

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 983**

51 Int. Cl.:

**A23J 3/10** (2006.01)

**A23L 1/29** (2006.01)

**A23L 1/305** (2006.01)

**A23C 3/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011 E 11712031 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2544553**

54 Título: **Control de la textura de composiciones nutricionales altas en proteínas que comprenden caseína micelar**

30 Prioridad:

**11.03.2010 WO PCT/NL2010/050129**

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

**09.04.2014**

73 Titular/es:

**N.V. NUTRICIA (100.0%)  
Eerste Stationsstraat 186  
2712 HM Zoetermeer, NL**

72 Inventor/es:

**DE KORT, ESTHER JACQUELINE y  
MINOR, MARCEL**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 453 983 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

Control de la textura de composiciones nutricionales altas en proteínas que comprenden caseína micelar

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención está en el campo de composiciones nutricionales enterales. Más en particular, se refiere a una composición de caseína micelar acuosa que comprende de 6 a 20 g de caseína micelar por 100 ml de composición, y con un pH de aproximadamente 6 a 8, al igual que a una composición nutricional enteral que comprende una cantidad alta de caseína micelar, y los problemas de controlar - independientemente - la viscosidad, transparencia y niveles de fosfato en tal composición.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] Preferiblemente, productos lácteos médicos son altamente concentrados en nutrientes, en particular en proteínas y minerales, para reunir la ingesta diaria de nutrientes en pacientes desnutridos. Estos pacientes pueden ser pacientes caquéticos o personas que sufren SIDA en fase terminal, cáncer o tratamiento contra el cáncer, enfermedades pulmonares severas como COPD (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), tuberculosis y otras enfermedades infecciosas o personas que se han sometido a cirugía severa o traumatismo como quemaduras. Además, personas que sufren trastornos en la garganta o boca tal como cáncer esofágico o estomatitis y personas con problemas de deglución como personas disfágicas, requieren nutrición de volumen bajo de líquidos especiales. También, personas que sufren únicamente apetito reducido o pérdida de sabor, se beneficiarán del alimento de volumen bajo, preferiblemente líquido. Estos pacientes pueden también ser personas mayores, en particular personas mayores frágiles y personas mayores con riesgo de volverse frágiles. A este respecto, aunque las necesidades de energía de la persona mayor se pueden reducir, su capacidad para consumir productos también puede estar disminuida. Por ejemplo, ellos pueden tener dificultad en consumir un producto debido a, por ejemplo, dificultades de deglución, o debido a la cantidad de producto demasiado grande que necesitan para reunir la toma diaria de nutrientes. Por lo tanto, la adaptabilidad no es óptima, y frecuentemente, la toma es subóptima, conduciendo a una alimentación subóptima, y al fin y al cabo, a la desnutrición.

[0003] Los grupos ya mencionados de pacientes pueden ser extremadamente sensibles a la consistencia alimenticia y a las propiedades organolépticas del producto tales como, por ejemplo viscosidad, sensación en la boca, sabor, olor y color. También, pacientes tales como pacientes caquéticos, típicamente padecen de debilidad extrema que impide frecuentemente que se sienten en una posición vertical y que beban alimento de una caja de cartón o incluso que lo aspiren con una paja. Estos pacientes se benefician bien de composiciones enterales de volumen bajo de líquido con un contenido alto de nutrientes, en particular proteínas.

[0004] No obstante, cantidades altas de proteína y minerales aumentan la viscosidad total del producto durante el tratamiento y almacenamiento debido a cambios en el equilibrio proteína-mineral. Productos líquidos de baja viscosidad, no obstante, son principalmente apreciados por pacientes, lo cual convierte en un desafío formular tales productos.

[0005] Por lo tanto, el problema subyacente de la presente invención es proporcionar una composición enteral líquida para suministrar nutrición, bien como un suplemento, o como una nutrición completa, que comprende un contenido alto de una proteína intacta, en particular caseína micelar, como fuente de proteína principal, en el volumen más pequeño de líquido, y que sostiene nutrición y bienestar en los grupos de pacientes diferentes mencionados anteriormente, en particular a una persona de edad avanzada o un paciente enfermo.

[0006] Micelas de caseína en la leche concentrada interactúan más frecuentemente entre sí que en la leche bovina debido a las distancias más pequeñas entre las micelas. La leche concentrada, por lo tanto, se comporta como un fluido no newtoniano de adelgazamiento al corte, que significa que la viscosidad depende de la velocidad de cizalladura (Karlsson et al., 2005). La viscosidad de sistemas coloidales, es en general dependiente de la viscosidad de la fase continua, forma, y distribución de tamaño de partículas, y de sus interacciones mutuas junto con asunciones en cómo la viscosidad sigue la fracción de volumen. La fracción de volumen ( $\Phi$ ) de las micelas de caseína es un número adimensional, definido como fracción del volumen total tomado por las partículas. Esto se puede determinar por medición de la viscosidad ( $\eta$ ) de la solución. Eilers (1945) generó la fórmula (1) para estimar la viscosidad de sistemas lácteos concentrados.

$$\eta = \eta_0 \left( 1 + \frac{1.25\Phi}{1 - \Phi/\Phi_{\max}} \right)^2 \quad (1)$$

$\eta_0$  representa la viscosidad de la fase continua y es 1 mPa·s.  $\Phi_{\text{máx}}$  representa la fracción de volumen de empaquetamiento máximo para el que la viscosidad tiende a ir a infinito. Un valor de 0,74 es normalmente usado para  $\Phi_{\text{máx}}$  en una solución con esferas de tamaños similares (Eilers; 1945), pero para leche concentrada, en la que las partículas tienen varios tamaños, debería ser usado un valor de 0,79. Esta fórmula es extendida de la relación de Einstein, que describe la viscosidad de dispersiones en sistemas muy diluidos, en los que las partículas son esféricas y no deformables o afectadas por la presencia del otro (Dewan et al., 1972; Eilers, 1945; Karlsson et al., 2005).

[0007] La voluminosidad se define como el volumen total ocupado por un gramo de proteína y ha sido relacionada con la fracción volumétrica  $\Phi$  de las proteínas en la solución (Eilers; 1941) La voluminosidad de las micelas de caseína es un factor determinante para la viscosidad de la solución. La voluminosidad de micelas de caseína aumenta cuando las micelas se vuelven más hidratadas (p. ej. debido a disminución de calcio), lo que causa liberación de caseínas específicas de la micela y expansión e hinchamiento de las micelas. El orden de la liberación de caseína específica depende de la cantidad de residuos de fosfoserina y por lo tanto de la sensibilidad específica para iones de calcio. Cuando las micelas se vuelven más empobrecidas de calcio, más caseína será liberada de la micela de caseína. Como resultado, el orden de disociación es  $\beta$ -caseína >  $\alpha_{s1}$ -caseína >  $\alpha_{s2}$ -caseína (Holt, 1997). Aunque  $\kappa$ -caseína tiene 0 o 1 residuos de fosfoserina, probablemente permanecerá adherida en la micela de caseína debido a sus interacciones hidrofóbicas. Por ejemplo, la cantidad de  $\beta$ -caseína que deja las micelas de caseína aumenta con una temperatura decreciente y el contenido de calcio. El aumento en tamaño de las micelas de caseína se provoca por expansión e hinchamiento de las micelas de caseína, que se debe al aumento en la repulsión electrostática y ósmosis de fase continua en las micelas, respectivamente (Leviton y Pallansch, 1962). Por otra parte, los iones de calcio libres en la fase continua reducen la repulsión electrostática en las micelas de caseína, lo que mantiene las micelas más compactas.

[0008] Las interacciones entre micelas de caseína en la leche concentrada están fuertemente influidas por ejemplo por la fuerza iónica, contenido mineral y composición, pH, y temperatura (Karlsson et al., 2005). Fosfatos y citrato, que son minerales que son frecuentemente añadidos a nutrición médica, queso procesado, o leche UHT (concentrada), interactúan con las micelas de caseína enlazando iones de calcio o uniéndose directamente a la micela de caseína (Kocak and Zadow, 1985; Mizuno and Lucey, 2005; Vujicic et al., 1968). En general, su capacidad enlazante de calcio se puede ordenar en el siguiente orden: fosfato de cadena larga > tripolifosfato > pirofosfato > citrato > ortofosfato (Zittle, 1966).

### **ESTADO DE LA TÉCNICA**

[0009] Aunque un gran número de bibliografía de estado de la técnica es disponible (citada en la solicitud, donde corresponde), sólo pocas publicaciones tratan de composiciones nutricionales enterales líquidas que comprenden altas cantidades de caseína micelar, en el rango de 6 a 20 g/100 ml de composición.

[0010] El efecto de fosfatos y citrato en cambios físicos de soluciones de leche es principalmente estudiado en los sistemas de leche desnatada, donde aproximadamente un 20 % de la proteína es lactosuero, con factores de concentración baja (como máximo ~6,5 % proteína de p/v), y niveles de fosfato o de citrato relativamente bajos. Varios de estos estudios se han focalizado en los geles de leche (Mizuno & Lucey, 2007) o en la gelificación por envejecimiento (Harwalkar, 1982; Kocak & Zadow, 1985; Leviton & Pallansch, 1962).

[0011] US 5,683,984 divulga una composición de alimentación por sonda enteral con un componente de proteína de caseína micelar nativa. Cuestiones de viscosidad son identificadas, y abordadas en WO 2009/072885, que divulga una composición de nutrición líquida enteral de energía alta y alta proteína que contiene caseína micelar y caseinato, y opcionalmente una pequeña cantidad de lactosuero.

[0012] Además, un gran número de publicaciones tratan del efecto de turbidez de las sales de fosfato adicionadas en productos lácteos tales como leche desnatada, no obstante, ninguna describe el efecto de estas sales en la viscosidad en composiciones nutricionales enterales líquidas que comprenden altas cantidades de caseína micelar, en el rango de 6 a 20 g/100 ml.

[0013] Liang et al. (Nippon Nogei Kagaku Kaishi (1974), 48(1), 49-56 describen los efectos de glicerofosfato en la gelificación de micelas de caseína y en la turbidez en la leche desnatada (que contienen aproximadamente 3 g/100 ml de micelas de caseína).

[0014] WO 01/72135 A1 (Australian Food Industry Science Center) y US 6,455,082 B1 (Nestec) tratan la adición de fosfatos para leche para estabilizar la leche (que contiene aproximadamente 3 g/100 ml de micelas de caseína). Aunque ellos revelan un efecto en la viscosidad, ellos no enseñan un efecto en la transparencia, y ciertamente no en un sistema alto en proteína, que es mucho más crítico que un sistema bajo proteína tal como leche con respecto al comportamiento de viscosidad y de transparencia.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

- 5 [0015] Los inventores han encontrado ahora que usando uno o más agentes quelantes seleccionados del grupo que consiste en un ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal de fosfato soluble, una sal de citrato soluble, o una mezcla de estos, la viscosidad y la transparencia de una composición de caseína micelar acuosa, que comprende de 6 a 20 g/100 ml de caseína micelar y con un pH de aproximadamente 6 a 8, podría ser controlada independientemente una de la otra. El uso de un agente quelante para controlar independientemente la viscosidad y transparencia de una composición micelar acuosa no se conoce en la técnica.
- 10 [0016] En una forma de realización, la composición comprende uno o más agentes quelantes seleccionados del grupo que consiste en un ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal de fosfato soluble, una sal de citrato soluble, o una mezcla de estos, con la condición de que ácido cítrico, una sal de citrato soluble o una mezcla de estos sea excluido como agente quelante solo.
- 15 [0017] En una forma de realización, la composición comprende uno o más agentes quelantes seleccionados del grupo que consiste en un ácido fosfórico, una sal de fosfato soluble, o una mezcla de estos.
- 20 [0018] En una forma de realización, la composición de caseína micelar acuosa no contiene, o sustancialmente no contiene, ninguna grasa, carbohidratos no digeribles y digeribles. Con "sustancialmente no contiene" se pretende que las contribuciones de estos componentes sean preferiblemente menos de 5 % en peso, en base a la sustancia seca total de la composición.
- [0019] Preferiblemente, el uso es efectuado añadiendo los agentes quelantes a la composición de caseína micelar acuosa.
- 25 [0020] Con la redacción "independientemente" se entiende que la viscosidad y transparencia se pueden ajustar a cualquier valor, independientemente uno del otro, por selección del agente quelante apropiado con una concentración apropiada o cualquier combinación superior a un agente quelante apropiado con su concentración apropiada. De esta manera, es posible obtener composiciones tanto transparentes como muy viscosas, incluso también composiciones muy lácteas y muy líquidas. Este último conjunto de propiedades es muy interesante e importante para el desarrollo de composiciones
- 30 nutricionales, en particular nutrición médica a base de leche, que comprende cantidades altas de caseína micelar, en particular que comprenden 6 a 20 g/100 ml de caseína micelar.
- [0021] Con "soluble" se pretende hacer referencia a una sal que es soluble en agua a pH 6 - 8.
- 35 [0022] Preferiblemente, la composición acuosa de caseína micelar según la invención comprende al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 g y como mucho 20 g de caseína micelar por 100 ml de composición, preferiblemente 11 a 18 g/100 ml, más preferiblemente 12 a 18 g/100 ml, y de la forma más preferible 14 a 18 g/100 ml.
- 40 [0023] El pH de la composición acuosa de caseína micelar debería estar entre aproximadamente 6 y 8. El pH se determina en la composición acuosa de caseína micelar y esto puede hacerse mediante métodos de rutina, conocidos por el experto en la materia, tal como uso de un dispositivo de medición de pH disponible comercialmente.
- [0024] Además, con la elección apropiada de agente quelante según la invención, es posible, independientemente de la viscosidad y transparencia, añadir cantidades de fósforo (como ácido fosfórico o fosfato) a una composición de caseína micelar acuosa, que comprende 6 a 20 g/100 ml de caseína micelar y con un pH de aproximadamente 6 a 8.
- 45 [0025] En el significado de esta solicitud, la redacción "transparencia" es lo contrario de la redacción "turbidez". Turbidez es el nombre del parámetro medido en los experimentos. Este experto en la materia está familiarizado con el concepto de turbidez (p. ej. a 700 nm) usando espectrofotometría al tratar con caseínas (Philippe et al., 2003).
- 50 [0026] La caseína micelar, a veces también denominada caseína micelar "nativa", se refiere a caseína en forma de micelas, que es la forma nativa de caseína en la leche. Es una proteína de la leche de calidad alta y de origen natural en la leche en una concentración de aproximadamente 2,6 g/100 ml (Dairy Science and Technology, Walstra et al., CRC Press, 2006). Se concentra por un proceso que no desnaturaliza, o sustancialmente no desnaturaliza las proteínas de caseína y se comercializa como Aislado de Caseína Micelar (MCI). Leche desnatada fresca está sujeta a un proceso de microfiltración, en casi el mismo proceso usado para concentrar la proteína de lactosuero, para producir una proteína de la leche pura sustancialmente no desnaturalizada con su estructura nativa. El material resultante contiene entre un 90 % y 95 %, preferiblemente más de un 95 % en peso de caseína micelar en la sustancia seca, el resto principalmente es proteína de lactosuero y otro nitrógeno no proteínico y otros constituyentes, tales como lactosa y sales inorgánicas, en particular fosfato cálcico. Las micelas de caseína generalmente tienen un radio hidrodinámico de 40 a 400 nm, un peso molecular de 106 a 109 Dalton y una proporción calcio: fósforo en peso de 1,4 a 2,4, el contenido de calcio es altísimo, del orden de
- 55
- 60

## ES 2 453 983 T3

aproximadamente 25 g/kg proteína. Tiene una viscosidad baja intrínseca y una composición líquida que comprende dicho MCI es por lo tanto fácil de beber. La cantidad de iones metálicos monovalentes, en particular Na y K, es muy bajo, típicamente en el rango de aproximadamente 1 a 2 g/kg proteína.

5 [0027] En cambio, caseína, como se usa en el contexto de esta invención, se refiere a la forma coagulada de caseína, que ha perdido su estructura micelar nativa. Está ligada a un metal, tal como sodio, potasio, calcio y magnesio, y es comúnmente llamado caseinato.

10 [0028] En el contexto de esta invención, se entiende que la caseína micelar también se puede proporcionar por otras fuentes de proteína de la leche, tal como, por ejemplo, fuentes que esencialmente preservan la proporción natural 80:20 de caseína a lactosuero, tal como Concentrado de Proteína de la Leche (MPC), que es un producto de polvo normalmente preparado por ultrafiltración con un contenido de proteína media de aproximadamente 80 % en peso, Aislado de Proteína de la Leche (MPI), un producto de polvo normalmente preparado por precipitación con un contenido de proteína medio superior a 85 % en peso, y leche concentrada desnatada. La caseína micelar también se puede proporcionar en forma líquida a través de un ultrafiltrado o microfiltrado.

15 [0029] Según una forma de realización, el ácido fosfórico se selecciona del grupo que consiste en el ácido uridina monofosfórico, ácido citidina monofosfórico, ácido ortofosfórico, ácido inositol hexafosfórico, ácido hexametafosfórico, o una mezcla de estos, y la sal de fosfato es seleccionada del grupo que consiste en monofosfato de uridina, monofosfato de citidina, ortofosfato, hexafosfato de inositol, hexametafosfato, o una mezcla de estos.

20 [0030] Según otra forma de realización, la sal soluble es una sal monovalente, preferiblemente una sal de sodio, una sal de potasio, o una mezcla de estas. Estas sales se prefieren para el desarrollo de composiciones nutricionales ya que estas introducen metales como contraiones (p. ej. sodio o potasio) que son esenciales en una dieta normal.

25 [0031] Según otra forma de realización, el contraión (p. ej. sodio o potasio) está presente en una cantidad menor o igual a una cantidad equimolar, en relación al ácido. Por ejemplo, una molécula de hexafosfato de inositol puede contener de 1 a 12 contraiones, y el producto hexafosfato de inositol puede por lo tanto contener moléculas con número diferente de contraiones, de manera que el equivalente total de contraiones en el producto es menor o igual al equivalente total de hexafosfato de inositol.

30 [0032] Según otra forma de realización, la sal de fosfato es seleccionada del grupo que consiste en el uridina monofosfato disódico (**Na<sub>2</sub>UMP**, un ortofosfato orgánico), citidina monofosfato disodio (**Na<sub>2</sub>CMP**, un ortofosfato orgánico), ortofosfato disódico (**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**, un ortofosfato inorgánico), fitato de sodio, también llamado hexafosfato de inositol dodecasodio (SP, un polifosfato orgánico), y hexametafosfato de (hexa)sodio (SHMP, un polifosfato inorgánico). Preferiblemente, la sal de citrato es citrato trisódico (TSC). Se entiende que - en la práctica - un producto no siempre contiene una cantidad equimolar de contraiones metálicos, en relación al ácido, aunque el producto se designe como tal. Tales productos están también comprendidos en la definición del fosfato y sales de citrato según la invención.

35 [0033] Preferiblemente, uno o más agentes quelantes es seleccionado del grupo que consiste en un ácido fosfórico, una sal de fosfato soluble, o una mezcla de estos.

40 [0034] De la forma más preferible, la sal de fosfato es uridina monofosfato disódico o citidina monofosfato disódico, preferiblemente uridina monofosfato disódico. Usando esta sal, una composición de caseína micelar líquida se obtiene con una transparencia y viscosidad sustancialmente inafectadas, aún proporcionando el fósforo necesario y contraiones para una composición nutricional.

45 [0035] La capacidad enlazante de calcio de las sales según la invención se basa en su número de cargas. Su orden en la capacidad enlazante de calcio se reduce desde SP > SHMP > TSC = Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> > Na<sub>2</sub>UMP = Na<sub>2</sub>CMP. Además, varios de estos fosfatos tienen la capacidad para interactuar con las micelas de caseína. Calcio libre e iones fosfato, complejos de fosfato cálcico, e iones libres de calcio y fosfato incorporados en las micelas de caseína están en equilibrio el uno con el otro en los sistemas lácteos (figura 1). La adición de los agentes quelantes según la invención desviará este equilibrio, ya que ellos quelan iones de calcio. Como resultado, esto afectará a la voluminosidad de las micelas de caseína, debido a que las micelas se hacen más empobrecidas en calcio, las micelas se pueden disociar y caseínas específicas son liberadas de la micela de caseína.

50 [0036] La voluminosidad se puede reducir también por adición de, por ejemplo, iones de calcio, porque ellos serán incorporados en las micelas de caseína (Walstra et al., 2006). Estos cambios en la voluminosidad afectan tanto a la viscosidad como a la estabilidad de calor de sistemas de leche a condiciones UHT. El ortofosfato, por ejemplo, está presente naturalmente en las micelas de caseína como fosfato cálcico coloidal (**CCP**). La adición de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a la leche causa la unión de los iones de fosfato con los iones de calcio y serán formados microcristales de fosfato cálcico. Ocurrirá

55

una reorganización de la estructura micelar y un cambio en la voluminosidad, porque los complejos, tales como  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , serán integrados en las micelas de caseína (Guo et al., 2003).  $\text{Na}_2\text{UMP}$  tiene una capacidad enlazante de calcio débil (de Kort et al., 2009) y afecta poco la voluminosidad de micelas de caseína.  $\text{Na}_2\text{CMP}$  muestra un comportamiento similar. No hay información disponible acerca de la interacción de  $\text{Na}_2\text{UMP}$  y  $\text{Na}_2\text{CMP}$  con micelas de caseína. Polifosfatos, tales como SHMP y SP, están cargados de forma altamente aniónica, lo que les da la posibilidad de enlazarse con los aminoácidos positivamente cargados de los residuos de caseína o CCP (Mizuno and Lucey, 2007; Vujicic et al., 1968; Zittle, 1966). La interacción de polifosfatos con micelas de caseína a pH neutro en leche (concentrada) crea cargas negativas de red extra en las micelas, que causa la expansión de las micelas de caseína (Leviton and Pallansch, 1962). SHMP aumenta la viscosidad o incluso causa gelificación en los sistemas de caseína, porque SHMP tiene la capacidad de reticular micelas de caseína a través de interacción con CCP o grupos amida (Kocak and Zadow, 1985; Mizuno and Lucey, 2007; Vujicic et al., 1968). El citrato no enlaza o aglutina caseínas (Mizuno and Lucey, 2005), sino que quela iones de calcio que estaban ligados a las micelas de caseína. El citrato y los complejos de citrato de calcio formados permanecen como complejos estables, solubles en la fase de suero (Mizuno and Lucey, 2007; Morr, 1967; Vujicic et al., 1968) o forman cristales de citrato de calcio insolubles durante el almacenamiento. La adición de citrato produce un aumento en la hidratación de las micelas de caseína, hinchamiento de las micelas medido como un aumento en la viscosidad y transparencia de las soluciones (Morr, 1967). La transparencia se puede determinar por medición de la turbidez de la solución con un espectrofotómetro. Es una herramienta importante para referir cambios en el ión, proteína, y distribuciones de agua con las propiedades fisicoquímicas de las soluciones y, más específico, de las micelas de caseína (Philippe et al., 2003). La densidad e índice de refracción, por ejemplo, cambiará con la contracción, disociación o hinchamiento de las micelas de caseína.

[0037] El efecto de orto- y polifosfatos y citrato en las propiedades físicas de leche desnatada concentrada o normal ha sido estudiado (Mizuno and Lucey, 2007; Morr, 1967; Vujicic et al., 1968), pero estos sistemas contienen proteína de lactosuero y concentraciones de proteína relativamente bajas (máximo ~6,5 % en peso de caseinato). Además, la investigación se centró en la preparación de geles de leche con fosfatos (Mizuno and Lucey, 2007) o en la aceleración o retardación de la gelificación por envejecimiento después de la adición de fosfatos o citrato (Harwalkar, 1982; Kocak and Zadow, 1985; Leviton and Pallansch, 1962). También, concentraciones relativamente bajas de fosfato o citrato fueron usadas en estos estudios.

[0038] La cantidad de agente quelante debería ser elegida conforme a la invención, pero se mostró que la adición de 1 a 120  $\text{mEq.L}^{-1}$  de dicho agente quelante, preferiblemente 5 a 100  $\text{mEq.L}^{-1}$ , más 10 a 80  $\text{mEq.L}^{-1}$ , de la forma más preferible 20 a 60  $\text{mEq.L}^{-1}$  de dicho agente quelante es suficiente para obtener los efectos reivindicados.

[0039] Usando un agente quelante según la invención, tres tipos de composiciones se pueden producir (figura 3 en combinación con figura 8). Se descubrió que una composición se vuelve más viscosa después de la adición de hexafosfato de inositol (tal como, SP) citrato (tal como TSC), o un ortofosfato inorgánico (tal como  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), y que la viscosidad depende de la concentración y tipo de fosfato y citrato. La adición de hexametáfosfato (tal como SHMP) conduce a composiciones transparentes y altamente viscosas e incluso a la formación de gel. En cambio, concentraciones altas de monofosfato de uridina (tal como  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ) se pueden adicionar sin afectar significativamente a la viscosidad y cambiar difícilmente la transparencia inicial de la composición.

[0040] Usando dos o más agentes quelantes según la invención, cualquier tipo de composiciones pueden ser producidos, teniendo cualquier viscosidad deseada, transparencia y contenido de fósforo.

#### Composición nutricional

[0041] En una forma de realización preferida, la invención se refiere a una composición nutricional que comprende de 9 a 20 g de proteína por 100 ml de la composición y con un pH de aproximadamente 6 a 8, en la que toda o la mayor parte de dicha proteína comprende caseína micelar, que comprende uno o más agentes quelantes seleccionados del grupo que consiste en un ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal de fosfato soluble, una sal de citrato soluble, o una mezcla de estos, al igual que en un número de formas de realización preferidas como se reivindica en las reivindicaciones anexas. La cantidad de agente quelante podría ser elegida conforme a la invención; la composición preferiblemente comprende 1 a 120  $\text{mEq.L}^{-1}$  de dicho agente quelante, preferiblemente 5 a 100  $\text{mEq.L}^{-1}$ , más 10 a 80  $\text{mEq.L}^{-1}$ , de la forma más preferible 20 a 60  $\text{mEq.L}^{-1}$  de dichos agentes quelantes.

[0042] En una forma de realización preferida, la composición comprende uno o más agentes quelantes seleccionados del grupo que consiste en un ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal de fosfato soluble, una sal de citrato soluble, o una mezcla de estos, con la condición de que ácido cítrico, una sal de citrato soluble o una mezcla de estos sea excluido como el único agente quelante.

[0043] En una forma de realización preferida, la composición nutricional comprende uno o más agentes quelantes seleccionados del grupo que consiste en un ácido fosfórico, una sal de fosfato soluble, o una mezcla de estos.

## ES 2 453 983 T3

- 5 [0044] Preferiblemente, la composición nutricional según la invención comprende al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,18 o 19 g y como mucho 20 g de proteína por 100 ml de composición, preferiblemente 11 a 18 g/100 ml, más preferiblemente 12 a 18 g/100 ml, y de la forma más preferible 14 a 18 g/100 ml, en los que toda o la mayor parte de dicha proteína comprende caseína micelar.
- [0045] En el contexto de esta solicitud, la redacción "toda o la mayor parte" en relación a la caseína micelar debería ser interpretada como una cantidad de caseína micelar que varía de 70 a 100 % de la proteína.
- 10 [0046] Según otra forma de realización de la presente invención, la composición nutricional de la invención comprende opcionalmente como mucho un 30 % en peso de caseinato, basado en el peso total de la proteína.
- 15 [0047] Según otra forma de realización de la presente invención, la proteína proporciona de un 10 % a un 100 %, preferiblemente de un 20 % a un 80 %, más preferiblemente de un 30 % a un 70 %, de la forma más preferible de un 30 % a un 60 % del contenido energético total de la composición. Los niveles altos de proteína son beneficiosos para pacientes que no pueden ser físicamente capaces de recibir un volumen grande, por ejemplo, pacientes de fluido restringido. A tales pacientes se les puede dar un nivel reducido de fluido mientras todavía reciben una cantidad requerida de soporte nutricional al día. La composición se puede utilizar como una nutrición completa, además de o como sustitución de un consumo de comida normal. La composición también se puede usar como suplemento, además de consumo de comida normal, cuando la absorción de grasas y carbohidratos es de menor interés.
- 20 [0048] Según otra forma de realización de la presente invención, la composición nutricional tiene una densidad energética de al menos 0,36 kcal/ml, más preferiblemente al menos 1,0 kcal/ml, particularmente al menos 1,5 kcal/ml de composición, más en particular al menos 2,0 kcal/ml.
- 25 [0049] Aunque la composición tiene una densidad energética alta, por elección de los agentes quelantes apropiados según la invención, también puede tener una viscosidad suficientemente baja para permitir que sea consumida por personas que pueden tener dificultad de deglución de productos o aquellas que son alimentadas por tubo. Por lo tanto, en una forma de realización, la composición nutricional es un líquido, preferiblemente con una viscosidad inferior a 200 mPa.s, preferiblemente menos de 80 mPa.s, preferiblemente menos de 70 mPa.s, más preferiblemente 50 mPa.s, todavía más preferiblemente menos de 40 mPa.s, de la forma más preferible igual a aproximadamente 20 mPa.s.
- 30 [0050] En una forma de realización de la presente invención, la cantidad de caseína micelar en la composición nutricional según la invención es al menos 70 % en peso, preferiblemente al menos 80 % en peso, más preferiblemente al menos 90 % en peso, más preferiblemente al menos 95 % en peso y como mucho 100 % en peso de la proteína presente en la composición nutricional.
- 35 [0051] Como ya mencionado, la composición nutricional de la presente invención no debería contener cantidades grandes de proteínas diferentes de la caseína micelar y, según una forma de realización, opcionalmente como mucho 30 % en peso de caseinato. En otra forma de realización de la presente invención, la composición nutricional puede comprender hasta aproximadamente 15 % en peso de lactosuero, preferiblemente menos o igual al 10 % en peso de lactosuero, más preferiblemente 1 a 10 % en peso de la proteína presente en la composición nutricional; en una forma de realización, la composición comprende menos o igual al 5 % en peso de lactosuero de la proteína presente en la composición nutricional.
- 40 [0052] En una forma de realización de la presente invención, la proporción en peso de caseína micelar para caseinato varía de aproximadamente 100:0 a aproximadamente 70:30. Preferiblemente, la proporción en peso de caseína micelar frente a caseinato varía de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 100:0.
- 45 [0053] La composición nutricional según la invención se diseña para bien suplementar la dieta de una persona o bien proporcionar soporte nutricional completo. Por lo tanto, la composición según la invención puede comprender además al menos grasa y/o carbohidrato y/o una fuente de vitaminas, minerales, oligoelementos y/o una fuente de carbohidratos indigeribles. Preferiblemente, la composición según la invención es una composición nutricional completa.
- 50 [0054] En una forma de realización, la invención pertenece a un método de proveer nutrición a una persona en necesidad de esta, que incluye las etapas de administrar a dicha persona la composición nutricional como se describe aquí. La persona es preferiblemente una persona de edad avanzada, una persona que está en estado de enfermedad, una persona que se está recuperando de un estado de enfermedad, una persona que está desnutrida, o una persona saludable tal como un hombre o mujer deportista o personas mayores activas. En este aspecto, se presenta que en el contexto de esta solicitud, una persona de edad avanzada es una persona de 50 años de edad o más, en particular de 55 años de edad o más, más en particular 60 años de edad o más, más en particular de 65 años de edad o más.
- 55  
60

**Grasa**

5 [0055] En una forma de realización la presente composición nutricional enteral comprende además grasa. La cantidad de grasa puede variar entre 5 y 95 %, preferiblemente entre 10 y 70 %, más preferiblemente entre 20 y 40 %, en relación al contenido energético total de la composición.

10 [0056] Con respecto al tipo de grasa, una elección amplia es posible, mientras la grasa sea de calidad alimenticia. La grasa puede bien ser una grasa animal o una grasa vegetal o ambas. Aunque grasas animales tales como manteca de cerdo o mantequilla tienen esencialmente valores nutricionales y calóricos iguales y se pueden usar de forma intercambiable, los aceites vegetales son altamente preferidos en la práctica de la presente invención debido a su fácil disponibilidad, facilidad de formulación, ausencia de colesterol y concentración inferior de ácidos grasos saturados. En una forma de realización, la presente composición comprende aceite de semilla de colza, aceite de maíz y/o aceite de girasol.

15 [0057] La grasa puede incluir una fuente de ácidos grasos de cadena media, tales como triglicéridos de cadena media (MCT, principalmente 8 a 10 átomos de carbono de largo), una fuente de ácidos grasos de cadena larga, tales como triglicéridos de cadena larga (LCT) y ácidos grasos ligados a fosfolípido tales como EPA o DHA ligados a fosfolípido, o cualquier combinación de los dos tipos de fuentes. Los MCT son beneficiosos porque ellos son fácilmente absorbidos y metabolizados en un paciente metabólicamente estresado. Por otra parte, el uso de MCT reducirá el riesgo de malabsorción de nutrientes. Fuentes de LCT, tal como aceite de colza, aceite de semilla de colza, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de coco, aceite de palma, aceite de linaza, aceite marino o aceite de maíz son beneficiosos porque es conocido que los LCT pueden modular la respuesta inmune en el cuerpo humano.

25 [0058] En una forma de realización específica, la grasa comprende de 30 a 60 % en peso de animal, grasa fúngica o de alga, de 40 a 70 % en peso de grasa vegetal y opcionalmente de 0 a 20 % en peso de MCT en base a la grasa total de la composición. La grasa animal preferiblemente comprende una cantidad baja de grasa láctea, es decir inferior a 6 % en peso, especialmente inferior a 3 % en peso en base a la grasa total. En particular, se usan una mezcla de aceite de maíz, aceite de huevo, y/o aceite de colza y cantidades específicas de aceite marino. Aceites de huevo, aceites de pescado y aceites de algas son una fuente preferida de grasas no vegetales. Especialmente para composiciones que se deben consumir por vía oral, para prevenir formación de sabores extraños y para reducir un regusto tipo pescado, se recomienda seleccionar ingredientes que son relativamente bajos en ácido docosahexaenoico (DHA), es decir menos de 6 % en peso, preferiblemente menos de 4 % en peso en base a la grasa total. Aceites marinos que contienen DHA están preferiblemente presentes en la composición según la invención en una cantidad inferior al 25 % en peso, preferiblemente inferior al 15 % en peso en base a la grasa total. Por otro lado, la inclusión de ácido eicosapentanoico (EPA) es altamente deseable para obtener el máximo efecto de salud. Por lo tanto, en otra forma de realización, la cantidad de EPA puede variar entre 4 % en peso y 15 % en peso, más preferiblemente entre 8 % en peso y 13 % en peso en base a la grasa total. La proporción en peso EPA:DHA es ventajosamente al menos 6:4, por ejemplo entre 2:1 y 10:1. En otra forma de realización, la cantidad de EPA es muy baja, tal como 0,1 a 1 % en peso, preferiblemente 0,3 % en peso o 0,6 % en peso, en base a la grasa total.

40 [0059] También, la composición nutricional según la invención puede beneficiosamente comprender un emulsionante. Emulsionantes comúnmente conocidos se pueden utilizar y generalmente el emulsionante contribuye al contenido energético de la grasa en dicha composición.

**Carbohidrato digerible**

45 [0060] En una forma de realización de la presente invención, la composición nutricional según la invención comprende además un carbohidrato digerible. Preferiblemente, el carbohidrato digerible proporciona entre 30 y 60 % del contenido energético total de la composición según la invención. El carbohidrato digerible puede comprender bien carbohidratos simples o complejos, o cualquier mezcla de estos. Adecuados para el uso en la presente invención son glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, palatinosa, jarabe de maíz, malta, maltosa, isomaltosa, almidón de maíz parcialmente hidrolizado, maltodextrinas, oligo y polisacáridos de glucosa.

55 [0061] La composición del carbohidrato digerible preferiblemente es tal de manera que se eviten viscosidades altas, demasiado dulzor, demasiado oscurecimiento (reacciones de Maillard) y excesivas osmolaridades. Viscosidades aceptables y osmolaridades se pueden conseguir por ajuste de la longitud de cadena media (grado medio de polimerización, DP) de los carbohidratos digeribles entre 1,5 y 6, preferiblemente entre 1,8 y 4. Para evitar demasiado dulzor, el nivel total de sacarosa y fructosa es preferiblemente menor del 60 %, más preferiblemente menor del 52 %, más preferiblemente menor del 40 % del peso del carbohidrato, especialmente del carbohidrato digerible. Carbohidratos digeribles de cadena larga como el almidón, fracciones de almidón e hidrolizados de almidón moderados ( $DE > 1$ ,  $DE < 20$ ), también puede estar presentes, preferiblemente en una cantidad inferior a 25 % en peso, especialmente menor de 15 % en peso del carbohidrato digerible, y menos de 6 g/100 ml, preferiblemente menos de 4 g/100 ml de la composición enteral total según la invención.

[0062] En una forma de realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrosa con un alto DE (equivalente de dextrosa). En una forma de realización el carbohidrato digerible incluye maltodextrosa con un DE de > 10, preferiblemente un DE de > 20, más preferiblemente > 30 o incluso > 40, tal como un DE aproximadamente 47. En una forma de realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrosa con un DE > 10 y sacarosa.

[0063] Sorprendentemente, el uso de maltodextrosa conduce a pocos o ningún producto de reacción de Maillard por calentamiento. Sin estar ligado a ninguna explicación, este efecto se puede atribuir al hecho de que la estructura micelar compacta de la caseína micelar ofrece pocos sitios de reacción de lisina para una reacción de Maillard. En una forma de realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrosa con un alto DE en una cantidad de al menos 35 % en peso, preferiblemente al menos 50 % en peso, preferiblemente al menos 65 % en peso, preferiblemente al menos 90 % en peso del peso total de carbohidrato digerible. En una forma de realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrosa con un bajo DE de 2 a 20. En una forma de realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrosa con un bajo DE de 2 a 10, preferiblemente con un bajo DE de aproximadamente 2. En una forma de realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrosa con un bajo DE en una cantidad inferior a 35 % en peso, preferiblemente menos del 20 % en peso, preferiblemente menos del 10 % en peso del carbohidrato digerible. Maltodextrosa con un bajo DE también se puede denominar maltodextrina. En otra forma de realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrosa con un alto DE, preferiblemente un DE de > 20, preferiblemente > 30 o incluso > 40, de la forma más preferible un DE de aproximadamente 47 en combinación con maltodextrosa con un bajo DE, preferiblemente un bajo DE de 2 a 20, más preferiblemente un bajo DE de 2 a 10, de la forma más preferible con un bajo DE de aproximadamente 2. Como es conocido, la maltodextrosa con un bajo DE, tal como de aproximadamente 2, da lugar a una alta viscosidad. La maltodextrosa con un alto DE, tal como de aproximadamente 47 da lugar a una viscosidad baja, pero es muy dulce. La combinación de ambas maltodextrinas optimiza el equilibrio entre dulzor y viscosidad. En una forma de realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye al menos 65 % en peso, preferiblemente al menos 90 % en peso, en base al peso total de carbohidrato digerible de maltodextrosa con un DE >40, preferiblemente con un DE de aproximadamente 47 y de 0 a 10 % en peso de maltodextrosa con un DE 2 a 10, preferiblemente con un DE de aproximadamente 2.

[0064] En otra forma de realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye trehalosa. Es uno de los objetos principales de la invención proporcionar una composición nutricional con una viscosidad baja. La sacarosa es muy bien adecuada para este tipo de fin, pero da lugar a composiciones muy dulces, que en general desagradan al consumidor. Maltodextrosa con un bajo DE, tal como de aproximadamente 2, no sufre este inconveniente, pero da lugar a una alta viscosidad. La maltodextrosa con un alto DE, tal como de aproximadamente 47 da lugar a una viscosidad baja, pero es de nuevo muy dulce, y da lugar además a las reacciones de Maillard no deseadas. La trehalosa es una elección preferida de carbohidrato, ya que esta da lugar a una viscosidad baja, ninguna reacción de Maillard no deseada y tiene un dulzor de aproximadamente la mitad que la sacarosa. En una forma de realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye trehalosa en una cantidad de 20 % a 60 % del peso del carbohidrato, en una cantidad de 20 % a 45 %, más preferiblemente en una cantidad de 25 % a 45 % del peso del carbohidrato digerible.

#### **Vitaminas, minerales y oligoelementos**

[0065] La composición según la invención puede contener una variedad de vitaminas, minerales y oligoelementos.

[0066] En una forma de realización de la presente invención, la composición según la invención proporciona todas las vitaminas necesarias, la mayor parte de los minerales y oligoelementos. Por ejemplo, la composición según la invención proporciona preferiblemente 6 mg de zinc por 100 ml de la composición que es beneficiosa para reparación del tejido en un paciente en curación. Preferiblemente, la composición según la invención (también) proporciona 25 mg de vitamina C por 100 ml de la composición para ayudar a pacientes con requisitos de curación más severos. Además, preferiblemente, la composición según la invención (también) proporciona 2,25 mg hierro por 100 ml de la composición. El hierro es beneficioso para mantener los fluidos corporales al igual que funciones del sistema circulatorio en un paciente mayor.

[0067] La invención implica que una composición según la presente invención puede contener niveles de sodio y/o potasio fuera de los niveles de legislación FSMP (alimentos para fines médicos especiales).

#### **Carbohidratos no digeribles**

[0068] La composición nutricional enteral según la invención puede opcionalmente ser enriquecida con carbohidratos no digeribles (fibras dietéticas) tales como fructo-oligosacáridos o inulina. En una forma de realización de la presente invención, la composición según la invención comprende 0,5 g/100 ml a 6 g/100 ml de carbohidratos no digeribles. Las fibras dietéticas incluyen oligosacáridos no digeribles con un DP de 2 a 20, preferiblemente 2 a 10. Más preferiblemente, estos oligosacáridos no contienen cantidades sustanciales (menos de 5 % en peso) de sacáridos fuera de estos rangos de DP, y

ellos son solubles. Estos oligosacáridos pueden comprender fructo-oligosacáridos (FOS), trans-galacto-oligosacáridos (TOS), xilo-oligosacáridos (XOS), oligosacáridos de soja, y similares. Opcionalmente, compuestos de peso molecular también más alto tales como inulina, polisacáridos de soja, polisacáridos de acacia (fibra de acacia o goma arábiga), celulosa, almidón resistente y similares se pueden incorporar en la composición según la invención. La cantidad de fibra insoluble tal como celulosa es preferiblemente inferior a un 20 % en peso de la fracción de fibra dietética de la composición según la invención, y/o inferior 0,6 g/100 ml. La cantidad de polisacáridos espesantes tales como carragenanos, xantanos, pectinas, galactomananos y otros polisacáridos indigeribles de peso molecular alto (DP > 50) es preferiblemente baja, es decir menos del 20 % del peso de la fracción de fibra, o menos de 1 g/100 ml. En cambio, polisacáridos hidrolizados tales como pectinas hidrolizadas y galactomananos pueden ser incluidos ventajosamente.

[0069] Un componente de fibra preferido es un oligosacárido indigerible con una longitud de cadena (DP) de 2 a 10, por ejemplo Fibersol® (oligoglucosa resistente), en particular Fibersol® hidrogenado, o una mezcla de oligosacáridos con un DP de 2 a 10, tales como fructo-oligosacáridos o galacto-oligosacáridos, que pueden también contener una pequeña cantidad de sacáridos más altos (p. ej. con un DP de 11 a 20). Tales oligosacáridos preferiblemente comprenden 50 % en peso a 90 % en peso de la fracción de fibra, o 0,5 g/100 ml a 3 g/100 ml de la composición según la invención. Otros componentes fibrosos adecuados incluyen sacáridos que tienen digestibilidad sólo parcial.

[0070] En una forma de realización particular, la composición según la invención comprende uno o más fructo-oligosacáridos, inulina, polisacáridos de acacia, polisacáridos de soja, celulosa y almidón resistente.

[0071] En otra forma de realización de la presente invención, la composición según la invención puede comprender una mezcla de oligosacáridos ácidos y neutros como se describe en WO 2005/039597 (N.V. Nutricia). Más en particular, el oligosacárido ácido tiene un grado de polimerización (DP) entre 1 y 5000, preferiblemente entre 1 y 1000, más preferiblemente entre 2 y 250, incluso más preferiblemente entre 2 y 50, de la forma más preferible entre 2 y 10. Si una mezcla de oligosacáridos ácidos con grados diferentes de polimerización se usan, el DP medio de la mezcla de oligosacárido ácido está preferiblemente entre 2 y 1000, más preferiblemente entre 3 y 250, incluso más preferiblemente entre 3 y 50. El oligosacárido ácido puede ser un carbohidrato heterogéneo u homogéneo. Los oligosacáridos ácidos se pueden preparar a partir de pectina, pectato, alginato, condroitina, ácidos hialurónicos, heparina, heparano, carbohidratos bacterianos, sialoglicanos, fucoídano, fucooligosacáridos o carragenina, y son preferiblemente obtenidos a partir de pectina o alginato. Los oligosacáridos ácidos se pueden preparar por los métodos descritos en WO 01/60378, que es por la presente incorporada por referencia. El oligosacárido ácido es preferiblemente obtenido a partir de pectina alta metoxilada, que se caracteriza por un grado de metoxilación por encima de 50 %. Como se utiliza en este caso "grado de metoxilación" (también denominado como DE o "grado de esterificación") pretende significar la extensión a la que grupos de ácido carboxílico libres contenidos en la cadena de ácido poligalacturónico han sido esterificados (p. ej. por metilación). Los oligosacáridos ácidos están preferiblemente caracterizados por un grado de metoxilación por encima de 20 %, preferiblemente por encima de 50 % incluso más preferiblemente por encima de 70 %. Preferiblemente los oligosacáridos ácidos tienen un grado de metilación por encima de 20 %, preferiblemente por encima de 50 % incluso más preferiblemente por encima de 70 %. El oligosacárido ácido es preferiblemente administrado en una cantidad de entre 10 mg y 100 gramo al día, preferiblemente entre 100 mg y 50 gramos al día, incluso más entre 0,5 y 20 gramos al día.

[0072] El término oligosacáridos neutros como se usa en la presente invención se refiere a sacáridos que tienen un grado de polimerización de unidades de monosa superior a 2, más preferiblemente superior a 3, incluso más preferiblemente superior a 4, de la forma más preferible superior a 10, que no son digeridos o sólo parcialmente en el intestino por la acción de ácidos o enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo superior humano (intestino delgado y estómago) pero que se fermentan por la flora intestinal humana y preferiblemente carecen de grupos ácidos. El oligosacárido neutro es estructuralmente (químicamente) diferente del oligosacárido ácido. El término oligosacáridos neutros como se usa en la presente invención preferiblemente se refiere a sacáridos que tienen un grado de polimerización del oligosacárido inferior a 60 unidades de monosa, preferiblemente inferior a 40, incluso más preferiblemente inferior a 20, de la forma más preferible inferior a 10. El término unidades de monosa se refiere a unidades con una estructura anular cerrada, preferiblemente hexosa, por ejemplo la piranosa o formas de furanosa. El oligosacárido neutro preferiblemente comprende al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 % de unidades de monosa seleccionadas del grupo que consiste en manosa, arabinosa, fructosa, fucosa, ramnosa, galactosa,  $\alpha$ -D-galactopiranosa, ribosa, glucosa, xilosa y derivados de estos, calculado en el número total de unidades de monosa contenidos en esto. Oligosacáridos neutros adecuados son preferiblemente fermentados por la flora intestinal. Preferiblemente el oligosacárido es seleccionado del grupo que consiste en: celobiosa (4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-glucosa), celodextrinas ((4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil)<sub>n</sub>-D-glucosa), B-ciclodextrinas (moléculas cíclicas de D-glucosa  $\alpha$ -1-4-enlazada; hexámero de  $\alpha$ -ciclodextrin, heptámero de  $\beta$ -ciclodextrina y octámero de  $\gamma$ -ciclodextrina), dextrina indigerible, gentiooligosacáridos (mezcla de residuos de glucosa enlazados  $\beta$ -1-6, algunos enlaces 1-4), glucooligosacáridos (mezcla de  $\alpha$ -D-glucosa), isomaltoligosacáridos (residuos de glucosa lineales enlazados  $\alpha$ -1-6 con algunos enlaces 1-4), isomaltosa (6-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-glucosa); isomaltrosa (6-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-6)- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-glucosa), panosa (6-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-6)- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-4)-D-glucose), leucrosa (5-O- $\alpha$ -D-

glucopiranosil-D-fructopiranosido), palatinosa o isomaltulosa (6-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-fructosa), teanderosa (O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-6)-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-2)-B-D-fructofuranósido), D-agatosa, D-*lixo*-hexulosa, lactosacarosa (O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-4)-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-2)- $\beta$ -D-fructofuranósido),  $\alpha$ -galactooligosacáridos incluyendo rafinosa, estaquirosa y otros oligosacáridos de soja (O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1-6)- $\alpha$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -D-fructofuranósido),  $\beta$ -galactooligosacáridos o transgalacto-oligosacáridos  $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-6)-[ $\beta$ -D-glucopiranosil]<sub>n</sub>-(1-4)  $\alpha$ -D glucosa), lactulosa (4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-fructosa), 4'-galatosilactosa (O-D-galactopiranosil-(1-4)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1-4)-D-glucopiranosil), galactooligosacárido sintético (neogalactobiosa, isogalactobiosa, galsucrosa, isolactosa I, II y III), fructanos - tipo levano ( $\beta$ -D-(2 $\rightarrow$ 6)-fructofuranosil)<sub>n</sub>  $\alpha$ -D-glucopiranosido), fructanos - tipo inulina ( $\beta$ -D-((2 $\rightarrow$ 1)-fructofuranosil)<sub>n</sub>  $\alpha$ -D-glucopiranosido), 1 f- $\beta$ -fructofuranosilnistosa ( $\beta$ -D-((2 $\rightarrow$ 1)-fructofuranosil)<sub>n</sub> B-D-fructofuranósido), xilooligosacáridos (B-D-((1 $\rightarrow$ 4)-xilosa)<sub>n</sub>, lafinosa, lactosacarosa y arabinooligosacáridos.

[0073] Según otra forma de realización preferida el oligosacárido neutro es seleccionado del grupo que consiste en fructanos, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos de dextrinas indigeribles (incluyendo transgalactooligosacáridos), xilooligosacáridos, arabinooligosacáridos, glucooligosacáridos, mananoligosacáridos, fucooligosacáridos y sus mezclas derivadas. De la forma más preferible, el oligosacárido neutro es seleccionado del grupo que consiste en fructooligosacáridos, galactooligosacáridos y transgalactooligosacáridos.

[0074] Oligosacáridos adecuados y su métodos de producción están además descritos en Laere K.J.M. (Laere, K.J.M., Degradation of structurally different non-digestible oligosaccharides by intestinal bacteria: glycosylhydrolases of *Bi. adolescentis*. PhD-thesis (2000), Wageningen Agricultural University, Wageningen, Países Bajos), todo el contenido de la cual es por la presente incorporado por referencia. Transgalactooligosacáridos (TOS) son por ejemplo vendidos bajo la marca registrada Vivinal™ (Borculo Domo Ingredients, Países Bajos). Dextrina indigerible, que se puede producir por pirólisis de almidón de maíz, comprende (enlaces glucosídicos  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) y  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)), como están presentes en el almidón natural, y contiene enlaces 1 $\rightarrow$ 2 y 1 $\rightarrow$ 3 y levoglucosano. Debido a estas características estructurales, la dextrina indigerible contiene partículas ramificadas bien desarrolladas que son parcialmente hidrolizadas por enzimas digestivas humanas. Otras numerosas fuentes comerciales de oligosacáridos indigeribles están fácilmente disponibles y conocidas por experto en la materia. Por ejemplo, transgalactooligosacáridos están disponibles de Yakult Honsha Co., Tokio, Japón. Oligosacáridos de semilla de soja están disponibles de Calpis Corporation distribuidos por Ajinomoto U.S.A. Inc., Teaneck, N.J.

[0075] En otra forma de realización preferida, la composición según la invención comprende un oligosacárido ácido con un DP entre 2 y 250, obtenido a partir de pectina, alginato, y sus mezclas derivadas; y un oligosacárido neutro, seleccionado del grupo que consiste en fructanos, fructooligosacáridos, dextrinas indigeribles, galactooligosacáridos que incluyen transgalactooligosacáridos, xilooligosacáridos, arabinooligosacáridos, glucooligosacáridos, mananoligosacáridos, fucooligosacáridos, y sus mezclas derivadas.

[0076] En otra forma de realización preferida la composición según la invención comprende dos oligosacáridos neutros químicamente diferentes. Se descubrió que la administración de oligosacáridos ácidos combinada con dos oligosacáridos neutros químicamente diferentes proporciona un efecto estimulador inmunológico sinérgico óptimo. Preferiblemente la composición según la invención comprende:

- unos oligosacáridos ácidos tal como se ha definido anteriormente;
- un oligosacárido neutro basado en galactosa (del que más del 50 % de las unidades de monosa son unidades de galactosa), preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en galactooligosacárido y transgalactooligosacárido; y
- una fructosa y/o oligosacárido neutro basado en glucosa (del que más del 50 % de las unidades de monosa son fructosa y/o glucosa, preferiblemente unidades de fructosa), preferiblemente inulina, fructano y/o fructooligosacárido, de la forma más preferible fructooligosacárido de cadena larga (con un DP medio de 10 a 60).

[0077] La mezcla de oligosacáridos ácidos y neutros es preferiblemente administrada en una cantidad de entre 10 mg y 100 gramo al día, preferiblemente entre 100 mg y 25 gramos al día, incluso más preferiblemente entre 0,5 y 20 gramo al día.

### Viscosidad y osmolaridad

[0078] En el contexto de esta invención, la viscosidad se mide en un reómetro rotacional que utiliza una geometría de balancín a 20 °C a una velocidad de cizalladura de 50 s<sup>-1</sup>.

[0079] En una forma de realización de la presente invención, la viscosidad de la composición nutricional enteral es inferior a 200 mPa.s, más preferiblemente menos de 150 mPa.s, más preferiblemente menos de 120 mPa.s, más preferiblemente menos de 100 mPa.s, más preferiblemente menos de 80 mPa.s, y de la forma más preferible 50 mPa.s. Una viscosidad baja es ideal para administrar por vía oral la composición nutricional enteral líquida según la invención porque una persona puede fácilmente consumir una porción con una viscosidad baja tal como se visualiza por la presente invención. Esto es también

## ES 2 453 983 T3

ideal para dosis unidad que son alimentadas por tubo.

[0080] En otra forma de realización de la presente invención, la viscosidad de la composición nutricional enteral es más de 200 mPa.s, más preferiblemente más de 400 mPa.s, más preferiblemente más de 600 mPa.s. Una alta viscosidad es ideal para producir un pudín, un gel, o una composición semilíquida o semisólida. Esto es también ideal para dosis de unidad que se pueden coger con cuchara.

[0081] En una forma de realización de la presente invención, la osmolaridad de la composición es preferiblemente inferior a 1200 mOsm/L, más preferiblemente inferior a 900 mOsm/L, más preferiblemente inferior a 800 mOsm/L, y más preferible inferior a 700 mOsm/L.

### Unidad de dosificación

[0082] La composición nutricional enteral según la invención puede tener la forma de un alimento completo, es decir este puede reunir todas las necesidades nutricionales del usuario. Como tal, contiene preferiblemente 1200 a 2500 kcal por dosificación diaria. Las cantidades de dosificación diaria son dadas respecto al suministro de energía diaria de 2000 kcal a un adulto saludable con un peso corporal de 70 kg. Para personas de diferente condición y peso corporal diferente, los niveles deberían ser adaptados correspondientemente. Se entiende que la toma de energía media diaria es preferiblemente aproximadamente 2000 kcal. El alimento completo puede estar en forma de múltiples unidades de dosis, por ejemplo de 4 (250 ml/unidad) a 40 (20 ml/unidad) al día para un suministro de energía de 2000 kcal/día utilizando una composición nutricional enteral según la invención de 2,0 kcal/ml.

[0083] La composición nutricional enteral puede también ser un suplemento alimenticio, por ejemplo para ser usado además de un alimento no médico. Preferiblemente como un suplemento, la composición nutricional enteral contiene por dosificación diaria menos de 1500 kcal, en particular como un suplemento, la composición nutricional enteral contiene 400 a 1000 kcal por dosis diaria. El suplemento alimenticio puede estar en forma de unidades de dosificación múltiples, por ejemplo de 2 (250 ml/unidad) a 10 (50 ml/unidad) al día para un suministro de energía de 1000 kcal/día utilizando una composición nutricional enteral según la invención de 2,0 kcal/ml.

[0084] En una forma de realización de la presente invención, una dosis unitaria comprende cualquier cantidad de la composición nutricional enteral según la invención entre 10 ml y 250 ml, los valores finales de este rango incluidos, preferiblemente cualquier cantidad entre 25 ml y 200 ml, los valores finales de este rango incluidos, más preferiblemente cualquier cantidad entre 50 ml y 150 ml, los valores finales de este rango incluidos, de la forma más preferible aproximadamente 125 ml. Por ejemplo, a una persona que recibe dosis unidad de 50 ml se le pueden dar 10 dosis unidad al día para proporcionar un soporte nutricional utilizando una composición nutricional enteral según la invención de 2,0 kcal/ml. Alternativamente a una persona que recibe 125 ml de dosis de unidad se le puede dar 4 o 5 o 6 o 7 u 8 dosificaciones de unidad al día para proporcionar soporte nutricional utilizando una composición nutricional enteral según la invención de 2,0 kcal/ml. Tales pequeñas unidades de dosificación son preferidas debido a una mejor adaptabilidad.

[0085] En una forma de realización de la presente invención, la composición está provista en una forma preparada para usar y no requiere reconstitución o mezcla antes del uso. La composición según la invención puede ser administrada por tubo o por vía oral. Por ejemplo, la composición según la invención se puede proporcionar en una lata, en aguja, y gotero. No obstante, una composición se puede proporcionar a una persona en necesidad de esta en forma de polvo, adecuada para la reconstitución utilizando una solución acuosa o agua de manera que la composición se produce según la invención. Así en una forma de realización de la presente invención, la presente composición está en forma de polvo, acompañada con instrucciones para disolver o reconstituir en una composición acuosa o agua para llegar a la composición enteral nutricional según la presente invención. En una forma de realización de la presente invención, la presente composición enteral nutricional puede así ser obtenida disolviendo o reconstituyendo un polvo, preferiblemente en una composición acuosa, en particular agua.

[0086] En una forma de realización de la presente invención, la composición según la invención se puede utilizar como una base para la fabricación de una composición nutricional semi-sólida, tal como una crema, un pudín, un flan, un caldo, un helado, o una gelatina. Con este fin, la composición según la invención se procesa para convertir la composición de viscosidad baja según la invención en una más sólida o viscosa, por ejemplo añadiendo espesantes o agentes gelificantes y además procesar la mezcla en el producto final. Espesantes y/o agentes gelificantes pueden también estar presentes en la formulación desde una fase más anterior del proceso, o incluso disueltos con los nutrientes en el inicio del proceso.

[0087] En una forma de realización de la presente invención, la composición según la invención es empaquetada. El empaquetamiento puede tener cualquier forma adecuada, por ejemplo una caja de cartón en forma de bloque, por ejemplo para ser vaciado con una paja; una caja de cartón o vaso de precipitados de plástico con tapa retirable; una botella de pequeño tamaño por ejemplo en el rango 80 ml a 200 ml, y tazas pequeñas por ejemplo en el rango 10 ml a 30 ml. Otro

modo de empaquetamiento adecuado es la inclusión de volúmenes pequeños de (p. ej. 10 ml a 20 ml) en cascos o cápsulas sólidos o semi-sólidos comestibles, por ejemplo revestimientos tipo gelatina y similares. Otro modo de empaquetamiento adecuado es un polvo en un contenedor, por ejemplo un sobre, preferiblemente con instrucciones para disolver o reconstituir en una composición acuosa o agua.

## 5 **EXPERIMENTAL**

[0088] Lo siguiente sirve para resaltar los conceptos inventivos. No obstante, la invención no se considera ligada por ninguna de las teorías e hipótesis para explicar los fenómenos observados dados a continuación.

[0089] El uso de sistemas de leche concentrada simplificados, en vez de recetas de nutrición médica completa (es decir, sistemas que contienen altas concentraciones de iones mono y bivalentes, carbohidratos, y grasa), es una vía eficaz para determinar la influencia de fosfatos y citrato en la voluminosidad de micelas de caseína. Hemos seleccionado una fuente de proteína comercial, principalmente aislados de caseína micelar (**MCI**), que contiene una cantidad insignificante de proteína de lactosuero, y preparado soluciones al 9 % p/v con alta proteína a las que fosfato y citrato en un rango de concentración grande fueron adicionados. En esta solicitud, revelamos el efecto de orto y polifosfatos y citrato en la voluminosidad de micelas de caseína. Viscosidad y mediciones de ultracentrifugado fueron hechas para investigar cambios en la solución total y voluminosidad de las micelas de caseína, mientras que turbidez y mediciones de actividad de ión de calcio fueron hechas para investigar cambios dentro de las micelas de caseína. En esta especificación, sólo usamos los términos hinchamiento o contracción o disociación de las micelas y liberación no específica de caseína cuando nosotros discutimos el cambio en la voluminosidad de las micelas de caseína, ya que la liberación de caseína específica no fue determinada en este estudio.

## 25 **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 25 **Preparación de la muestra**

[0090] Para preparar una solución de aislado de caseína micelar 9 % p/v, MCI (Nutripro™, DairyGold Food Ingredients, Cork., Irlanda), polvo de proteína fue disuelto en 80 % del agua total desmineralizada a temperatura ambiente, mientras se agita a 600 r.p.m. con un agitador de laboratorio (RW 20.n, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania). Una solución 9 % p/v MCI contiene aproximadamente 8,5 mmol·L<sup>-1</sup> sodio, 4,2 mmol·L<sup>-1</sup> potasio, 2,5 mmol·L<sup>-1</sup> cloruro, 59,8 mmol·L<sup>-1</sup> calcio, 43,5 mmol·L<sup>-1</sup> fósforo, y 3,1 mmol·L<sup>-1</sup> magnesio. La solución de proteína fue homogenizada con un homogenizador de laboratorio de alta presión (NS2006L, GEA Niro Soari S.P.A., Parma, Italia) a 350+50 bar para obtener micelas de caseína únicas con un diámetro D<sub>[4,3]</sub> de 0,15 µm como se determina con un Mastersizer 2000 que contiene un baño de agua hydro 2000G (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). La temperatura de la solución de proteína fue 40°C después de la homogeneización.

[0091] Posteriormente, rangos de concentración de 0-105 mEq·L<sup>-1</sup> monofosfato de uridina disodio (Yamasa Corporation, Chiba, Japón), hidrogenofosfato de disodio (Merck & Co. Inc, Darmstadt Alemania), hexametfosfato de sodio (VWR International Ltd, Poole, Inglaterra), ácido fítico dodecasodio sal hidratada (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemania), o citrato de trisodio (Gadot Biochemical Industries Ltd., Haifa Bay, Israel) fueron adicionados. Las concentraciones se basaron en miliequivalentes de los fosfatos y citrato para añadir una cantidad similar de cargas a las muestras. Sólo fuentes de sodio fueron usadas, debido a que el tipo de contraión también puede influir en las interacciones proteína-mineral (Fox, Harper, Holsinger & Pallansch, 1965). El pH de las muestras fue ajustado a 7,0 ± 0,05 con 1 mol·L<sup>-1</sup> de hidróxido sódico (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemania) o 1 mol·L<sup>-1</sup> de ácido clorhídrico (Merck & Co. Inc, Darmstadt, Alemania) después de agitar durante 30 min. Finalmente, las muestras se llevaron a la concentración de proteína final de 9 % p/v con agua desmineralizada. Las muestras fueron almacenadas durante toda la noche a 20 °C durante aproximadamente 17 h. El pH de las muestras fue ajustado a 7,0 ± 0,05 la mañana siguiente, en caso de que hayan ocurrido desviaciones durante el almacenamiento. Las desviaciones ocurridas durante el almacenamiento fueron pequeñas y las muestras no mostraron ninguna alteración visible. Las muestras fueron analizadas por duplicado en cuanto a su pH final, actividad de ión de calcio, turbidez, y viscosidad. Las muestras fueron también ultracentrifugadas, y el granulado y sobrenadante fueron recogidos, pesados y analizados en cuanto a su contenido de proteína.

### **Actividad de ión calcio**

[0092] La actividad de ión calcio fue medida con un dispositivo de medida de calcio Mettler Toledo Seven Multi™ (con un pH-metro Inlab® Expert Pro) (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza) utilizando un electrodo Orion 9300BH y un electrodo de referencia Orion 900100. Calibración de los electrodos, mediciones de muestra, y cálculos de las actividades de ión de calcio fueron realizados como se describe en De Kort et al. (2009).

### 60 **Turbidez**

[0093] La turbidez fue medida con un espectrofotómetro (4053 Kinetics, LKB Biochrom, Midland, Canadá). Cubetas plásticas con un paso de 1 cm fueron usadas. Mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando una longitud de onda de 700 nm. Las muestras fueron diluidas a 10 % de su sustancia seca inicial en agua desmineralizada para estar en el límite de detección del espectrofotómetro.

5

#### Viscosidad

[0094] Las muestras fueron analizadas a 20 °C con un reómetro MCR 300 (Anton Paar Physica, Graz, Austria) utilizando geometría de balancín (cilindro CC27). La viscosidad fue medida a índices de corte de  $1 \text{ s}^{-1}$  a  $1000 \text{ s}^{-1}$ . La mayor parte de las muestras se comportaron próximas a los líquidos newtonianos.

10

#### Ultracentrifugado

[0095] El ultracentrifugado fue hecho con una ultracentrifugadora Centrikon T-1080A (Kontron Instruments Ltd., Milano, Italia) con rotor de titanio de ángulo fijo (tipo TFT 45,94). Las muestras fueron ultracentrifugadas a 150 000 g a 20°C durante 60 minutos. El sobrenadante y las fracciones de granuloso fueron separadas, pesadas y analizadas en cuanto a su contenido de proteína.

15

#### Contenido de proteína

[0096] El contenido de proteína fue determinado en los gránulos ultracentrifugados, sobrenadantes y muestras totales. El analizador de nitrógeno y de proteína NA 2100 (CE Instruments, Milan, Italia) fue usado para determinar el contenido de nitrógeno en las muestras con el método Dumas. Un factor de conversión de 6,38 fue usado para convertir nitrógeno en el contenido de proteína. Aproximadamente 100 mg de muestra fueron pesados en una taza de estaño. La muestra fue secada en un horno a 70 °C durante 2,5 horas. Después, 25 mg de absorbentes (82009101, Interscience B.V., Breda, el Países Bajos) fueron añadidos y la taza fue cerrada. Las tazas fueron colocadas en el automuestreador y analizadas en cuanto a su contenido de nitrógeno.

20

25

#### Voluminosidad

[0097] La voluminosidad de la micela fue calculada de dos formas: a partir de la viscosidad y a partir de las mediciones de ultracentrifugado. Los valores de viscosidad fueron insertados en la ecuación del Eilers (Eilers; 1941) para calcular la fracción de volumen de las micelas en la solución. La voluminosidad de la micela fue calculada a partir de la fracción de volumen. La viscosidad medida a una velocidad de cizalladura de  $50 \text{ s}^{-1}$  fue elegida, ya que esta velocidad de cizalladura corresponde al corte organoléptico durante bebida. Una fracción de volumen de empaquetamiento máxima ( $\Phi_{\text{max}}$ ) de 0,79 (Snoeren et al., 1982) fue usada en los cálculos de voluminosidad. La viscosidad del electrolito de fondo ( $\eta_0$ ) se estableció en 1 mPa.s.

30

35

[0098] La voluminosidad de la micela fue también calculada a partir de los datos de ultracentrifugado por división del volumen de granuloso total ( $\text{mL.g}^{-1}$ ) por la cantidad de proteína en el granuloso ( $\text{g.g}^{-1}$ ). El volumen de granuloso total fue calculado como se describe por Van Hooydonk, Hagedoorn & Boerrigter (1986). El volumen que los minerales ocupan en el granuloso es insignificante, ya que las proteínas dominan el volumen de granuloso. La voluminosidad se expresa en  $\text{mL.g}^{-1}$ .

40

[0099] Se verificó que las voluminosidades de las micelas calculadas a través de mediciones de viscosidad se correspondían con las voluminosidades de las micelas obtenidas de ultracentrifugado. Los resultados representados debajo se basan en mediciones de viscosidad.

45

#### Lista de las figuras

[0100]

50

Figura 1: Equilibrios de sal entre iones de calcio libres, complejos quelantes de calcio, y micelas de caseína en los sistemas lácteos. Quelantes en este estudio son  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , SHMP, SP, y TSC.

Figura 2: Actividad de ión calcio de una solución 9 % p/v MCI en función de la concentración de fosfato y de citrato. Los símbolos representan: (●)  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ; (◆)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; (■) SHMP (A) SP; (x) TSC.

55

Figura 3: La Viscosidad a velocidad de cizalladura  $50 \text{ s}^{-1}$  de una solución 9 % p/v de MCI en función de la concentración de fosfato y de citrato. Los símbolos representan: (●)  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ; (◆)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; (■) SHMP (▲) SP; (x) TSC

Figura 4: Voluminosidad calculada con la ecuación Eilers, a velocidad de cizalladura  $50 \text{ s}^{-1}$  de una solución 9 % p/v de MCI en función de la concentración de fosfato y de citrato. Los símbolos representan: (●)  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ; (◆)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; (■) SHMP (A) SP; (x) TSC.

60

Figura 5: cantidad de granulado ultracentrifugado de solución 9 % p/v MCI en función de la concentración de fosfato y de citrato. Los símbolos representan: (●) Na<sub>2</sub>UMP; (◆) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; (■) SHMP (A) SP; (x) TSC.

Figura 6: Cantidad de proteína en el granulado ultracentrifugado de una solución 9 % p/v MCI en función de la concentración de fosfato y de citrato. Los símbolos representan: (●) Na<sub>2</sub>UMP; (◆) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; (■) SHMP (A) SP; (x) TSC.

Figura 7: Correlación entre volúmenes basados en mediciones de viscosidad y de ultracentrifugado. Los símbolos representan: (●) Na<sub>2</sub>UMP; (◆) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; (■) SHMP (A) SP; (x) TSC; (-) x=y.

Figura 8: Turbidez de una solución 9 % p/v MCI diluida al 10 % de su sustancia seca inicial en el agua desmineralizada en función de la concentración de fosfato y concentración de citrato. Los símbolos representan: (●) Na<sub>2</sub>UMP; (◆) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; (■) SHMP (A) SP; (x) TSC.

### Resultados y discusión

[0101] La actividad de ión de calcio se reduce por la adición de los fosfatos y citrato (figura 2), porque los iones de calcio son quelatados de la fase de suero y micelas de caseína. Una reducción comparable en la actividad de ión de calcio fue medida para SHMP, SP, TSC, y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. La viscosidad aumentó a una extensión comparable después de la adición de SP, TSC, y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (figura 3). El aumento más grande en la viscosidad fue medido para las muestras SHMP, que se debe a la capacidad de SHMP de reticular (Kocak & Zadow, 1985; Mizuno & Lucey, 2007; Vujicic et al., 1968). Esto resultó en la formación de gel por adición superior a 45 mEq·L<sup>-1</sup> SHMP. La actividad de ión calcio disminuyó ligeramente por adición de Na<sub>2</sub>UMP, porque Na<sub>2</sub>UMP es un ligante de calcio débil (De Kort et al., 2009). Por consiguiente, la viscosidad fue de forma insignificante afectada.

[0102] Los valores de viscosidad (a una velocidad de cizalladura de 50 s<sup>-1</sup>) fueron insertados en la fórmula de Eilers para calcular la voluminosidad de la micela de caseína. Las soluciones fueron de adelgazamiento al corte a concentraciones de quelante más altas ( $\geq 75$  mEq·L<sup>-1</sup> para SP, TSC y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y  $\geq 45$  mEq·L<sup>-1</sup> para SHMP), cuando viscosidades más altas fueron medidas. Esto parece hacer interpretación a través de viscosidades a 50 s<sup>-1</sup> ambiguo. No obstante, en esta región de alta viscosidad, la sensibilidad de la fracción de volumen calculada de ecuación de Eilers al valor de viscosidad real es bajo: las fracciones de volumen son próximas al valor  $\Phi_{\text{máx}}$  para empaquetamiento máximo. Los resultados en la figura 4 muestran que la micela de caseína en una solución 9 % p/v MCI tiene una voluminosidad de 4.5 mL·g<sup>-1</sup>. Walstra et al. (2006) midió una voluminosidad de 4 mL·g<sup>-1</sup> para micelas de caseína en leche. La adición de Na<sub>2</sub>UMP tiene un efecto insignificante en la voluminosidad de la micela de caseína. Fracciones de volumen más altas fueron calculadas para muestras SHMP que para los otros fosfatos y citrato debido a gelificación de las muestras SHMP. Para muestras SHMP, por consiguiente, la voluminosidad de la micela de caseína no se puede deducir de la viscosidad a través de ecuación de Eilers, porque las interacciones entre las micelas no son ya sólo de naturaleza hidrodinámica. El efecto de SP, TSC, y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en la viscosidad y así la voluminosidad derivada fueron comparables. La voluminosidad de la micela de caseína aumentó de 4,5 mL·g<sup>-1</sup> ( $\Phi=0,41$ ) a aproximadamente 7,5 mL·g<sup>-1</sup> ( $\Phi=0,69$ ) por adición de 105 mEq·L<sup>-1</sup> SP, TSC, o Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. La adición de SP, TSC, y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ni reticuló micelas de caseína ni provocó la gelificación en el rango de concentración estudiada, que concuerda con el comportamiento de TSC en la leche (Mizuno & Lucey, 2005).

[0103] La voluminosidad de la micela de caseína puede también ser deducida a partir de fracciones ultracentrifugadas por división del volumen de granulado total por la cantidad de proteína en el granulado. La cantidad de granulado y cantidad de proteína en el granulado después del ultracentrifugado se muestran en las figuras 5 y 6, respectivamente. La cantidad de granulado ultra centrifugado está influida por el tiempo y aceleración de centrifugado, la densidad y viscosidad de las soluciones, y la densidad y tamaño de las micelas de caseína. La cantidad de CCP, caseínas, y agua presente en las micelas contribuye a la densidad de las micelas (Lin et al., 1972): cuanto más CCP y caseínas están presentes en micelas de caseína (intactas) y menor es la viscosidad, más fácilmente precipitan micelas en el granulado. Aproximadamente un granulado 30 % p/p fue formado con ultracentrifugado durante 1 h de MCI 9 % p/v y este granulado contenía 7,5 % p/p de proteína. La cantidad de granulado y la cantidad de proteína en el granulado disminuyó por adición de TSC, SP, y SHMP, mientras que la cantidad de granulado aumentó y la cantidad de proteína en el granulado disminuyó ligeramente por adición de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>UMP.

[0104] La Figura 7 muestra la correlación entre volúmenes calculada a partir de viscosidad y mediciones de ultracentrifugado. En general, las volúmenes obtenidas de ultracentrifugado subestiman las volúmenes obtenidas de viscosidad debido a la compresión de la capa externa "tipo cabello" de las micelas en el granulado. Esto fue también observado por Dewan et al. (1972) y Van Hooydonk et al. (1986). Las volúmenes se correlacionan para las muestras TSC, SP, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y Na<sub>2</sub>UMP. Para las muestras SHMP, ellos correlacionan hasta 15 mEq·L<sup>-1</sup> SHMP, pero comienzan a desviarse a concentraciones más altas de SHMP. Esto se debe a las viscosidades altas medidas en muestras SHMP. La voluminosidad de la micela de caseína calculada a través de mediciones de viscosidad se sobreestima en muestras SHMP, debido a que las caseínas fueron reticuladas. La cantidad de granulado ultracentrifugado es también inferior a viscosidad más alta. Por lo tanto, la voluminosidad de la micela de caseína en muestras SHMP no se puede

calcular ni a través de la viscosidad ni a través de ultracentrifugado.

[0105] Los quelantes de calcio también afectan a la turbidez de soluciones de leche (Odagiri & Nickerson, 1964). La turbidez de la solución 9 % p/v de caseína micelar disminuyó por la adición de los fosfatos y citrato en el orden SHMP > SP > TSC > Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> > Na<sub>2</sub>UMP (figura 8). Mizuno & Lucey (2005) también observaron una reducción en la turbidez en el orden SHMP > TSC > Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en muestras obtenidas a partir de concentrado de proteína de la leche a pH 5,8. La turbidez disminuyó a una extensión comparable después de la adición de 45 mEq·L<sup>-1</sup> SP o SHMP, mientras que diferencias grandes en la viscosidad fueron medidas para estas muestras. Esto implica que SHMP tiene la capacidad de reticular caseínas en este rango de concentración, mientras que SP no. Nuestra hipótesis es que esto se debe a la forma y distribución de la carga alrededor de las moléculas. SHMP tiene seis cargas negativas homogéneamente distribuidas alrededor de su molécula, mientras que SP tiene doce cargas negativas, reagrupadas en pares, alrededor de su molécula. Esta distribución de carga homogénea habilita a SHMP para interactuar con cationes y caseínas al mismo tiempo. SP se puede aproximar a las caseínas menos fácilmente que SHMP debido a la distribución de carga alrededor de la molécula SP y, de esta manera, la reticulación es inhibida. SP también es un quelante de calcio muy fuerte y puede quelar inmediatamente iones de calcio libres hasta tal extensión que ninguna de las cargas o iones de calcio están ya disponibles para la reticulación de las caseínas. Esto fue medido como una reducción más fuerte en la actividad de ión de calcio para SP que SHMP (figura 2). Mizuno y Lucey (2007) investigaron la capacidad de reticulación de pirofosfato tetrasódico (TSPP) en la solución de concentrado de proteína de la leche. Ellos han sugerido que complejos de pirofosfato de calcio bien reticular caseínas o bien reducen la repulsión electroestática entre caseínas, que facilita la asociación hidrofóbica. TSPP entrecruza probablemente las caseínas más fácilmente que SHMP, ya que tiene sólo cuatro cargas homogéneamente distribuidas alrededor de su molécula. Sin embargo, otra investigación se requiere para dilucidar el mecanismo exacto de la reticulación de caseínas por polifosfatos diferentes.

[0106] Es destacable que SP, TSC, y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> demuestran un aumento comparable en la viscosidad y voluminosidad y reducción en la actividad de ión de calcio, mientras que estos quelantes tienen un impacto diferente en la turbidez y (proteína) ultracentrifugada (en) granulado. Los iones de calcio en la micela de caseína se ligan a los residuos de fosfoserina o son parte de los complejos CCP. El quelante adicionado compite con los residuos de fosfoserina y CCP en la micela de caseína por los iones de calcio. Debido a las diferencias en la afinidad para iones de calcio de SP, TSC, y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (De Kort et al., 2009; Mekmene, Le Graet & Gaucheron, 2009; Turner, Paphazy, Haygarth & Mckelvie, 2002; Upreti, Buhlmann & Metzger, 2006), los quelantes son capaces de liberar cantidades diferentes de CCP de la micela. Esto no afecta necesariamente a la integridad de la estructura micelar, porque interacciones hidrofóbicas entre las caseínas que rodean las agrupaciones CCP previenen que las micelas se disocien completamente cuando CCP es solubilizada (McMahon & Oommen, 2007; Munyua & Larsson-Raznikiewicz, 1980).

[0107] En general, la dispersión de partículas se determina por la concentración, tamaño de partícula, y índice de refracción con respecto al de la solución (Van De Hulst, 1957). Las caseínas y CCP son principalmente responsables de las propiedades de dispersión de luz de la micela de caseína (Muniua & Larsson-Raznikiewicz, 1980). La eliminación de CCP de las micelas reduce el índice de refracción de las micelas de caseína, que es medido como una reducción en la turbidez de las soluciones de leche. El estudio de Smiddy, Martin, Kelly, & De Kruif (2006) en micelas de caseína internamente reticuladas mostró que después de la adición de 50 mmol·L<sup>-1</sup> de citrato (150 mEq·L<sup>-1</sup>) a leche desnatada una reducción en la dispersión de luz de aproximadamente 50 % fue medida. Estos autores sugieren que todo el CCP (7 % de masa seca de la micela de caseína) fuera eliminado de las micelas reticuladas a esta concentración, mientras la estructura micelar se mantiene intacta. Medimos una reducción en la turbidez del 97 % para SHMP y SP, 87 % para TSC, y 60 % para Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por adición de 105 mEq·L<sup>-1</sup> de quelante a la solución 9 % p/v MCI (figura 8). Por lo tanto, estas reducciones en la turbidez no pueden ser atribuidas sólo a la liberación de CCP de la micela. Alguna caseína específica también se puede liberar de la micela de caseína por eliminación de calcio y CCP de la micela. Sólo una reducción ligera en la cantidad de proteína en el granulado fue medida para muestras Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (figura 6), mientras que una reducción mucho más grande en la cantidad de proteína en el granulado fue medida para muestras SP y TSC. No obstante, la viscosidad de las muestras Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> aumentó a extensiones comparables a la viscosidad de muestras TSC y SP. Esto ilustra que la diferencia en la reducción en la turbidez para las muestras SP, TSC, y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> no se puede explicar por la liberación de sólo CCP y algunas caseínas específicas de las micelas. Por lo tanto, el cambio en el índice de refracción y concentración de partículas no es suficiente para causar la reducción fuerte en la turbidez. La dispersión Rayleigh indica que la intensidad de la luz dispersada varía como la sexta potencia del tamaño de partícula (Van De Hulst, 1957) y por consiguiente el tamaño de partícula hace la principal aportación al cambio en la turbidez de la solución. El tamaño de partícula de las micelas de caseína se ve afectado, cuando las micelas se hinchan o disocian en estructuras más pequeñas. Huppertz (2007) describió que la adición de 6 mol·L<sup>-1</sup> de urea a micelas de caseína internamente reticuladas induce el hinchamiento de las micelas, que es medido como una reducción en la turbidez de 40 %. La reducción en la turbidez en nuestras muestras MCI es demasiado grande para ser sólo atribuida al hinchamiento de las micelas de caseína. Otra explicación del hinchamiento de las micelas de caseína se describirá de aquí en adelante. La principal reducción en la turbidez es muy probablemente debida a la disociación de las micelas de caseína en estructuras más pequeñas. Las micelas disociadas precipitarán menos fácilmente que las micelas de caseína intactas durante el ultracentrifugado, debido a que los fragmentos de las micelas disociadas son más pequeños y

más ligeros que las micelas de caseína intacta. Basado en estos fenómenos, los resultados de turbidez y ultracentrifugado indican que la disociación micelar ocurrió a la extensión más grande por adición de SHMP y SP, seguido de TSC y finalmente por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . La disociación micelar más probablemente no ha ocurrido en muestras  $\text{Na}_2\text{UMP}$ .

5 [0108] Sin embargo, una voluminosidad comparable se puede deducir para la adición de SP, TSC, o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en soluciones que contienen micelas de caseína disociadas o intactas, debido a que el volumen total por gramo de proteína está invariado. Este indica que por ejemplo la voluminosidad de la micela intacta en una solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  es comparable a la voluminosidad de la micela disociada en una solución de SP puesto que las actividades de ión de calcio son comparables en ambas soluciones. Como resultado, un aumento comparable en la viscosidad y voluminosidad de la micela de caseína fue medido para muestras SP, TSC, y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . El fenómeno de soluciones de leche que contienen micelas de caseína intactas y disociadas al adicionar de polifosfato o EDTA fue introducido previamente por ejemplo por Lin et al. (1972), Griffin et al. (1988), Panouillé et al. (2005) and Pitkowski et al. (2009).

15 [0109] Tal y como se menciona, las micelas de caseína también crecerán por adición de quelantes de calcio. La Figura 2 muestra que la actividad de ión de calcio disminuyó a una extensión comparable por adición de SHMP, SP, TSC, y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . La repulsión electroestática en las micelas de caseína aumentó debido a la reducción de los iones de calcio libres en la fase continua. Consecuentemente, las micelas de caseína se volvieron más hidratadas y crecieron, lo que es medido como un aumento en la viscosidad de las soluciones MCI (figura 3) y también un aumento en la voluminosidad de la micela de caseína (figuras 4 y 7). El fenómeno de hinchamiento de las micelas de caseína se puede derivar del granulado ultracentrifugado en muestras de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (figura 5). En estas muestras el volumen de granulado aumentó a concentraciones de quelante más altas, mientras que en muestras SHMP, SP, o TSC el volumen de granulado disminuyó. La densidad, peso molecular, y tamaño de las micelas de caseína son importantes para la cantidad de granulado ultracentrifugado obtenido y se determinan por la cantidad de caseína, CCP, y agua presente en las micelas de caseína (Walstra et al., 2006). Gaucher et al. (2007) y Guo et al. (2003) observaron que el ortofosfato precipita con calcio en las micelas de caseína. Por ejemplo, una cantidad de aproximadamente 3 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  se puede formar por adición de 60  $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , del cual una parte grande de los iones de calcio forman ya parte de las micelas de caseína. El aumento en el peso molecular es insignificante en comparación al aumento observado en la cantidad de granulado. Este aumento se asigna al hinchamiento de las caseínas. La Figura 5 también muestra que la micela de caseína se hincha ligeramente por adición de  $\text{Na}_2\text{UMP}$ , debido a que la cantidad de granulado aumentó en estas muestras también. Estas conclusiones de hinchamiento de las micelas por adición de EDTA no fueron observadas por Lin et al. (1972) y Pitkowski et al. (2009). Ambos describieron que a determinadas concentraciones de EDTA sólo una fracción de las micelas se disociaba, pero que el radio hidrodinámico de las micelas de caseína residuales se mantenía constante. No obstante, Sood & Gaiand (1979) ya cuestionaron las observaciones de Lin et al. (1972) que micelas intactas permanecerán a un radio constante, porque ellos midieron un aumento en la voluminosidad por adición de EDTA. Por lo tanto, ellos han concluido que las micelas deberían ser capaces de hincharse o contraerse cuando el contenido de calcio en las micelas de caseína se cambia. Por otra parte, Huppertz et al. (2007) mostró por tres métodos de dispersión de luz que incluso micelas de caseína reticuladas internamente fueron capaces de hincharse por adición de citrato o urea, que fue medido como un aumento en los tamaños de partícula y reducción en la turbidez. Estos resultados están en línea con nuestras observaciones de que la adición de quelantes de calcio inducirán hinchamiento de las micelas de caseína intactas y disociación de una fracción de las micelas. Esto también sugiere que el calcio holgadamente ligado, es decir ligado a las cadenas laterales de aminoácidos cargados negativamente y grupos de fosfato, está presente en la micela de caseína además del calcio fuertemente ligado en los complejos CCP. El primer tipo tiene una función estructural y su liberación se refiere al hinchamiento de la micela, que es medido como un aumento en la viscosidad. La liberación del último se refiere a la disociación de las micelas de caseína, que es medido como una reducción en la turbidez y cantidad de granulado ultracentrifugado. La hipótesis de que dos tipos de interacciones de calcio están presentes en la micela de caseína fue propuesta por Munyua & Larsson-Raznikiewicz (1980). Globalmente, parece que la actividad de ión de calcio es un buen pronosticador para las viscosidades y voluminosidades observadas, pero un indicador pobre cuando la micela de caseína comienza a disociar.

## CONCLUSIÓN

50 [0110] Los quelantes de calcio inducen cambios físicos en las soluciones de caseína micelar concentrada afectando la microestructura de las micelas de caseína. La adición de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , TSC, y SP provocó un aumento comparable en la viscosidad de las soluciones MCI, mientras que la turbidez disminuyó en el orden  $\text{SP} > \text{TSC} > \text{Na}_2\text{HPO}_4$ . La adición de SP o SHMP dio una reducción comparable en la turbidez, pero la viscosidad de las muestras SHMP fue mucho más alta. Esto se debe a la capacidad de SHMP de reticular micelas de caseína. La actividad de ión de calcio disminuyó en una extensión comparable por adición de SHMP, SP, TSC, o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , que indujeron hinchamiento de las micelas de caseína.

60 [0111] La voluminosidad de la micela de caseína (es decir, hinchamiento) podría ser calculada a partir de la viscosidad y mediciones de ultracentrifugado por adición de SP, TSC,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , y  $\text{Na}_2\text{UMP}$ . Las voluminosidades obtenidas de los dos métodos de cálculo se correlacionan para estas muestras. La voluminosidad de la micela de caseína en muestras SHMP podría no ser derivada de los resultados de viscosidad y ultracentrifugado debidos al reticulado formado entre las caseínas.

El quelante de calcio débil Na<sub>2</sub>UMP tiene un efecto insignificante en la viscosidad y turbidez de la solución MCI y disminuyó ligeramente la actividad de ión de calcio. La reducción en la actividad de ión de calcio fue predictiva para el aumento en la viscosidad e hinchamiento relacionado de la micela hasta que la micela comienza a disociar. Esto confirma la hipótesis de que dos tipos de interacciones de calcio están presentes en la micela de caseína. La extensión de la disociación micelar depende del tipo y concentración de quelante de calcio adicionado.

## REFERENCIAS

[0112]

- de Kort, E. J. P., M. Minor, T. H. M. Snoeren, A. C. M. van Hooijdonk, and E. van der Linden. 2009. Calcium binding capacity of organic and inorganic ortho- and polyphosphates. *Journal of dairy science and technology*. 89:283-299.
- Dewan, R. K., V. A. Bloomfield, A. chudgar, and C. V. Morr. 1972. Viscosity and voluminosity of bovine milk casein micelles. *J. Dairy Sci.* 56(6):699-705.
- Eilers, H. (1941). Die Viskositat von emulsionen hochviskoser stoffe als funktion der konzentration. *Kolloid Zeitschrift. Zeitschrift fur wissenschaftliche und technische kolloidchemie*, 96, 313-321.
- Eilers, H. 1945. Colloidchemische studien aan ondermelk. Vol. 50, 15. Koninklijke Nederlandse Zuivelbond, 's- Gravenhage.
- Fox, K. K., M. K. Harper, V. H. Holsinger, and M. J. Pallansch. 1965. Gelation of milk solids by orthophosphate. *J. Dairy Sci.* 48:179-185.
- Gaucher, I., Piot, M., Beaucher, E., & Gaucheron, F. (2007). Physico-chemical characterization of phosphate-added skim milk. *International Dairy Journal*, 17, 1375-1383.
- Griffin, M. C. A., Lyster, R. L. J., & Price, J. C. (1988). The disaggregation of calcium-depleted casein micelles. *European Journal of Biochemistry*, 174, 339-343.
- Griffin, M. C. A., Price, J. C., & Griffins, W. G. (1989). Variation of the viscosity of a concentrated, sterically stabilized, colloid: effect of ethanol on casein micelles of bovine milk. *Journal of colloid and interface science*, 128 (1), 223-229.
- Guo, C., B. E. Campbell, K. Chen, A. M. Lenhoff, and O. D. Velev. 2003. Casein precipitation equilibria in the presence of calcium ions and phosphates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 29:297-307.
- Hallstrom, M. and P. Dejmek. 1988. Rheological properties of ultrafiltered skim milk. II. Protein voluminosity. *Milchwissenschaft*. 43(2):95-97.
- Harwalkar, V. R. 1982. Chapter 7: Age gelation of sterilised milks. Pages 229-269 in *Developments in dairy chemistry*. Vol. 1. P. F. Fox, ed. Applied Science Publishers, Lond on.
- Huppertz, T., Smiddy, M. A., & De Kruif, C. G. (2007). Biocompatible micro-gel particles from cross-linked casein micelles. *Biomacromolecules*, 8, 1300-1305.
- Holt, C. 1997. The milk salts and their interaction with casein. *Advanced Dairy Chemistry*. 3:233-256.
- Karlsson, A. O., R. Ipsen, K. Schrader, and Y. Ardo. 2005. Relationship between physical properties of casein micelles and rheology of skim milk concentrate. *J. Dairy Sci.* 88:3784-3797.
- Kocak, H. R. and J. G. Zadow. 1985. Controlling age gelation of UHT milk with additives. *The australian journal of dairy technology*. 40:58-64.
- Korolczuk, J. (1981). Voluminosity and viscosity of casein solution I. The correlation between the voluminosity, protein concentration and viscosity. *Milchwissenschaft*, 36 (7), 414-416.
- Krieger, I. M. (1972). Rheology of monodisperse latices. *Advances in colloid and interface science*, 3, 111-136.
- Leviton, A. and M. J. Pallansch. 1962. High-temperature-short time- sterilised evaporated milk. IV. The retardation of gelation with condensed phosphates, manganous ions, polyhydric compounds, and phosphatides. *J. Dairy Sci.* 45:1045- 1056.
- Lin, S. H. C., Leong, S. L., Dewan, R. K., Bloomfield, V. A., & Morr, C. V. (1972). Effect of calcium ion on the structure of native bovine casein micelles. *Biochemistry*, 11 (10), 1818-1821.
- Marchin, S., Puteaux, J.-L., Pignon, F., & Léonil, J. (2007). Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultras-small-angle x-ray scattering. *The journal of chemical physics*, 126 (045101).
- McMahon, D. J., & Oommen, B. S. (2007). Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*, 91, 1709-1721.
- Mekmene, O., Le Graet, Y., & Gaucheron, F. (2009). A model for predicting salt equilibria in milk and mineral-enriched milks. *Food Chemistry*, 116,233-239.
- Mizuno, R. and J. A. Lucey. 2005. Effects of emulsifying salts on the turbidity and calcium-phosphate-protein interactions in casein micelles. *J. Dairy Sci.* 88:3070-3078.
- Mizuno, R. and J. A. Lucey. 2007. Properties of milk protein gels formed by phosphates. *J. Dairy Sci.* 90:4524-4531.
- Morr, C. V. 1967. Some effects of pyrophosphate and citrate ions upon the colloidal caseinate-phosphate micelles and ultrafiltrate of raw and heated skimmilk. *J. Dairy Sci.* 50:1038-1044.
- Munyua, J. K., & Larsson-Raznikiewicz, M. (1980). The influence of Ca<sup>2+</sup> on the size and light scattering properties of casein micelles 1. Ca<sup>2+</sup> removal. *Milchwissenschaft*, 35 (10), 604-606.
- Odagiri, S., & Nickerson, T. A. (1964). Complexing of calcium by hexametaphosphate, oxalate, citrate, and EDTA in milk. I. Effects of complexing agents of turbidity and rennet coagulation. *Journal of Dairy Science*, 47, 1306-1309.

## ES 2 453 983 T3

- Panouillé, M., Nicolai, T., Benyahia, L., & Durand, D. (2005). Aggregation and gelation of casein sub-micelles. *Special publication - Royal society of chemistry*, 298, 194-208.
- Philippe, M., F. Gaucheron, Y. Le Graet, F. Michel, and A. Garem. 2003. Physicochemical characterisation of calcium-supplemented skim milk. *Lait*, 83:45-59.
- 5 Pitkowski, A., Nicolai, T., & Durand, D. (2009). Scattering and turbidity study of the dissociation of casein by calcium chelation. *Biomacromolecules*, 9, 369-375.
- Smiddy, M. A., Martin, J.-E. G. H., Kelly, A. L., De Kruif, C. G., & Huppertz, T. (2006). Stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase. *Journal of Dairy Science*, 89, 1906-1914.
- 10 Snoeren, T. H. M., Damman, A. J., & Klok, H. J. (1982). The viscosity of skim-milk concentrates. *Netherlands milk and dairy journal*, 36, 305-316.
- Sood, S. M., & Gaiad, D. K. (1979). Correlation between micelle solvation and calcium content. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 14, 32-34.
- Turner, B. L., M. J. Paphazy, P. M. Haygarth, and I. D. McKelvie. 2002. Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 357:449-469.
- 15 Udabage, P., McKinnon, I. R., & Augustin, M.-A. (2000). Mineral and casein equilibria in milk: effects of added salts and calcium-chelating agents. *Journal of Dairy Research*, 67,361-370.
- Upreti, P., P. Buhlmann, and L. E. Metzger. 2006. Influence of calcium and phosphorus, lactose and salt-to moisture ratio on cheddar cheese quality: pH buffering properties of cheese. *J. Dairy Sci.* 89:938-950.
- Van de Hulst, H. C. (1957). *Light scattering in small particles*. New York, USA: Wiley.
- 20 van Hooydonk, A. C. M., Hagedoorn, H. G., & Boerrigter, I. J. (1986). pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 1. Effect of acidification on physico-chemical properties. *Netherlands milk and dairy journal*, 40, 281-296.
- Vujcic, I., J. M. deMan, and I. L. Woodrow. 1968. Interaction of polyphosphates and citrate with skimmilk proteins. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 1:17-21.
- 25 Walstra, P., J. T. M. Wouters, and T. J. Geurts. 2006. *Dairy science and technology*. 2 ed. CRC press, Boc Raton, USA.
- Ward, B. R., Goddard, S. J., Augustin, M.-A., & McKinnon, I. R. (1997). EDTA-induced dissociation of casein micelles and its effect on foaming properties of milk. *Journal of Dairy Research*, 64, 495-504.
- Zittle, C. A. 1966. Precipitation of casein from acidic solutions by divalent anions. *J. Dairy Sci.* 49:361-364.

30

**REIVINDICACIONES**

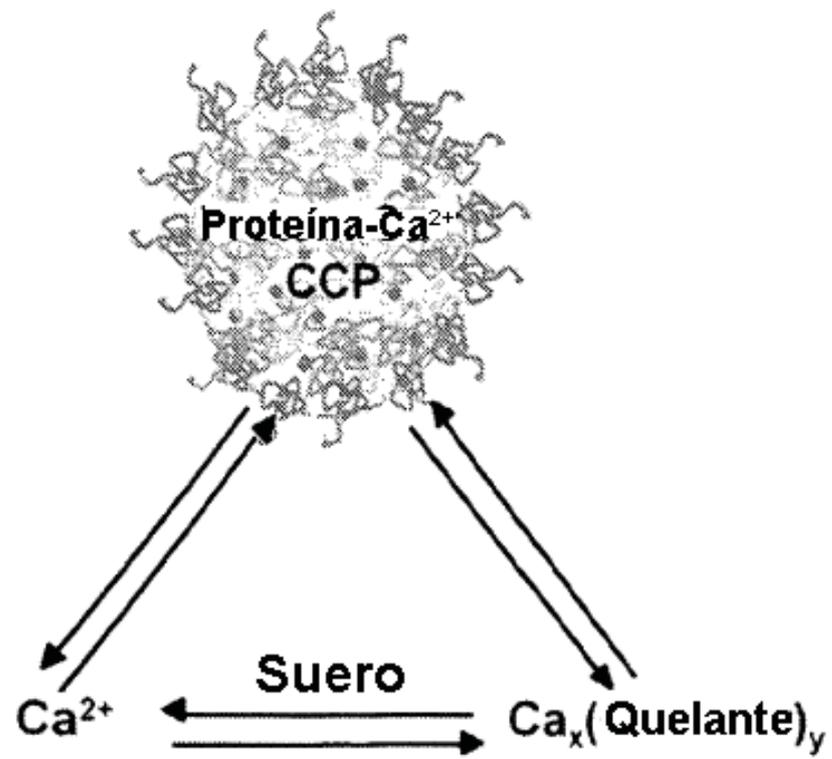
- 5 1. Uso de uno o más agentes quelantes seleccionados del grupo que consiste en un ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal de fosfato soluble, una sal de citrato soluble, o una mezcla de estos, para controlar independientemente la viscosidad y la transparencia de una composición de caseína micelar acuosa que comprende 6 a 20 g/100 ml de caseína micelar, y con un pH de aproximadamente 6 a 8.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde el ácido fosfórico es seleccionado del grupo que consiste en el ácido uridina monofosfórico, ácido citidina monofosfórico, ácido ortofosfórico, ácido inositol hexafosfórico, ácido hexametafosfórico, o una mezcla de estos, y la sal de fosfato es seleccionada del grupo que consiste en el monofosfato de uridina, monofosfato de citidina, ortofosfato, hexafosfato de inositol, hexametafosfato, o una mezcla de estos.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1, donde la sal soluble es una sal monovalente, preferiblemente una sal de sodio, una sal de potasio, o una mezcla de estas, y donde el contraión presente en la sal monovalente está preferiblemente presente en una cantidad menor o igual a una cantidad equimolar, en relación al ácido.
- 20 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la sal es seleccionada del grupo que consiste en el monofosfato disódico de uridina, monofosfato disódico de citidina, ortofosfato disódico, hexafosfato de inositol dodecasodio, hexametafosfato de hexasodio, citrato de trisodio, o mezclas derivadas, donde la sal de fosfato es preferiblemente monofosfato disódico de uridina.
- 25 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde se usa una cantidad de aproximadamente 1 a 120 mEq.L<sup>-1</sup>, preferiblemente 20 a 60 mEq.L<sup>-1</sup> de uno o más agentes quelantes.
- 30 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la producción de una composición nutricional.
- 35 7. Composición nutricional que comprende de 9 a 20 g de proteína por 100 ml de composición y con un pH de aproximadamente 6 a 8, en el que todo o la mayor parte de dicha proteína comprende caseína micelar, que comprende uno o más agentes quelantes seleccionados del grupo que consiste en un ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal de fosfato soluble, una sal de citrato soluble, o una mezcla de estos, y donde la composición comprende una cantidad de aproximadamente 1 a 120 mEq.L<sup>-1</sup>, preferiblemente 10 a 80 mEq/L, más preferiblemente 20 a 60 mEq.L<sup>-1</sup> de uno o más agentes quelantes.
- 40 8. Composición nutricional que comprende de 9 a 20 g de proteína por 100 ml de la composición y con un pH de aproximadamente 6 a 8, en el que todo o una mayor parte de dicha proteína comprende caseína micelar, que comprende uno o más agentes quelantes seleccionados del grupo que consiste en un ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal de fosfato soluble, una sal de citrato soluble, o una mezcla de estos, con la condición de que ácido cítrico, una sal de citrato soluble o una mezcla de la misma es excluido como el único agente quelante.
- 45 9. Composición nutricional según la reivindicación 7 o 8, donde la sal es seleccionada del grupo que consiste en monofosfato de uridina, monofosfato de citidina, ortofosfato, hexafosfato de inositol, hexametafosfato, citrato o una mezcla de estos, y la sal de fosfato es seleccionada del grupo que consiste en monofosfato de uridina, monofosfato de citidina, ortofosfato, hexafosfato de inositol, hexametafosfato, o una mezcla de estos.
- 50 10. Composición nutricional según la reivindicación 7 o 8, donde la sal es seleccionada del grupo que consiste en monofosfato disódico de uridina, monofosfato disódico de citidina, ortofosfato disódico, hexafosfato de inositol dodecasodio, hexametafosfato de hexasodio, citrato de trisodio, o una mezcla de estos, y donde la sal es preferiblemente monofosfato disódico de uridina.
- 55 11. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, a la que una cantidad de aproximadamente 1 a 120 mEq.L<sup>-1</sup>, preferiblemente 10 a 80 mEq/L, más preferiblemente 20 a 60 mEq.L<sup>-1</sup> de uno o más agentes quelantes han sido adicionados.
12. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, que comprende uno o más de grasa, carbohidratos digeribles y no digeribles.
13. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, donde la composición es una composición líquida.
- 60 14. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, para uso en un método de proveer nutrición a una persona en la necesidad de esta, que incluye las etapas de administración de esta a dicha persona.

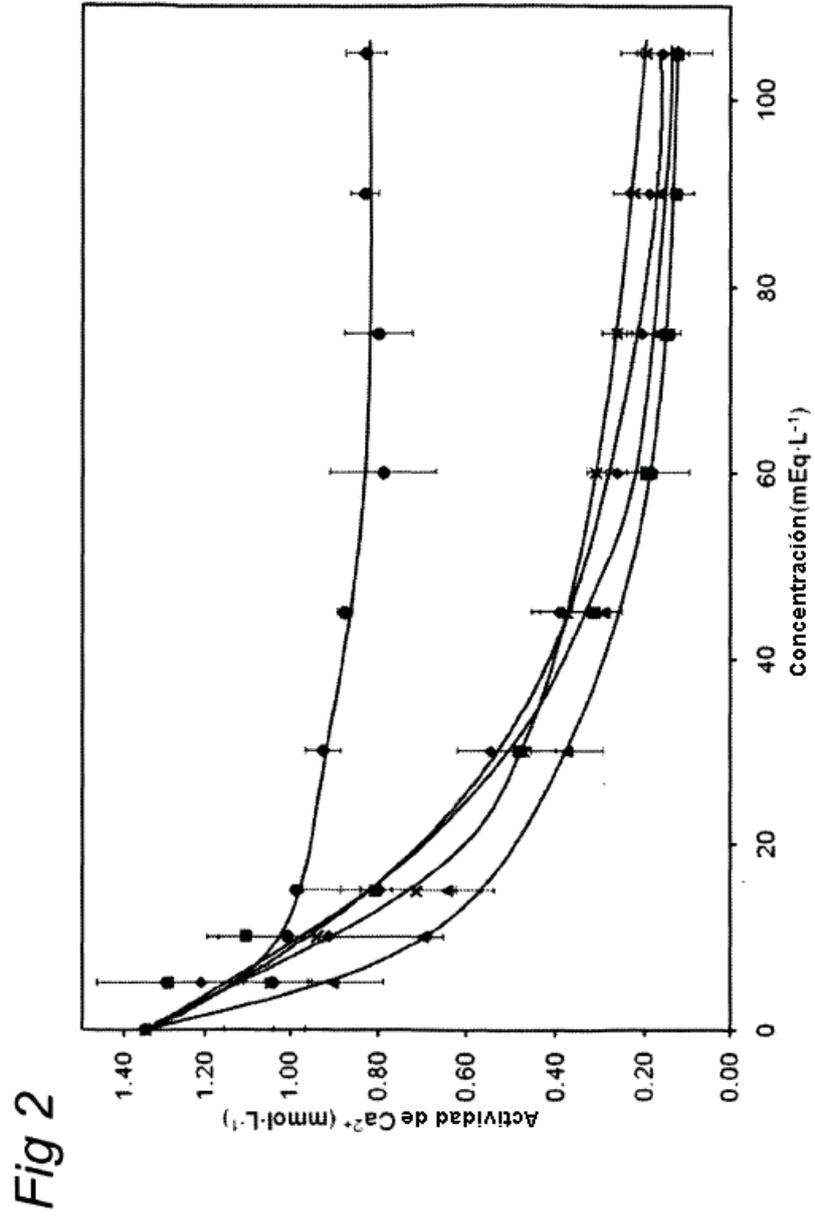
## ES 2 453 983 T3

15. Composición según la reivindicación 14, donde la persona es una persona de edad avanzada, una persona que está en un estado de enfermedad, una persona que se está recuperando de un estado de enfermedad, una persona que está desnutrida, o una persona saludable tal como un deportista o una deportista o unas personas mayores activas.

5

*Fig 1*





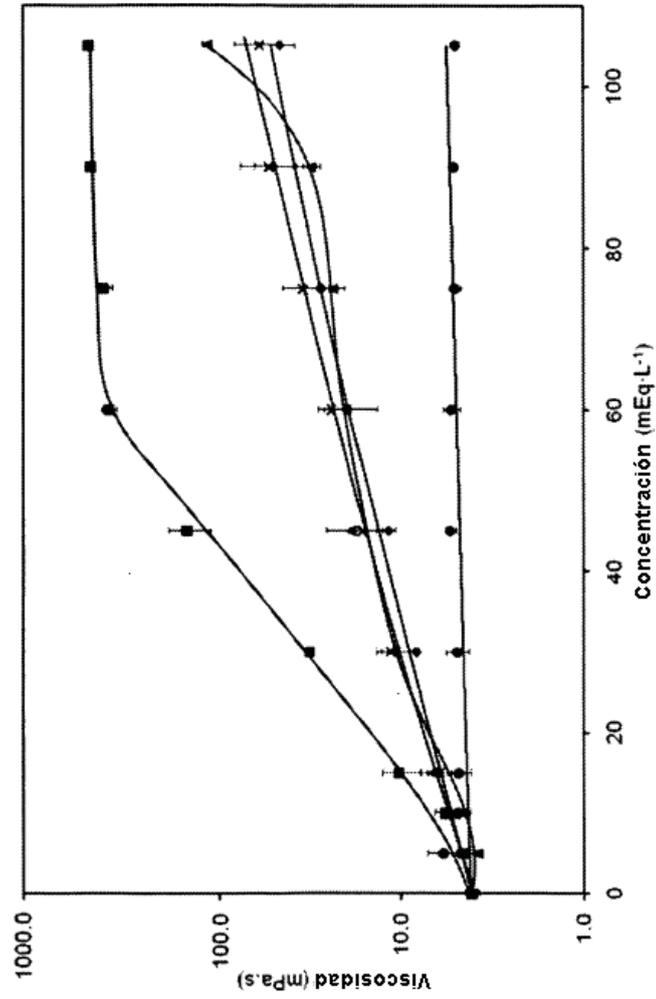


Fig 3

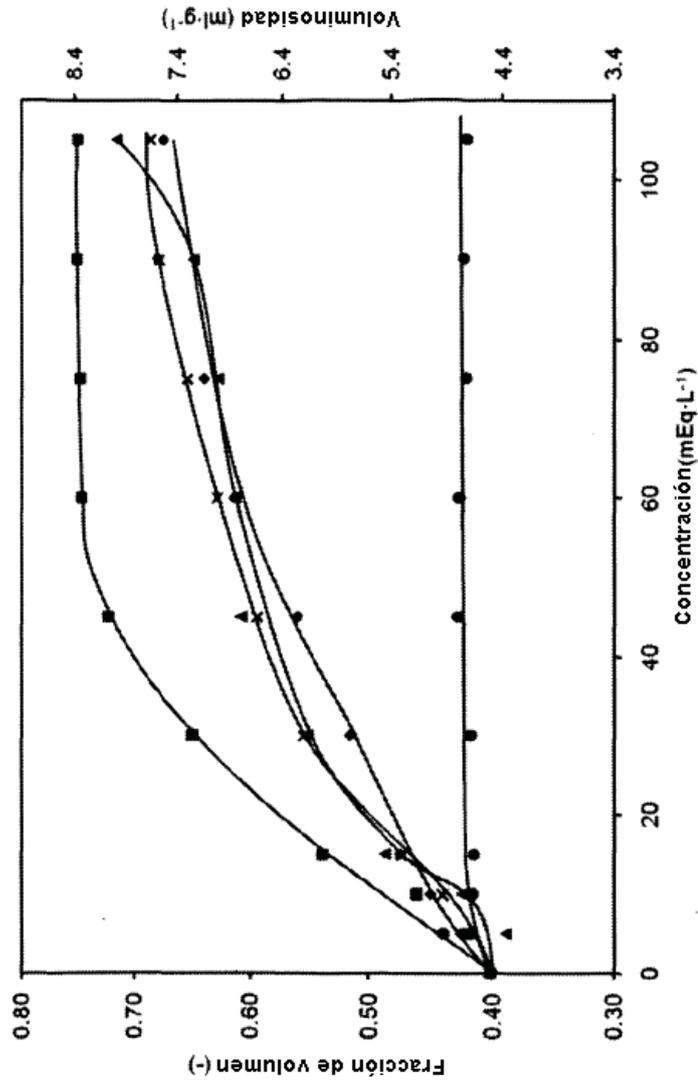


Fig 4

