una fuente de carbohidratos. Por consiguiente, puede utilizarse cualquier fuente de carbohidratos que se encuentra de manera habitual en las fórmulas infantiles, tales como lactosa, sacarosa, maltodextrina, almidón o mezclas de los mismos, aunque la fuente preferible de carbohidratos es la lactosa. Preferiblemente, las fuentes de carbohidratos contribuyen entre un 35 y un 65% a la energía total de la fórmula.

45

50

La fórmula infantil puede incluir una fuente de lípidos. La fuente de lípidos puede ser cualquier lípido o grasa adecuada para su utilización en fórmulas infantiles. Las fuentes de grasa preferibles incluyen palmoleína, aceite de girasol alto oleico y aceite de cártamo alto oleico. Los ácidos grasos esenciales linoleico y α -linolenico también pueden añadirse en pequeñas cantidades de aceite que contienen altas cantidades de ácido araquidónico preformado y ácido docosahexaenoico, tal como los aceites de pescado o de microbios. En total, el contenido de grasa preferiblemente es de tal manera que contribuye entre un 30 y un 55% del total de la energía de la fórmula. Preferiblemente, la fuente de grasa tiene una proporción de ácidos grasos de n-6 a n-3 de aproximadamente entre 5:1 a 15:1; por ejemplo de entre aproximadamente 8:1 y aproximadamente 10:1.

55

La fórmula infantil se acidifica mediante la utilización de ácido láctico. Si se desea emplear la fórmula para alimentar a niños menores de tres meses, preferiblemente el ácido láctico estará en forma del enantiómero L(+) debido a que no se recomienda administrar a los niños el enantiómero D(-) o las mezclas que lo contengan.

60

El ácido láctico puede añadirse a la fórmula infantil junto con los otros ingredientes en forma de lote o en serie, pese a que se prefiere la adición en serie. El ácido láctico puede añadirse en forma seca (mezcla seca) junto con otros ingredientes secos mezclados, o en forma líquida junto con una mezcla seca o líquida de ingredientes. En una realización, el ácido láctico se añade tanto durante la fase seca como durante la fase húmeda. En una

65

realización, el ácido láctico puede mezclarse en seco con una fórmula infantil en polvo, pese a que en este caso es necesario utilizar ácido láctico con una pureza microbiológica aceptable, dado que la mezcla no se someterá a ningún tratamiento térmico adicional. Preferiblemente, el lactato cálcico también se añade mediante la mezcla en seco. Tanto el ácido láctico como el lactato cálcico están disponibles comercialmente, por ejemplo de PURAC biochem, Arkelsedijk 46, apartado de correos 21, 4200 AA Gorinchem, Holanda.

La fórmula infantil también puede incluir todas las vitaminas y minerales esenciales en la dieta diaria y en cantidades significativas. Se han establecido los requerimientos mínimos para ciertas vitaminas y minerales. Algunos ejemplos de minerales, vitaminas y otros nutrientes presentes de manera opcional en la fórmula infantil incluyen la vitamina A, la vitamina B1, la vitamina B2, la vitamina B6, la vitamina B12, la vitamina E, la vitamina K, la vitamina C, la vitamina D, el ácido fólico, el inositol, la niacina, la biotina, el ácido pantoténico, la colina, el calcio, el fósforo, el yodo, el hierro, el magnesio, el cobre, el zinc, el manganeso, el cloro, el potasio, el sodio, el selenio, el cromo, el molibdeno, la taurina, y la L-carnitina. En general, los minerales se añaden en forma de sal. La presencia y cantidad de los minerales específicos y otras vitaminas variará en función de la población infantil diana.

Si fuera necesario, la fórmula infantil puede incluir emulsificantes y estabilizantes tales como la lecitina, los ésteres del ácido cítrico de mono- y diglicéridos, y similares.

La fórmula infantil puede incluir, de manera opcional, otras sustancias que pueden tener un efecto beneficioso, tales como la lactoferrina, los nucleótidos, los nucleósidos y similares.

Una fórmula nutricional de acuerdo con la presente invención puede prepararse mediante la mezcla de la fuente de proteínas, la fuente de carbohidratos y la fuente de grasas en unas proporciones adecuadas. Si se utilizan los emulsificantes se añaden en este punto. Las vitaminas y minerales pueden añadirse en este punto pero generalmente se añaden más adelante para evitar la degradación térmica. Cualquier vitamina liposoluble, emulsificante o similar puede disolverse en la fuente de grasas con anterioridad al mezclado. Entonces se añade agua, preferiblemente agua sometida a ósmosis inversa, para formar una mezcla líquida. De forma conveniente, la temperatura del agua es de entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 80°C para facilitar la dispersión de los ingredientes. Se pueden utilizar licuadoras disponibles comercialmente para formar la mezcla líquida. Entonces, se homogeneiza la mezcla líquida.

La mezcla líquida homogeneizada se trata térmicamente para reducir la carga bacteriana, mediante el calentamiento rápido de la mezcla líquida hasta una temperatura de entre aproximadamente 80°C y aproximadamente 150°C durante entre unos 5 segundos y aproximadamente 5 minutos, por ejemplo. Esto puede llevarse a cabo mediante la inyección de vapor, el autoclave o mediante un termocambiador; por ejemplo una placa termocambiadora.

Entonces se puede refrigerar la mezcla líquida entre aproximadamente a 60°C y aproximadamente a 85°C; por ejemplo mediante enfriamiento instantáneo. El ácido láctico L (+) diluido al 35-65%, preferiblemente al 40-60%, en relación al peso del ácido láctico L (+) en agua, puede añadirse en serie a la solución tratada con calor a temperatura ambiente. El pH puede controlarse mediante las mediciones en serie, por ejemplo, para permitir el ajuste del pH durante la adición en serie a modo de mecanismo de retroalimentación.

El contenido de sólidos de la mezcla puede ajustarse de manera conveniente en este punto mediante los pasos adicionales de tratamiento térmico y homogeneización, utilizando condiciones similares a las anteriores.

Entonces se transfiere la mezcla a un aparato de secado adecuado, tal como un secador por pulverización o un liofilizador, y se convierte en polvo. El polvo debe tener un contenido de humedad menor a aproximadamente el 5% del peso. Se puede añadir el lactato cálcico al polvo mediante la mezcla en seco.

En una realización, la fórmula nutricional de la invención incluye un probiótico o una mezcla de probióticos diferentes. Preferiblemente, el probiótico se selecciona para resistir al pH diana del compuesto, más preferiblemente el probiótico sobrevive en el pH diana de la fórmula durante un periodo de al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 5 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas o al menos 5 días. Mediante el término "revivir" se hace referencia a la tasa de supervivencia de los probióticos, definida como el tiempo en el que la población del probiótico disminuye un 50%. Se puede definir un probiótico como un microbio vivo en forma de suplemento alimentario que afecta beneficiosamente al animal huésped mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal. El probiótico utilizado en la composición presente puede seleccionarse a partir del grupo que incluye *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Saccharomyces* o mezclas de los mismos; preferiblemente se selecciona a partir del grupo que incluye *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus* sp. y *Saccharomyces boulardii* o mezclas de los mismos. Más preferiblemente, el probiótico se selecciona a partir del grupo que incluye *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (apodado NCC4007 y LPR), *Bifidobacterium lactis* CNCM I-3446, comercializado entre otros por la empresa de Christian Hansen de

Dinamarca bajo la marca comercial Bb12 (apodado NCC2818), *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, comercializado por Morinaga Milk Industry Co. S.L. de Japón bajo la marca comercial BB536, *Lactobacillus paracasei* CNCM I- 2116 (apodado NCC2461 y ST11), *Lactobacillus johnsonii* CNCM I- 1225 (apodado NCC533 y Lal), *Lactobacillus fermentum* VRI 003, comercializado por Probiomix (Australia) bajo la marca comercial PCC, *Bifidobacterium longum* CNCM I- 2170, *Bifidobacterium longum* CNCM I- 2618, *Bifidobacterium breve*, comercializado por Danisco (Dinamarca) bajo la marca comercial Bb- 03, *Bifidobacterium breve*, comercializado por Morinaga (Japón) bajo la marca comercial M-16V y la cepa de *Bifidobacterium breve*, comercializado por Institut Rosell (Lallemand) (Canadá) bajo la marca comercial R0070, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1292, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, que se obtiene entre otros de Valio Oy de Finlandia bajo la marca comercial LGG, *Enterococcus faecium* SF 68, y mezclas de los mismos. Un probiótico preferible es *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724. Otro probiótico preferibles es *Lactobacillus reuteri*, especialmente *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, ATCC PTA 6475, ATCC PTA 4659 y ATCC PTA 5289, y más particularmente *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *L. reuteri* DSM 17938, que se obtiene de Biogaia AB (Kungsbroplan 3A Estocolmo, Suecia). Se prevé que la composición de la presente fórmula nutricional pueda incluir más de un probiótico, preferiblemente dirigidos a diferentes efectos en la salud, y más preferiblemente que refuercen sinérgicamente entre sí el(los) efecto(s) sobre la salud. Se ha observado que algunos probióticos seleccionados pueden sobrevivir en el pH diana de la composición y proporcionar su efecto sobre la salud en el sujeto. En una realización, los probióticos se tratan de tal manera que resisten mejor el pH diana de la composición. Tal tratamiento puede incluir el recubrimiento de los probióticos.

Preferiblemente, el probiótico está presente en la composición en una cantidad equivalente a entre 10^3 y 10^{10} CFU/g de la composición seca (CFU = unidad formadora de colonias). Esta expresión incluye las posibilidades de que las bacterias estén vivas, inactivadas o muertas, incluso presentes en forma de fragmentos tales como el DNA o materiales de las paredes celulares. En otras palabras, la cantidad de bacterias que contiene la fórmula se expresa en términos de capacidad de la cantidad de bacterias para formar colonias, como si todas las bacterias estuvieran vivas independientemente de que, de hecho estén vivas, atenuadas o muertas, fragmentadas o en una mezcla de cualquiera de estos estados. Preferiblemente, el probiótico está presente en una cantidad equivalente a entre 10^4 y 10^9 CFU/g de la composición, incluso más preferiblemente en una cantidad equivalente a entre 10^6 y 10^8 CFU/g de la composición. En una realización, la cantidad de probióticos presente en la composición nutricional de la invención es una dosis baja. Por dosis baja se entiende entre 10^2 y 10^5 CFU/g de la composición, preferiblemente entre 10^2 y 10^4 CFU/g de la composición. Se anticipa que las dosis bajas de probióticos pueden tener un beneficio similar a las dosis altas de probióticos, especialmente en niños muy pequeños.

Ejemplo 1:

Se prepara una fórmula infantil acidificada mediante la utilización de los ingredientes de la tabla 1, a continuación.

Tabla 1

Ingrediente	Cantidad (% del peso)
Polvo de suero de la leche seco	18,88
Maltodextrina (DE 24-32)	17,5
Lactosa	16,56
Aceite de palma	13,0
Polvo de leche desnatada	16,04
Aceite de colza erúcico bajo	4,7
Aceite de coco	4,4
Aceite de girasol	2,7
Ácido láctico ¹	1,1
Lactato cálcico	1,8
Lectina de soja (al 62%)	0,6
Agua	2,1

Las vitaminas y minerales se añadieron de acuerdo con los valores recomendados.

La lactosa, la maltodextrina, los polvos del suero de la leche y de la leche desnatada se mezclaron con agua a 50-60°C. La solución se estandarizo con a unos contenidos sólidos totales (TS) del 25%. Se añadieron los minerales a la solución, que se refrigeró a 8°C.

Entonces se precalentó la solución a 50°C en un tanque de aceite de doble cubierta y se añadieron el aceite de palma, el aceite de coco, el aceite de colza erúcico bajo, el aceite de girasol y la lecitina de soja en serie. La solución se calentó a 105°C, se mantuvo a esa temperatura durante 5 segundos y entonces se pasó a un evaporador donde se concentró hasta un contenido sólido total del 40-50%. La solución concentrada se pasó a un tanque tampón. Se diluyó ácido láctico L (+) en agua hasta lograr una concentración de aproximadamente el

ES 2 439 504 T3

10% a 4°C y el ácido diluido se añadió lentamente en la solución concentrada. La solución concentrada acidificada se precalentó a 75°C y se homogenizó.

5 La solución homogenizada se secó por pulverización y el polvo resultante se mezcló en seco con las vitaminas, los minerales restantes, el lactato cálcico y una pequeña parte de la maltodextrina.

La fórmula infantil pulverizada resultante puede reconstituirse con agua para preparar una fórmula infantil lista para el consumo. El pH de la fórmula reconstituida fue de 5,0.

10 En un ejemplo alternativo, la composición del ejemplo 1 se complementa con un probiótico (*Lactobacillus reuteri* DSM 1793, procedente de Biogaia, Suecia) en una cantidad de 2×10^7 CFU/g de la composición seca. La adición se lleva a cabo mediante la mezcla en seco.

15 Ejemplo 2: ensayos microbiológicos

20 Las fórmulas infantiles que se muestran en la tabla 2 a continuación se sometieron a ensayos de provocación microbiológica con los microorganismos *Salmonella typhimurium* NCTC 12023, *Escherichia coli* NCTC 9001, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662, *Staphylococcus aureus* NCTC 651, *Bacillus cereus* NCTC 7464 y *Enterobacter sakazakii* FSM 263. Los organismos de provocación fueron suministrados por The Health Protection Agency, Water EQA, Newcastle Laboratory, Institute of Pathology, General Hospital, Westgate Road, Newcastle upon Tyne, NE4 6BE.

25 Los medios de crecimiento y dilución utilizados fueron Bacto Brain Heart Infusion (BHI - BD237500), el diluyente para la recuperación máxima (MRD, Oxoid CM733), el agar bilis y rojo violeta con glucosa, el agar verde brillante, el agar selectivo de *Bacillus cereus*, la base de agar de *Pseudomonas* y el disco Staph Express.

30 Las muestras de la fórmula se inocularon y se analizaron del siguiente modo. Todas las fórmulas se prepararon mediante la reconstitución de 139 g de fórmula pulverizada en 900 ml de agua desionizada estéril y calentada a 40°C. De cada muestra reconstituida se dispensaron en condiciones de asepsia 2 x 200 ml en botellas estériles Duran. Se inoculó una botella de cada par con una de las cepas de provocación para lograr una concentración de 10^2 CFU/ml.

35 Las diferentes fórmulas inoculadas se analizaron mediante la preparación de placas de 1 ml con el medio de crecimiento adecuado. Las placas se incubaron a 37°C o 30°C durante 24 horas y luego se añadieron las muestras de la fórmula inoculada y las placas se incubaron a 37°C o 30°C durante periodos de hasta 6 horas. Se llevaron a cabo análisis de enumeración tras 2, 4 y 6 horas de la incubación. Se midió el pH del sobrante (fórmula no inoculada).

Tabla 2

Producto	Ácido láctico (%peso/peso)	Lactato cálcico (%peso/peso)	pH
A	1,4	0,0	4,6
B	1,2	1,0	4,8
C	1,1	0,9	4,9
D	1,0	2,0	5,1
E	1,2	1,0	4,9
F	1,1	1,0	5,0
G	1,0	1,0	5,0
H	1,2	1,4	4,8
I	1,1	1,4	4,9
J	1,0	1,4	5,0
K*	1,3	0,0	4,8
L**	0,0	0,0	7,0

*Fórmula infantil acidificada disponible comercialmente bajo la marca comercial NAN PELARGON®
 **Fórmula infantil no acidificada disponible comercialmente bajo la marca comercial LACTOGEN 1®

40 Los productos A, D, K y L son composiciones comparativas, mientras que el resto son productos de acuerdo con la invención.

45 Tal y como se puede observar en la figura 1, en las fórmulas B y C de acuerdo con la invención, el crecimiento de *E. sakazakii* a 30°C se restringió a niveles comparables a los observados en una fórmula acidificada que contiene ácido láctico solamente y con un pH de 4,6 y comparables a una fórmula acidificada con un pH de 4,7 durante un periodo de 4 horas.

La figura 2 muestra el efecto de cuatro fórmulas sobre el crecimiento de *S. typhimurium* a 30°C. Puede observarse que las fórmulas E, F y G de acuerdo con la invención restringieron respectivamente el crecimiento del patógeno hasta niveles aceptables durante un periodo de 4 horas.

5 La figura 3 muestra el efecto de cuatro fórmulas sobre el crecimiento de *S. aureus* a 30°C. Puede observarse que fórmulas E, F y G de acuerdo con la invención restringieron respectivamente el crecimiento del patógeno hasta niveles aceptables durante un periodo de 4 horas.

10 La figura 4 muestra el efecto de cuatro fórmulas sobre el crecimiento de *B. cereus* a 30°C. Puede observarse que las fórmulas E, F y G de acuerdo con la invención restringieron respectivamente el crecimiento del patógeno hasta niveles aceptables durante un periodo de 4 horas.

15 La figura 5 muestra el efecto de cuatro fórmulas sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* a 30°C. Puede observarse que las fórmulas E, F y G de acuerdo con la invención restringieron respectivamente el crecimiento del patógeno hasta niveles aceptables durante un periodo de 4 horas.

20 Como puede observarse en la figura 6, en las fórmulas H, I y J de acuerdo con la invención, el crecimiento de *E. coli* a 37°C se restringió durante un periodo de 4 horas hasta niveles comparables a los observados en una fórmula acidificada que sólo contiene ácido láctico y con un pH de 4,8.

Como puede observarse en la figura 7, en las fórmulas H, I y J de acuerdo con la invención, el crecimiento de *P. aeruginosa* a 37°C se restringió durante un periodo de 4 horas hasta niveles comparables a los observados en una fórmula acidificada que sólo contiene ácido láctico y con un pH de 4,8.

25 Ejemplo 3: modulación del sabor

30 Se sometieron dos fórmulas de acuerdo con la presente invención (una fórmula experimental preparada con fines comparativos y una fórmula infantil acidificada comercialmente disponible bajo la marca comercial NAN PELARGON®) a una evaluación sensorial comparativa realizada por un panel de 13 evaluadores expertos. Las fórmulas se evaluaron a 42°C bajo condiciones controladas en relación a su sabor y acidez global. Los detalles de las fórmulas evaluadas se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Producto	Ácido láctico (%peso/peso)	Lactato cálcico (%peso/peso)	pH
NAN PELARGON®	1,3	0,0	4,8
Experimental 1	1,2	1,0	4,8
Experimental 2	1,0	1,0	5,0
Comparativa	1,4	0,0	4,6

35 Todas las fórmulas se prepararon de la siguiente manera. Se calentó en un baño de agua 1 litro de agua desmineralizada a 42°C en una botella Duran de 1 litro. Se pesaron 139 g del polvo de la fórmula infantil en un vaso de precipitados de vidrio de 400 ml. Se vertieron 900 g del agua desmineralizada caliente en un vaso de precipitados de vidrio de 200 ml. El polvo se vertió en el agua y se batió hasta la completa dispersión. La dispersión se vertió de nuevo en la botella Duran y se mantuvo a 42°C en el baño de agua.

40 Se determinó la acidez relativa de las cuatro fórmulas infantiles mediante los evaluadores en una escala del 1 (el menos ácido) al 4 (el más ácido) mediante la utilización de 1 g de ácido láctico (solución al 50% peso/peso) en 1 litro de agua Evian® como referencia. Entonces se aplicó un ensayo Friedman a la sumas de las clasificaciones por producto con un riesgo global del 5%. El panel percibió diferencias en la acidez entre las cuatro fórmulas ($p > 0,0001$). La fórmula infantil con el menor pH (fórmula comparativa) se percibió como la menos ácida. La siguiente fórmula más ácida que se percibió fue la NAN PELARGON, luego la fórmula experimental 1, y luego la fórmula experimental 2.

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una fórmula nutricional con un pH en estado líquido de entre 4,8 y 5,2, y dicha fórmula incluye, en base a la materia seca, ácido láctico en una cantidad de entre el 1,00 y el 1,20% y lactato cálcico entre el 0,90 y el 1,40%.
2. Una fórmula nutricional de acuerdo con reivindicación 1, en la que al menos el 70% del contenido iónico total de lactato es lactato L (+).
- 10 3. Una fórmula nutricional de acuerdo con reivindicación 2, la cual es una fórmula infantil.
4. La fórmula nutricional de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que dicha fórmula nutricional incluye entre 1,8 g y 3,5 g de proteínas por cada 100 Kcal de la composición.
- 15 5. La fórmula nutricional de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que dicha fórmula también incluye un probiótico.

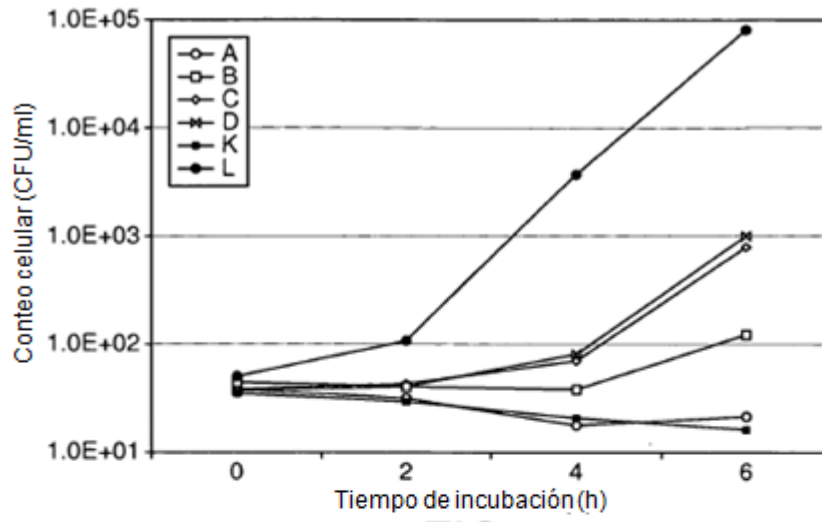


FIG. 1

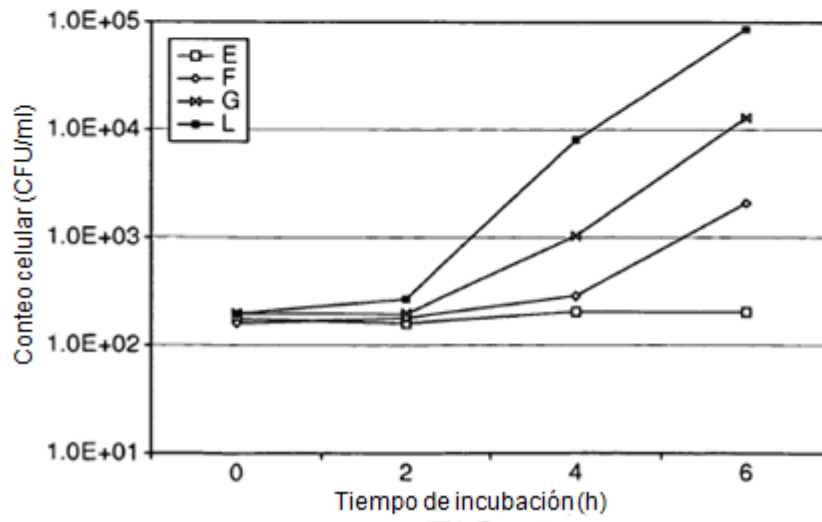


FIG. 2

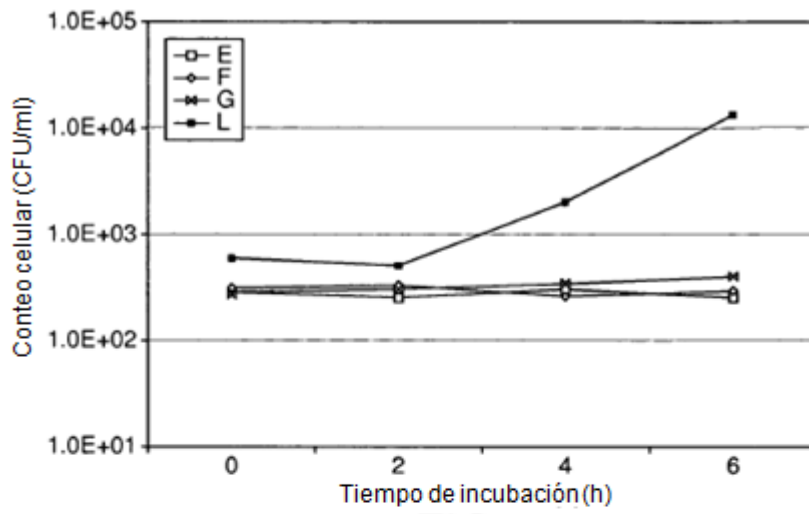


FIG. 3

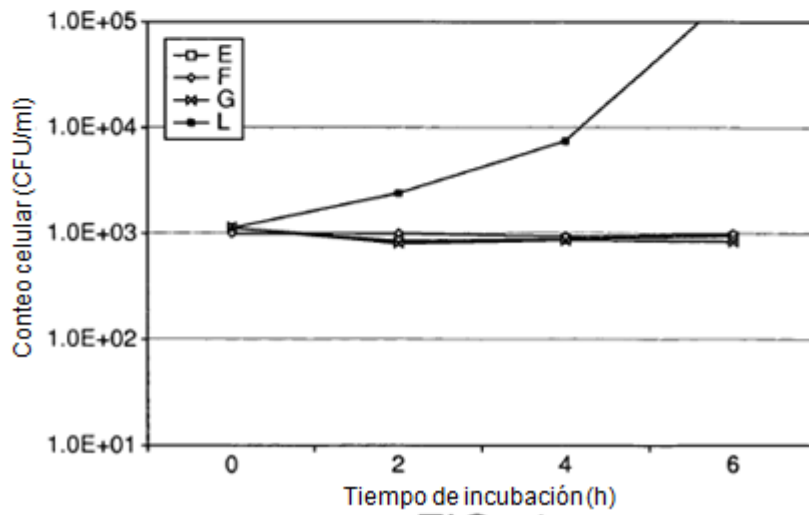


FIG. 4

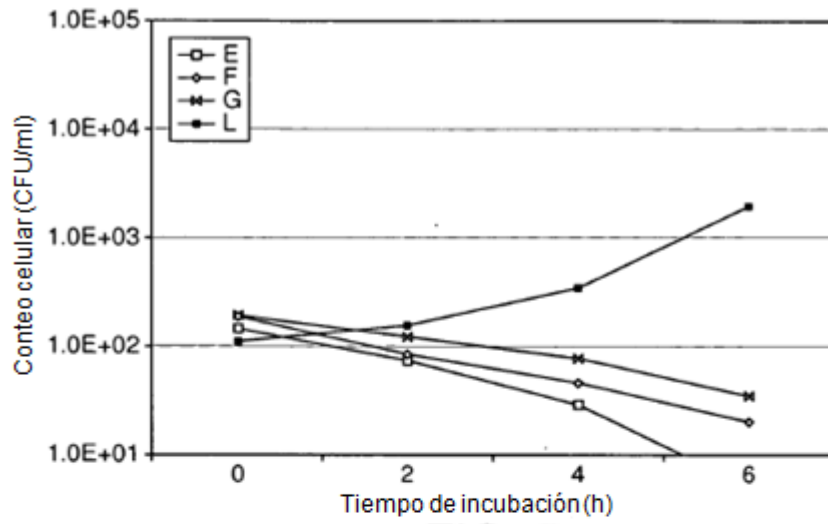


FIG. 5

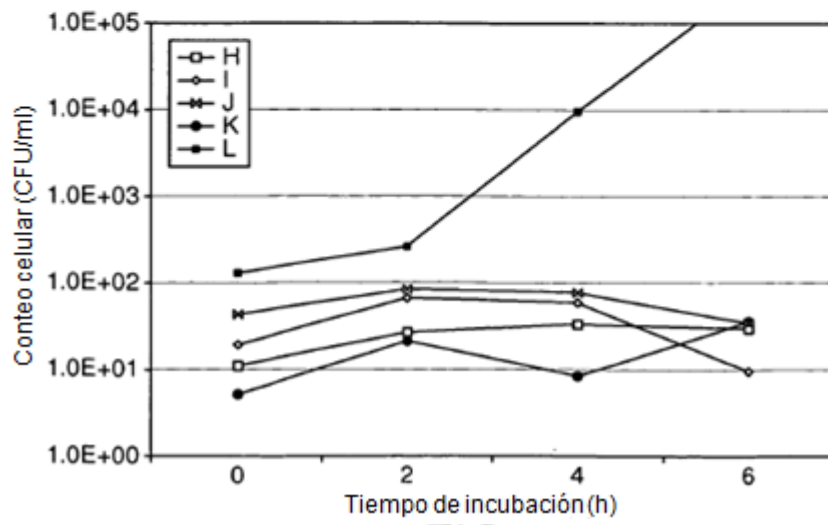


FIG. 6

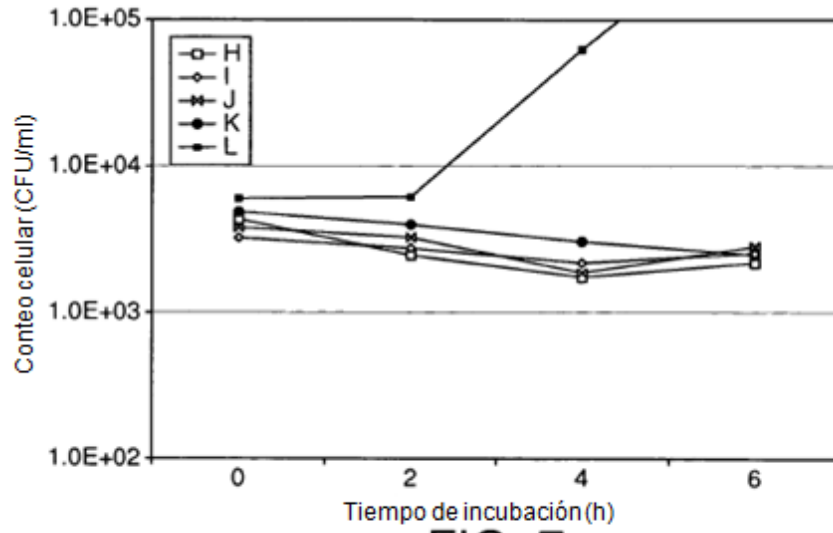


FIG. 7