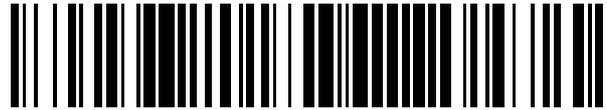


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 607**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/30** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

**A23L 1/29** (2006.01)

**A23L 1/305** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2011 E 11794259 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2648551**

54 Título: **Fórmula infantil fermentada**

30 Prioridad:

**06.12.2010 WO PCT/NL2010/050822**

**02.05.2011 EP 11164461**

**02.05.2011 US 201161481381 P**

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

**02.07.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LUDWIG, THOMAS;  
HUYBERS, SYLVIE;  
ABRAHAMSE, EVAN y  
BOURITIUS, HOUKJE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 539 607 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Fórmula infantil fermentada.

## 5 Campo

[0001] La presente invención se refiere a fórmulas nutricionales para bebés y niños pequeños y en particular se dirige a la digestión de proteína.

## 10 Antecedentes

[0002] La digestión de proteínas dietéticas se consigue mediante la liberación de proteasas del estómago y el páncreas. La liberación de proteasas normalmente está fuertemente regulada, asegurando así que no se secreten ni demasiadas pocas ni demasiadas enzimas proteolíticas. Esto es importante ya que una liberación de proteasas alta y una actividad proteolítica alta tienen varias desventajas. Una liberación de proteasas demasiado alta supondrá una pérdida de energía y una pérdida de aminoácidos esenciales debido al hecho de que las proteasas mismas son altamente resistentes a la actividad proteolítica y entrarán en el colon inalteradas en su mayoría. Posteriormente, tras la entrada de una cantidad aumentada de proteína (en forma de proteasas) en el colon la microbiota intestinal fermentará las proteínas dando como resultado un pH más alto desfavorable, un cambio en la composición de la microbiota intestinal y la formación de metabolitos tóxicos tales como fenol, indol, y aminas. Este cambio en la fisiología del colon también puede conducir a infecciones intestinales aumentadas. Finalmente, las proteasas tales como tripsina se conocen por disociar los receptores activados de proteasa (PARs), tales como PAR-II, y así afectan a la integridad de la barrera intestinal. Esto puede conllevar una percepción del dolor abdominal aumentada. Las enfermedades inflamatorias tales como SII-D y UC han sido relacionadas con niveles elevados de actividad proteolítica dentro del lumen intestinal y la posterior activación de PAR-II. Además, la actividad proteolítica fecal aumentada está relacionada con dermatitis de pañal. En general, una liberación de proteasas demasiado alta tendrá como consecuencia la disminución de comodidad gastrointestinal, los trastornos funcionales digestivos, formación de gas gastrointestinal, y/o hinchamiento.

[0003] Una secreción demasiado baja de actividad proteolítica, por otro lado, es desventajosa ya que en este caso las proteínas dietéticas no son debidamente digeridas llevando también a la pérdida de aminoácidos esenciales y energía, y a una carga de proteína del colon aumentada.

[0004] Especialmente en bebés es de máxima importancia una regulación estricta de la digestión de proteínas y la liberación de la actividad proteolítica. En primer lugar, para bebés una pérdida limitada de proteína es esencial para el buen crecimiento y desarrollo. La pérdida de aminoácidos esenciales y energía afecta al crecimiento y desarrollo. En segundo lugar, la función de la barrera intestinal en bebés sigue siendo inmadura y la microbiota intestinal se sigue desarrollando y por lo tanto es más susceptible a las desventajas mencionadas anteriormente.

[0005] Las formas conocidas para mejorar la digestión de proteína, en particular en bebés, implican la predigestión parcial de proteínas dietéticas por proteasas. Además, Alm, 1982, J Dairy Sci j 65:509-514 divulga que un pH bajo de productos lácteos, especialmente como resultado de la fermentación, tiene una influencia positiva en la digestibilidad in vitro de proteínas. Se considera que en muchos trastornos digestivos la secreción de ácido clorhídrico sale perjudicada y por consiguiente se recomienda la idoneidad de tales productos lácteos de pH bajo para bebés, niños y adultos. Vass et al, 1984, Acta Medica Hungarica, 41, 15-161 revela que las leches fermentadas tienen el máximo índice de utilización de proteínas, definido como el aumento en la masa corporal en g por toma de proteína en g, en las ratas destetadas, y esto se atribuye a una mejor digestibilidad de proteínas.

[0006] Gallia Lactofidus® es una fórmula infantil acidificada, resultante de la fermentación por dos cepas específicas de bacterias del ácido láctico. Se revela que esta fórmula facilita la digestibilidad de proteínas y mejora el tránsito intestinal.

## Resumen de la invención

[0007] Los inventores han descubierto que, utilizando un modelo animal con lechones, tras el consumo de una fórmula fermentada la cantidad de enzimas proteolíticas endógenas que se detectó en el íleon terminal se redujo significativamente en comparación con la cantidad detectada tras el consumo de una fórmula estándar. Sorprendentemente, la cantidad también se redujo significativamente en comparación con la cantidad detectada tras el consumo de una fórmula con proteínas extensivamente hidrolizadas (es decir, predigeridas). Además y de forma imprevista también, aunque la toma de proteína diaria era más alta en los lechones que consumían la fórmula fermentada la digestibilidad de proteína aparente y real fue la máxima en este grupo también. Esto es indicativo de un esfuerzo digestivo reducido. El esfuerzo digestivo se define como la cantidad de actividad de proteasa segregada por gramo de proteína ingerida. La eficacia digestiva se define como el valor recíproco de esfuerzo digestivo. Esto significa que con una eficacia digestiva alta (poca proteasa necesaria para asimilar la proteína ingerida) el esfuerzo digestivo es bajo. Sorprendentemente, se ha observado que la actividad proteolítica en muestras fecales de bebés humanos alimentados exclusivamente a pecho era inferior a aquella de los bebés alimentados con una fórmula

estándar. Por lo tanto el uso de una fórmula fermentada es ventajosamente más probable que haga la actividad de la proteasa en el colon más reminiscente a la situación que aquella en los bebés alimentados a pecho. Tras la alimentación de una fórmula fermentada se mejora la liberación de proteasa endógena, la eficacia de la digestión de proteína, el esfuerzo digestivo, la pérdida de la proteína endógena y la carga de proteína que entra en el colon. Se vuelve más similar a la situación en bebés alimentados a pecho que cuando se les alimenta una fórmula infantil estándar no fermentada. Por lo tanto una fórmula fermentada se usa ventajosamente para alimentar bebés para su uso en la prevención y/o tratamiento de dermatitis de pañal o en la promoción de salud de intestinal reduciendo el esfuerzo digestivo, mejorando la eficacia de la digestión de proteínas, reduciendo la pérdida de proteína endógena, reduciendo la secreción endógena de proteasas, y/o reduciendo la carga de proteína que entra en el colon.

[0008] El hallazgo de que la liberación de proteasa endógena se reduce, la eficacia de digestión de proteína aumenta, y la pérdida de proteína endógena disminuye también permite ventajosamente la formulación de una fórmula infantil con concentraciones de proteína inferiores a las usadas hasta el momento. Actualmente la concentración de proteína en fórmulas infantiles es superior que en la leche humana, para asegurar la absorción adecuada de aminoácidos esenciales. Una concentración de proteína aumentada no obstante, tiene desventajas como se ha mencionado anteriormente, impone una carga más pesada en los riñones de los bebés y también se correlaciona con la obesidad y otros efectos de salud adversos más tarde en la vida. Por lo tanto la presente invención también se refiere a una fórmula infantil fermentada con baja concentración de proteínas.

Descripción detallada

[0009] La presente invención se refiere a un método, en particular un método no terapéutico, para

- a) reducir el esfuerzo digestivo,
- b) mejorar la eficacia de digestión de proteína,
- c) reducir la pérdida de proteína endógena,
- d) reducir la secreción endógena de proteasas, y/o
- e) reducir la carga de proteína que entra en el colon

en comparación con una composición nutricional que no comprende una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende una proteína, dicho método comprende la administración de una composición nutricional que comprende del 5 al 20 % en peso basado en peso en seco de la proteína de la composición nutricional y que comprende al menos el 10% en peso basado en peso en seco de la composición nutricional de una proteína que comprende la composición fermentada por bacterias del ácido láctico.

[0010] En una forma de realización preferida, el presente método es para reducir el esfuerzo digestivo.

[0011] En un aspecto la invención se refiere a un método para la prevención y/o tratamiento de la dermatitis de pañal, dicho método comprende la administración a un bebé de una composición nutricional que comprende del 5 al 20% en peso de proteína basado en el peso en seco de la composición nutricional y que comprende al menos el 10% en peso basado en el peso en seco de la composición nutricional de una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende la proteína.

[0012] En otras palabras la invención se refiere al uso de una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende una proteína en la producción de una composición nutricional para la prevención y/o el tratamiento de la dermatitis de pañal donde la composición nutricional comprende del 5 al 20% en peso de proteína basado en el peso en seco de proteína de la composición nutricional y que comprende al menos el 10% en peso basado en el peso en seco de la composición nutricional de la composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende la proteína.

[0013] La invención también se puede redactar como una composición nutricional que comprende del 5 al 20% en peso de proteína basado en el peso en seco de la proteína de la composición nutricional y que comprende al menos el 10% en peso basado en el peso en seco de la composición nutricional de una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende la proteína, para su uso en la prevención y/o tratamiento de la dermatitis de pañal.

[0014] En un aspecto la presente invención se refiere a un método para promover la salud intestinal, dicho método comprende la administración de una composición nutricional que comprende del 5 al 20% en peso de proteína basado en el peso en seco de la composición nutricional y que comprende al menos el 10% en peso basado en peso en seco de la composición nutricional de una proteína que comprende la composición fermentada por bacterias del ácido láctico.

[0015] En otras palabras la invención se refiere al uso de una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende la proteína en la producción de una composición nutricional para promover la salud intestinal donde la composición nutricional comprende del 5 al 20% en peso de proteínas basado en el peso en seco de proteína de la composición nutricional y que comprende al menos el 10% en peso basado en el peso en seco de la composición

nutricional de la composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende la proteína.

[0016] La invención puede también redactarse como una composición nutricional que comprende del 5 al 20% en peso de proteína basado en el peso en seco de la composición nutricional y que comprende al menos el 10% en peso basado en el peso en seco de la composición nutricional de una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende la proteína, para su uso en la promoción de la salud intestinal en un bebé.

[0017] En otro aspecto, la invención se refiere a un método para promover la salud intestinal mediante

- a) la reducción del esfuerzo digestivo,
- b) la mejora de la eficacia de la digestión de proteína
- c) la reducción de la pérdida de proteínas endógenas
- d) la reducción de la secreción de proteasas endógenas, y/o
- e) la reducción de la carga de proteína que entra en el colon

en comparación con una composición nutricional que no comprende una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende proteína, dicho método comprende la administración de una composición nutricional que comprende del 5 al 20% en peso de proteínas basado en el peso en seco de la composición nutricional y que comprende al menos el 10% en peso basado en el peso en seco de la composición nutricional fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende una proteína.

[0018] En otras palabras la invención se refiere al uso de una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende proteína en la producción de una composición nutricional para promover la salud intestinal mediante

- a) la reducción del esfuerzo digestivo,
- b) la mejora de la eficacia de la digestión de proteínas
- c) la reducción de la pérdida de proteína endógena
- d) la reducción de la secreción endógena de proteasas, y/o
- e) la reducción de la carga de proteína que entra en el colon

en comparación con una composición nutricional que no comprende una proteína que comprende la composición fermentada por bacterias del ácido láctico, donde la composición nutricional comprende del 5 al 20% en peso de proteína basado en el peso en seco de la composición nutricional y que comprende al menos el 10% en peso basado en el peso en seco de la composición nutricional de la composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende la proteína.

[0019] La invención puede también redactarse como una composición nutricional que comprende del 5 al 20% en peso de proteínas basado en peso en seco de la composición nutricional y que comprende al menos el 10% en peso basado en el peso en seco de la composición nutricional de una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende la proteína, para su uso en la promoción de la salud intestinal mediante

- a) la reducción del esfuerzo digestivo,
- b) la mejora de la eficacia de la digestión de proteína
- c) la reducción de la pérdida de proteína endógena
- d) la reducción de la secreción endógena de proteasas, y/o
- e) la reducción de la carga de proteína que entra en el colon

en comparación con una composición nutricional que no comprende la composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende la proteína.

[0020] Para fines de claridad se advierte que la "composición nutricional" mencionada anteriormente se refiere a la composición nutricional final que debe ser ingerida o administrada y la "composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende proteína" está comprendida en la composición nutricional. A la composición nutricional por consiguiente también se puede referir como "composición nutricional final" o "composición nutricional total". A la "la composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende proteína" también se puede referir como "composición fermentada que comprende proteínas" o "ingrediente fermentado". Además para mayor claridad se observa que la "proteína" de la "la composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende proteína" está comprendida en el "5 al 20% en peso de proteína" de la composición nutricional.

[0021] Además, la invención también se refiere a una composición nutricional para bebés que comprende:

- a) proteína

- i. en una cantidad de desde el 5 al 20% en peso basada en el peso en seco de la composición nutricional, y
- ii) en una cantidad de desde 6 al 7,4 % calorías basada en calorías totales de la composición

nutricional,

b) lípidos en una cantidad de desde 35 al 60 % de calorías basada en calorías totales de la composición nutricional, y

c) carbohidratos en una cantidad del 40 al 60% de calorías basada en las calorías totales de la composición nutricional,

donde la composición nutricional comprende al menos el 10% en peso de una composición fermentada por las bacterias del ácido láctico que comprende la proteína basado en el peso en seco de la composición nutricional.

[0022] El término "composición nutricional" usado en toda esta descripción, es decir la composición nutricional final que debe ser ingerida o administrada, también se refiere a la "composición nutricional para bebés" especificada justo anteriormente.

Ingrediente fermentado

[0023] La presente composición nutricional comprende una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende proteína. La presente composición nutricional comprende preferiblemente una composición que comprende proteína derivada de la leche fermentada. Esta composición que comprende proteína derivada de la leche fermentada se obtiene por incubación de una combinación de leche, por ejemplo leche desnatada, o un producto derivado de la leche, por ejemplo suero de leche, con al menos una cepa de bacteria de ácido láctico, tal como lactococos, lactobacilos, estreptococos y bifidobacterias, preferiblemente con *Streptococcus thermophilus*. Preferiblemente la combinación se incuba durante 10 minutos hasta aproximadamente 6 horas. La temperatura durante la incubación es preferiblemente entre 20 y 50 °C. Tras la incubación la composición incubada es sometida preferiblemente a un tratamiento térmico. Por este tratamiento térmico preferiblemente son inactivados al menos el 90% de microorganismos vivos, de forma más preferible al menos el 95%, de forma más preferible al menos el 99%. Preferiblemente la composición nutricional fermentada comprende menos de  $110^3$  cfu de bacterias de ácido láctico vivas /g de peso en seco. El tratamiento térmico se realiza preferiblemente a una temperatura entre 80 y 180 °C. La inactivación de la bacteria del ácido láctico produce ventajosamente menos postacidificación y un producto más seguro. Esto es especialmente ventajoso cuando la composición nutricional debe ser administrada a bebés. Sorprendentemente se ha observado que los efectos beneficiosos de la composición nutricional fermentada no dependían de la presencia de bacterias del ácido láctico vivas. Los procedimientos para preparar ingredientes fermentados adecuados con motivo de la presente invención son conocidos de por sí. El documento EP 778885, que se incorpora aquí por referencia, divulga en particular en el ejemplo 7 un proceso adecuado para preparar una composición fermentada. El documento FR 2723960, que se incorpora aquí por referencia, divulga en particular en el ejemplo 6 un proceso adecuado para preparar una composición fermentada.

[0024] Brevemente, un producto derivado de la leche, preferiblemente pasteurizado, que contiene lactosa y opcionalmente otros macronutrientes tales como grasas, grasas preferiblemente vegetales, caseína, proteína de suero de leche, vitaminas y/o minerales etc. se concentra, por ejemplo entre el 15 al 50% de sustancia seca y luego se inocula con *S. thermophilus*, por ejemplo con un 5% de un cultivo que contiene  $10^6$  a  $10^{10}$  de bacterias por ml. Preferiblemente este producto derivado de la leche comprende péptidos de proteína de la leche. La temperatura y duración de la fermentación son como se ha mencionado anteriormente. Adecuadamente después de la fermentación la composición que comprende proteína fermentada se puede pasteurizar o esterilizar y por ejemplo secar con aerosol o liofilizar para proporcionar una forma adecuada para ser formulada al producto final.

[0025] Las cepas bacterianas de *S. thermophilus* que se usan preferiblemente para preparar la composición que comprende proteína fermentada con motivo de la presente invención desarrollan actividad de beta galactosidasa en el transcurso de la fermentación del sustrato. Preferiblemente la actividad de beta galactosidasa se desarrolla en paralelo con acidez. La selección de una cepa adecuada de *S. thermophilus* se describe en el ejemplo 2 de EP 778885 y en el ejemplo 1 de FR 2723960.

[0026] Las cepas preferidas de *S. thermophilus* para preparar la composición fermentada que comprende proteína, preferiblemente composición fermentada derivada de la leche que comprende proteína con motivo de la presente invención han sido depositadas por Compagnie Gervais Danone en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) llevada por el Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, París, Francia el 23 agosto 1995 bajo el número de registro I-1620 y el 25 agosto 1994 bajo el número de registro I-1470.

[0027] Preferiblemente, en la preparación de la composición fermentada que comprende proteína están presentes adicionalmente otras cepas de bacterias del ácido láctico o, bien simultáneamente o consecutivamente, la composición se fermenta adicionalmente por otras cepas de bacterias del ácido láctico. Otras cepas de bacterias del ácido láctico se seleccionan preferiblemente del grupo consistente en *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*, de forma más preferible *Bifidobacterium breve*, de la forma más preferible la cepa de *Bifidobacterium breve* depositada por Compagnie Gervais Danone en el CNCM bajo el número I-2219 el 31 mayo 1999.

[0028] En una forma de realización, la composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende

proteína es fermentada por *Streptococcus thermophilus*, y/o *Bifidobacterium breve*.

[0029] En una forma de realización, la composición nutricional comprende una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende proteína donde las bacterias del ácido láctico son inactivadas después de la fermentación.

[0030] Preferiblemente la presente composición fermentada que comprende proteína no se fermenta por *Lactobacillus bulgaricus*. Los productos fermentados por *L. bulgaricus* son considerados no adecuados para bebés, debido a que en bebés muy pequeños la deshidrogenasa específica que convierte el D-lactato en piruvato es mucho menos activa que la deshidrogenasa que convierte L-lactato.

[0031] La composición fermentada que comprende proteína, comprende proteína. La proteína se selecciona preferiblemente del grupo consistente en proteínas de animales no humanos, preferiblemente proteínas de leche. La proteína que comprende la composición fermentada contiene preferiblemente caseína, y/o proteína de suero de leche, más preferiblemente proteínas de suero de leche bovinas y/o caseína bovina. La composición fermentada que comprende proteína comprende preferiblemente caseína y proteínas de suero de leche en una proporción en peso de caseína:proteína de suero de leche de 10:90 a 90:10, de forma más preferible 20:80 a 80:20, incluso de forma más preferible 35:65 a 55:45.

[0032] La composición fermentada que comprende proteína comprende proteína proveyendo preferiblemente del 5 al 15% de las calorías totales de la composición fermentada que comprende proteína, preferiblemente proveyendo del 6 al 12%, de forma aun más preferible del 7 al 8,5 % de las calorías totales. En una forma de realización, la composición nutricional para bebés comprende composición fermentada que comprende proteína donde la proteína proporciona preferiblemente del 5 al 7,5 % de las calorías totales de la composición fermentada que comprende proteína, proporciona preferiblemente del 6 al 7,4%, incluso de forma más preferible del 6,5 a 7,3 % de las calorías totales. Cuando se encuentra en forma líquida, la composición fermentada que comprende proteína comprende preferiblemente de 0,5 a 6,0 g, de forma más preferible de 1,0 a 3,0 g, de forma aún más preferible 1,0 a 1,5 g de proteína por 100 ml, de la forma más preferible de 1,0 a 1,3 g de proteína por 100 ml. Basado en el peso en seco la presente composición fermentada que comprende proteína la comprende preferiblemente del 5 al 20% en peso de proteína, preferiblemente al menos el 8% en peso, de forma más preferible del 8 al 14 % en peso de proteína, de forma aún más preferible del 8 al 9,5 % en peso basado en el peso en seco de la composición fermentada que comprende proteína. Se considera que la proteína y los carbohidratos tienen una densidad calórica de 4 kcal/g, y grasa de 9 kcal/g.

[0033] La presente composición nutricional preferiblemente comprende 10 a 100 % en peso de la composición fermentada por bacterias de ácido láctico que comprende proteína, preferiblemente una composición derivada de la leche fermentada que comprende proteína, basada en peso en seco de la composición nutricional total. En una forma de realización la presente composición nutricional contiene preferiblemente 15 a 70 % en peso, preferiblemente 15 a 50 % en peso, basado en el peso en seco de la composición nutricional final de la composición fermentada por bacterias de ácido láctico que comprende proteína. Concentraciones más altas de composición fermentada que comprende proteína mejoran ventajosamente la eficacia de digestión de proteína.

[0034] El pH de la presente composición nutricional es preferiblemente entre 5.0 y 8.0, de forma más preferible entre 5.0 y 7.5, incluso de forma más preferible entre 5.0 y 6.0, de la forma más preferible entre 5.5 y 6.0. Preferiblemente la presente composición nutricional es un líquido con un pH de 5.5 a 6.0. La presente composición nutricional preferiblemente comprende ácido láctico y/o lactato. El ácido láctico y/o lactato se forman por la fermentación por bacterias de ácido láctico. Preferiblemente la presente composición nutricional comprende entre 0.1 y 1.5 % en peso de ácido láctico y/o lactato, de forma más preferible entre 0.2 y 1.0 % en peso, basado en el peso en seco de la composición nutricional. Cuanto más lactato está presente más comprende la composición nutricional de la composición fermentada que comprende proteína. Preferiblemente al menos 50 % en peso, incluso de forma más preferible al menos 90 % en peso, de la suma de ácido láctico y lactato está en forma de L-isómero. Así, en una forma de realización la suma de ácido L-láctico y L-lactato es mayor que 50 % en peso, de forma más preferible mayor que 90 % en peso, basados en la suma de ácido láctico y lactato total. L-lactato y ácido L-láctico es lo mismo que L-(+)-lactato y ácido L-(+) láctico.

[0035] En una forma de realización la composición nutricional para bebés comprende de 0,10 a 1,5 % en peso de la suma de lactato y ácido láctico basado en el peso en seco de la composición nutricional y donde la suma de ácido L-láctico y L-lactato es mayor que el 50 % en peso basado en la suma de ácido láctico y lactato total.

Componente de proteína

[0036] La presente composición nutricional comprende un componente de proteína. La proteína usada en la composición nutricional es preferiblemente seleccionada del grupo consistente en proteínas de animal no humano, preferiblemente proteínas de leche, proteínas vegetales, tales como preferiblemente proteína de soja y/o proteína de arroz, aminoácidos libres y sus mezclas derivadas. La presente composición nutricional contiene preferiblemente caseína, y/o proteína de suero de leche, de forma más preferible proteínas de suero de leche bovino y/o caseína

bovina. Así en una forma de realización el componente de proteína comprende proteína seleccionada del grupo consistente en proteína de suero de leche y caseína, preferiblemente proteína de suero de leche y caseína, preferiblemente la proteína de suero de leche y/o caseína es de leche de la vaca. La presente composición nutricional preferiblemente comprende caseína y proteínas de suero de leche en una proporción en peso caseína: proteína de suero de leche de 10:90 a 90:10, de forma más preferible 20:80 a 80:20, incluso de forma más preferible 35:65 a 55:45.

[0037] El % en peso basado en peso en seco de proteína de la presente composición nutricional se calcula según el método Kjeldahl midiendo el nitrógeno total y utilizando un factor de conversión de 6,38 en caso de caseína, o un factor de conversión de 6,25 para otras proteínas distintas de caseína.

[0038] La presente composición nutricional comprende proteína que proporciona preferiblemente de 5 a 15 % de las calorías totales de la composición nutricional, preferiblemente proporciona de 6 a 12%, incluso más preferiblemente 7 a 8,5 % de las calorías totales de la composición nutricional. En una forma de realización, la composición nutricional para bebés según la invención comprende proteína que proporciona preferiblemente de 5 a 7.5 % de las calorías totales de la composición nutricional, preferiblemente proporciona de 6 a 7.4%, incluso de forma más preferible 6.5 a 7.3 % de las calorías totales de la composición nutricional. Un contenido proteico demasiado bajo basado en las calorías totales resultará en un desarrollo y crecimiento menos adecuado en bebés y niños pequeños. Cuando están en forma líquida, por ejemplo como un líquido listo para alimentación, la composición nutricional preferiblemente comprende 0.5 a 6.0 g, de forma más preferible 1.0 a 3.0 g, incluso de forma más preferible 1.0 a 1.5 g de proteína por 100 ml, de la forma más preferible 1.0 a 1.3 g de proteína por 100 ml. Basado en el peso en seco la presente composición nutricional preferiblemente comprende 5 a 20 % en peso de proteína, preferiblemente al menos 8 % en peso de proteína basado en el peso en seco de la composición nutricional total, de forma más preferible 8 a 14 % en peso, incluso de forma más preferible 8 a 9.5 % en peso de proteína basado en el peso en seco de la composición nutricional total. Puesto que el uso de la presente composición nutricional da como resultado una eficacia de digestión de proteína aumentada y un esfuerzo digestivo de proteína reducido, la cantidad de proteína basada en las calorías totales, basada en 100 ml o basada en el peso en seco de la composición puede ventajosamente ser inferior a la de la fórmula infantil estándar.

[0039] Actualmente la concentración de proteína en fórmulas infantiles es superior que en la leche humana, para asegurar la absorción adecuada de aminoácidos esenciales. Una concentración de proteína aumentada no obstante, tiene desventajas tal y como se menciona en la sección "solicitud", impone una carga más pesada en los riñones de los bebés y también se relaciona con la obesidad y otros efectos adversos más tarde en la vida. El término 'proteína' o 'componente proteico' como usados en la presente invención se refiere a la suma de proteínas, péptidos y aminoácidos libres.

#### Composición nutricional

[0040] La presente composición nutricional es preferiblemente especialmente adecuada para la provisión de los requisitos nutricionales diarios completos a un sujeto humano con una edad por debajo de 36 meses, de forma más preferible un bebé humano. La presente composición nutricional no es un yogur, puesto que el yogur contiene por costumbre *L. bulgaricus* (Código estándar para leches fermentadas Codex Stan 243-2003).

[0041] La presente composición nutricional comprende preferiblemente un componente de carbohidrato digerible. Componentes de carbohidrato digeribles preferidos son lactosa, glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, maltosa, almidón y maltodextrina. Lactosa es el carbohidrato digerible principal presente en leche humana. La presente composición nutricional preferiblemente comprende lactosa. La presente composición nutricional preferiblemente comprende carbohidrato digerible, donde al menos 35 % en peso, de forma más preferible al menos 50 % en peso, de forma más preferible al menos 75 % en peso del carbohidrato digerible es lactosa. Basado en el peso en seco la presente composición nutricional preferiblemente comprende al menos 25 % en peso de lactosa, preferiblemente al menos 40 % en peso.

[0042] Cuando está en forma líquida, por ejemplo como un líquido listo para la alimentación, la composición nutricional preferiblemente comprende 3,0 a 30 g carbohidrato digerible por 100 ml, de forma más preferible 6.0 a 20, incluso de forma más preferible 7.0 a 10.0 g por 100 ml. Basado en el peso en seco la presente composición nutricional preferiblemente comprende 20 a 80 % en peso, de forma más preferible 40 a 65 % en peso de carbohidratos digeribles. Basado en calorías totales la composición nutricional preferiblemente comprende 30 a 60 % de calorías derivadas de carbohidratos digeribles, de forma más preferible 40 a 60 %.

[0043] La presente composición nutricional preferiblemente comprende un componente lipídico. Preferiblemente el componente lipídico de la presente composición nutricional proporciona 35 a 60 % de las calorías totales de la composición nutricional, preferiblemente el componente lipídico proporciona 40 a 50% de las calorías totales. Cuando está en forma líquida, por ejemplo como un líquido listo para la alimentación, la composición nutricional preferiblemente comprende 2.1 a 6.5 g de lípidos por 100 ml, de forma más preferible 3.0 a 4.0 g por 100 ml. Basado en el peso en seco la presente composición nutricional preferiblemente comprende 12.5 a 40 % en peso de lípidos, de forma más preferible 19 a 30 % en peso.

[0044] Preferiblemente el componente lipídico comprende los ácidos grasos esenciales ácido alfa-linolénico (ALA), ácido linoleico (LA) y/o ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA). Los LC-PUFA, LA y/o ALA se pueden proporcionar como ácidos grasos libres, en forma de triglicérido, en la forma de diglicérido, en la forma de monoglicérido, en forma de fosfolípido, o como una mezcla de uno de más de los anteriores. Preferiblemente la presente composición nutricional contiene al menos una, preferiblemente al menos dos fuentes lipídicas seleccionadas del grupo consistente en aceite de semilla de colza (tal como aceite de colza, aceite de semilla de colza bajo en ácido erúxico y aceite de canola), aceite de girasol alto oleico, aceite de alazor alto oleico, aceite de oliva, aceites marinos, aceites microbianos, aceite de coco, aceite de nuez de palma y grasa láctea.

[0045] La presente composición nutricional no es leche materna humana. La presente composición nutricional preferiblemente comprende un componente lipídico y un componente de proteína y un componente de carbohidrato digerible. La composición nutricional según la invención o la composición nutricional usada según la invención comprende preferiblemente otras fracciones, tales como vitaminas, minerales, oligoelementos y otros micronutrientes para hacerla una composición nutricional completa. Preferiblemente la composición nutricional es seleccionada del grupo consistente en una fórmula infantil, fórmulas de continuación, leche para niños o leche de fórmula y crecimiento, de forma más preferible forman el grupo consistente en una fórmula infantil y fórmulas de continuación. En una forma de realización la composición nutricional es una fórmula infantil. Las fórmulas para bebés y de continuación comprenden vitaminas, minerales, oligoelementos y otros micronutrientes según directivas internacionales.

[0046] Preferiblemente el componente lipídico proporciona 35 a 60%, preferiblemente 40 a 50% de las calorías totales, el componente de proteína proporciona 5 a 15%, preferiblemente 6 a 7,4% de las calorías totales y el componente de carbohidrato digerible proporciona 30 a 60%, preferiblemente 35 a 60%, de forma más preferible 40 a 60% de las calorías totales de la composición nutricional final. Preferiblemente la presente composición nutricional comprende un componente lipídico que proporciona de 40 a 50% de las calorías totales, un componente de proteína que proporciona de 6 a 12%, preferiblemente 6 a 7.4% de las calorías totales y un componente de carbohidratos digeribles que proporciona de 40 a 60% de las calorías totales de la composición nutricional final. La cantidad de calorías totales se determina por la suma de calorías derivadas de proteína, lípidos y carbohidratos digeribles.

[0047] En una forma de realización la composición nutricional está en una forma líquida. En otra forma de realización la composición nutricional es un polvo adecuado para hacer una composición nutricional líquida después de la reconstitución con una solución acuosa, preferiblemente con agua. Preferiblemente la fórmula de leche infantil es un polvo por ser reconstituido con agua. Preferiblemente la composición líquida tiene una viscosidad por debajo de 100 mPa.s, de forma más preferible por debajo de 60 mPa.s, de forma más preferible por debajo de 35, mPa.s incluso de forma más preferible por debajo de 6 mPa.s como medido en un viscosímetro Brookfield a 20°C a una velocidad de cizalladura de 100 s<sup>-1</sup>. Una viscosidad baja es importante para fórmulas para bebés o de continuación, debido a que imita la viscosidad de la leche materna y puede ser administrada después a través de una tetilla.

[0048] Para satisfacer los requisitos calóricos de un bebé, la composición nutricional preferiblemente comprende 50 a 200 kcal/100 ml de líquido, de forma más preferible 60 a 90 kcal/100 ml de líquido, incluso de forma más preferible 60 a 75 kcal/100 ml de líquido. Esta densidad calórica asegura una proporción óptima entre agua y consumo de calorías. La osmolaridad de la presente composición está preferiblemente entre 150 y 420 mOsmol/l, de forma más preferible 260 a 320 mOsmol/l. La osmolaridad baja pretende reducir más la tensión gastrointestinal.

[0049] Cuando la composición nutricional está en forma líquida, el volumen preferido administrado sobre una base diaria está en la gama de aproximadamente 80 a 2500 ml, de forma más preferible aproximadamente 200 a 1200 ml al día. Preferiblemente, el número de alimentaciones al día es entre 1 y 10, preferiblemente entre 3 y 8. En una forma de realización la composición nutricional se administra diariamente para un periodo de al menos 2 días, preferiblemente para un periodo de al menos 4 semanas, preferiblemente para un periodo de al menos 8 semanas, de forma más preferible para un periodo de al menos 12 semanas, en una forma líquida donde el volumen total administrado diariamente está entre 200 ml y 1200 ml y donde el número de alimentaciones al día es entre 1 y 10.

Solicitud

[0050] Los inventores han descubierto que después del consumo de la composición nutricional de la presente invención la cantidad de enzimas proteolíticas endógenas que fue detectada en el íleon terminal fue reducida significativamente en comparación con la cantidad detectada después del consumo de una composición nutricional estándar que no contenga un ingrediente fermentado. Además, aun cuando la ingesta de proteína diaria fuera más alta, la digestibilidad de proteína aparente y real fue la máxima en el grupo que consumió la composición nutricional de la presente invención.

[0051] Se descubrió que la composición nutricional de la presente invención redujo el esfuerzo digestivo. Esfuerzo digestivo se define como la cantidad de actividad de proteasa segregada por gramo de proteínas ingerido.

[0052] Se ha descubierto que la composición nutricional de la presente invención mejora la eficacia de digestión de

proteína. La eficacia de digestión de proteína es definida como la cantidad de proteína ingerida por unidad arbitraria (AU) de la actividad de proteasa. Se descubrió que la composición nutricional de la presente invención reduce la pérdida de proteína endógena, como la pérdida de proteasas formadas endógenamente. Esto era en particular el caso de la tripsina y/o quimotripsina y/o elastasa. La tripsina y quimotripsina son en un bebé las proteasas digestivas más importantes, debido a que la pepsina gástrica es menos activa debido a un pH más alto en el estómago. Además, se ha descubierto que las proteasas estimulan la pérdida endógena de otras proteínas, tales como las mucinas.

[0053] Se ha descubierto que la composición nutricional de la presente invención reduce la carga de proteína que entra en el colon.

[0054] Estos efectos se observan en comparación con la situación antes de la administración de la composición nutricional y/o de la situación en comparación con la administración de una composición nutricional estándar que no comprende la composición fermentada que comprende proteína. Se ha descubierto que estos efectos observados también son más similares a los efectos que ocurren en los bebés alimentados con leche humana en comparación con bebés alimentados con fórmula infantil estándar, debido a que se ha observado que la actividad proteolítica en muestras fecales de bebés alimentados exclusivamente a pecho fue inferior a la de bebés alimentados con una fórmula estándar.

[0055] Por estos efectos mencionados anteriormente la composición nutricional de la presente invención mejora la salud intestinal. En una forma de realización la presente composición nutricional para bebés es de uso para promover la salud del intestino. Preferiblemente la salud intestinal es seleccionada del grupo consistente en microbiota intestinal bien equilibrada mejorada, función de barrera intestinal aumentada, dolor abdominal disminuido, prevención y/o tratamiento de inflamación intestinal, prevención y/o tratamiento de infecciones intestinales, prevención y/o tratamiento de diarrea, prevención y/o tratamiento de cólicos o calambres, prevención y/o tratamiento de hinchamiento abdominal, prevención y/o tratamiento de dilatación abdominal, y prevención y/o tratamiento de dermatitis de pañal. Preferiblemente la salud intestinal es seleccionada del grupo consistente en función de barrera intestinal aumentada, dolor abdominal disminuido, prevención y/o tratamiento de inflamación intestinal, prevención y/o tratamiento de cólicos o calambres, prevención y/o tratamiento de hinchamiento abdominal, prevención y/o tratamiento de dilatación abdominal, y prevención y/o tratamiento de dermatitis de pañal. En una forma de realización la composición nutricional de la presente invención mejora la salud intestinal por prevención y/o tratamiento de estreñimiento.

[0056] En particular la cantidad reducida de proteína que entra en el colon supondrá una actividad más sacarolítica y menos proteolítica de la microbiota intestinal. La fermentación de azúcares en vez de aminoácidos supondrá un pH inferior del colon y/o una formación reducida de metabolitos tóxicos tales como indoles, fenoles y aminos. Esto también supondrá más bifidobacterias y/o lactobacilos y/o bacterias menos patógenas en la microbiota intestinal. Las cantidades de bacterias se pueden expresar como cfu por g heces y/o como un porcentaje basado en cfu de bacterias totales. Tal microbiota intestinal mejorada supondrá infecciones intestinales reducidas y/o reducción de diarrea.

[0057] En particular la cantidad reducida de proteasas, más específicamente las serina proteasas tal como tripsina y quimotripsina, supondrán una escisión reducida de PAR-2 con efecto de una función de barrera intestinal aumentada. Una función de barrera aumentada supondrá una translocación reducida de toxinas, alérgenos y patógenos y por lo tanto un efecto ventajoso en la infección, diarrea y/o inflamación. También la escisión reducida PAR-2 supondrá menor percepción de dolor abdominal. La actividad proteolítica fecal aumentada está particularmente asociada a IBD (enfermedad inflamatoria intestinal) tal como colitis ulcerosa y con síndrome del intestino irritable diarreogénico (IBS-D). La actividad proteolítica fecal aumentada está en particular asociada a la incidencia de dermatitis de pañal. Por lo tanto la presente composición nutricional de la invención es preferiblemente para el uso en el tratamiento y/o prevención de dermatitis de pañal. Además, la síntesis inferior de proteasas, concomitante con la digestibilidad de proteína aumentada produce menos pérdida de energía y proteína, que mejora el crecimiento y desarrollo.

[0058] La fermentación colónica de proteínas supondrá cambios en calidad o cantidad de formación de gas y por lo tanto un hinchamiento abdominal aumentado y/o dilatación abdominal. Por lo tanto la presente composición nutricional tendrá un efecto en la reducción de hinchamiento abdominal y/o distensión abdominal y de trastornos resultante de los mismos. La activación de receptores activados de proteasa aumenta la percepción de dolor y tiene un efecto negativo en la función de barrera intestinal. La actividad proteolítica inferior puede así contribuir a la prevención aumentada y/o tratamiento de cólicos o calambres.

[0059] Todos estos efectos observados y mencionados anteriormente son particularmente importantes en los sujetos humanos jóvenes, puesto que necesitan crecer y desarrollarse, tener una barrera intestinal más inmadura y una microbiota intestinal menos desarrollada. En otras palabras, en los sujetos humanos jóvenes, mejorar el esfuerzo digestivo de proteína, la regulación de la liberación de proteína endógena, la restricción de pérdida de proteína, y reducir la carga de proteína en el colon es de mucha importancia. El desarrollo intestinal es un proceso complejo. Es factible que la fuga intestinal hace a los bebés durante los primeros meses de vida más susceptibles a niveles

elevados de actividad proteolítica, que puede desencadenar bajos niveles de inflamación y percepción de dolor aumentada. Esto puede explicar los efectos beneficiosos de la fórmula fermentada que induce menos liberación de proteasa endógena. Por lo tanto, la composición nutricional es preferiblemente usada para alimentar a un bebé humano.

5 [0060] En una forma de realización la invención se refiere a un método, preferiblemente un método no terapéutico, para

- a reducción del esfuerzo de digestión,
- 10 b mejorar la eficacia de digestión de proteína
- c reducir la pérdida de proteína endógena
- d reducir la secreción endógena de proteasas, y/o
- e reducir la carga de proteína que entra en el colon

15 en comparación con una composición nutricional que no comprende una composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende proteína, dicho método comprendiendo la administración de la composición nutricional a bebés según la presente invención. Preferiblemente para este método la composición nutricional para bebés comprende lactosa.

20 [0061] Preferiblemente la presente composición nutricional se usa para suministrar alimento a un bebé humano con una edad de 36 meses o menor, de forma más preferible de 18 meses o menor, incluso de forma más preferible un bebé con una edad de 12 meses o menor, de la forma más preferible un bebé con una edad de 6 meses o menor. Las presentes composiciones nutricionales son administradas preferiblemente enteralmente, de forma más preferible por vía oral.

25 [0062] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitante para significar que están incluidos artículos después de la palabra, pero los artículos no específicamente mencionados no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "uno" no excluye la posibilidad de que esté presente más de un elemento, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "uno" por tanto normalmente significa "al menos uno. p. significa peso.

Ejemplo 1:

35 [0063] Un estudio doble ciego controlado por placebo aleatorizado prospectivo con diseño de grupos paralelo fue realizado en bebés nacidos de término saludable hasta que los bebés tenían un año. Los grupos de prueba fueron:

[0064] Grupo 1: Bebés alimentados a fórmula completa después de 2 meses a más tardar de recibir una fórmula estándar basada en leche de vaca no hidrolizada (N=41). Grupo 2: bebés alimentados completamente a pecho durante al menos 4 meses (N=43).

45 [0065] Las muestras fecales fueron recogidas la semana 16 después del nacimiento y almacenadas a -20°C hasta otro análisis. La actividad proteolítica fecal fue medida con el equipo de ensayo EnzCheck a base de fluorescencia de proteasa (E6638, Invitrogen, Carlsbad, Ca, EE. UU) para detección de metalo-, serina y sulfhidrilo proteasas. Las muestras fecales fueron diluidas x 1000 en 1x PBS, centrifugadas a 13.000 r.p.m. durante 3 minutos para eliminar partículas grandes, y 100 µl de sobrenadante se añadió a 100 µl de caseína BODIPi activa (10 µg BODIPi caseína). El aumento en la fluorescencia fue medido a 25 °C para un periodo de 10 minutos. La pancreatina porcina (Sigma, P1750) fue usada para preparar una curva de calibración. Para determinar el origen de actividad de proteasa, el inhibidor específico de serina proteasa AEBSF (Sigma, A8456) fue añadido en cada análisis con una concentración final de 5mM.

50 La proteína en los sobrenadantes fecales fue determinada utilizando el método BCA (Pierce). La actividad proteolítica fecal fue expresada como unidades arbitrarias (AU) basada en la actividad de pancreatina en USP, unidad estándar para la actividad según la Farmacopea de Estados Unidos por contenido en gramos de proteína fecal. Las estadísticas fueron realizadas con el test U de Mann-Whitney. En el grupo alimentado con leche materna la actividad proteolítica fecal fue de 313 AU por mg de proteína (SEM 21) y en el grupo que consumía fórmula infantil estándar la actividad proteolítica fue de 406 AU por mg proteína (SEM 33). El p-valor estaba por debajo de 0.05.

60 [0066] La actividad proteolítica fue principalmente derivada de serina proteasas (es decir enzimas pancreáticas o producidas por microbiota colónica), puesto que el inhibidor específico de serina proteasa AEBSF bloqueaba la actividad proteolítica más del 70%.

Ejemplo 2: Experimentos en animales

65 [0067] Para investigar la digestión de proteína in vivo, los cerdos son la primera elección puesto que se asemejan mucho a la fisiología digestiva humana (Miller et al. 1987, Annu Rev Nutr, 7:361-82) y generan nitrógeno ileal real comparable y aminoácido (AA) digeribles (Deglaire et al. 2009, Br J Nutr, 102(12):1752-9, Rowan et al. 1994, Br J

Nutr, 71(1):29-42). Además, un estudio por Moughan et al. ha demostrado que lechones de 3 semanas de edad se pueden usar como un modelo para bebés de 6 meses (Moughan et al. 1991, J Nutr, 121(10):1570-4). Por lo tanto, la digestibilidad AA de una fórmula infantil fermentada y estándar (IF) fue evaluada en un modelo de lechoncillo. Una fórmula hidrolizada (Nutrilon Pepti) fue usada para corregir las pérdidas endógenas AA según el método de alimentación del péptido (Rutherford et al. 1998, J Dairy Sci, 81(4):909-17).

[0068] Seis lechones machos de edad y peso similares (peso medio 4,9 kg) fueron alojados en grupos a partir de 2 semanas de edad. A las tres semanas de edad recibieron una cánula T en la parte distal del íleon terminal después de haber estado toda la noche en ayunas y después fueron alojados individualmente. Desde el día 31 en adelante los cerdos recibieron las siguientes dietas:

Dieta 1: Lactofidus-1, una fórmula de leche infantil disponible comercialmente comercializada bajo la marca Gallia, que comprende 100 % de una composición derivada de la leche fermentada. Lactofidus se produce por fermentación con *B. breve* y *S. thermophilus*. Comprende 12.2 g de proteína por 100 g peso en seco del cual 60 % en peso de caseína y 40 % en peso de proteína de suero de leche. El pH es 5.6.

Dieta 2: Nutrilon-2, una fórmula de continuación estándar no fermentada comercializada bajo la marca Nutricia, que comprende proteína no hidrolizada, 9.3 g por 100 g de peso en seco del que 50 % en peso es proteína de suero de leche no hidrolizada y 50 % en peso es caseína. El pH es 6.8.

Dieta 3: Pepti-2, un IMF comercializado bajo la marca de Nutricia que comprende 11.2 g de proteína por 100 g de peso en seco en forma de 100 % en peso de proteína de suero de leche extensivamente hidrolizada. El pH es 6.4.

[0069] La FLI en polvo, fermentada, estándar e hidrolizada fue diluida en agua desmineralizada (37°C) hasta un contenido de sustancia en seco final de 21.0%, 22.05% y 21.45%, respectivamente (el contenido de proteína siendo 2,46, 2,05, y 2,55 g/100ml). El óxido de cromo se añadió a la FLI en polvo como marcador indigerible. Hasta el día 31, los lechones recibieron una mezcla 1:1:1 en p/p/p de dieta 1, 2 y 3. Desde el día 31 hasta el día 36 los lechones recibieron cada uno la dieta 1, 2 o 3 en un diseño de cuadrados latinos según el esquema de alimentación de la tabla 1. Los cerdos fueron alimentados a las 7:00 h, 9:30 h, 14:00 h y 16:00 h. La digesta ileal fue recogida el día 32, 34 y 36 desde las 8.00 h hasta 17.00 h, a través de la cánula T en bolsas pequeñas que fueron almacenadas en el hielo inmediatamente cuando fueron rellenas. Todas las muestras de digesta fueron pesadas, el pH medido y almacenado a -20°C hasta otro tratamiento. Para las mediciones de actividad enzimática una submuestra (2 ml) fue centrifugada (13.000 g durante 10 minutos a 4°C) y los sobrenadantes fueron divididos en partes alícuotas y almacenados a -80°C.

Tabla 1: Esquema de alimentación

Lechoncillo	Día 31-32	Día 33-34	Día 35-36
1	1	2	3
2	1	3	2
3	2	1	3
4	2	3	1
5	3	1	2
6	3	2	1

[0070] Sustancia seca (DM) (gravimetría a 80°C), óxido de cromo (Cr) (espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente), proteína cruda (CP) (método de Kjeldahl, N x 6,25) y composición de aminoácidos (AA) (HPLC después 6M HCL hidrólisis) fueron analizados en las muestras de digesta liofilizada y polvos de dieta.

[0071] La actividad proteolítica total en la digesta ileal fue determinada utilizando el equipo de ensayo EnzCheck a base de fluorescencia de proteasa (E6638, Invitrogen, Carlsbad, Ca., EE. UU) para detección de metalo-, serina y sulfhidrido proteasas. La digesta fue diluida x 750 con 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, y 100 µl de muestras fueron añadidas a 100 µl de caseína BODIPi activa (10 µg BODIPi caseína). El aumento en la fluorescencia fue medido a 25 °C para un periodo de 10 minutos. La pancreatina porcina (Sigma, P1750) fue usada para preparar una curva de calibración. Para determinar el origen de la actividad de proteasa, el inhibidor específico de serina proteasa AEBSF (Sigma, A8456) fue añadido en cada análisis con una concentración final de 5 mM. La actividad se expresa como unidad arbitraria (AU) (basada en la actividad de pancreatina en USP).

[0072] La actividad de tripsina fue medida usando N<sub>α</sub>-Benzoil-L-Argine ester etílico (BAEE, Sigma B4500) como sustrato y midiendo el cambio de absorbancia a 25 °C 253 nm (según las instrucciones del fabricante). La tripsina bovina (Sigma; T9201) fue usada para preparar una curva de calibración. La actividad se expresa como unidad arbitraria (AU) (basada en la actividad de tripsina en U).

[0073] La quimotripsina fue medida usando N<sub>α</sub>-Benzoil-L-Tirosina ester etílico (BTEE, Sigma B6125) como sustrato y midiendo el cambio de absorbancia a 25°C a 256 nm. La quimotripsina bovina (Sigma; C3142) fue usada para preparar una curva de calibración. La actividad se expresa como unidad arbitraria (AU) (basada en actividad de

quimiotripsina en U).

5 [0074] La actividad de elastasa fue medida usando SucAla3-PNA (S4760, Sigma) como sustrato y elastasa porcina (E7885, Sigma) fue usada para preparar una curva de calibración. La actividad se expresa como unidad arbitraria (AU) (basada en actividad de elastasa en U).

[0075] Las ecuaciones usadas para calcular la digestibilidad de AA (las unidades están en µg/g DMI):

$$\text{Flujo ileal de AA} = \text{AA ileales} \times \frac{\text{Cr dieta}}{\text{Cr digesta}}$$

$$\text{Flujo de AA endógenos} = \text{AA ileales (MW>10 kD)} \times \frac{\text{Cr dieta}}{\text{Cr digesta}}$$

10

$$\text{Digestibilidad aparente de AA ileales (\%)} = \frac{\text{toma de AA} - \text{flujo ileal de AA}}{\text{toma de AA}} \times 100\%$$

$$\text{Digestibilidad real de AA ileales (\%)} = \frac{\text{Toma de AA} - (\text{flujo de AA ileales} - \text{flujo de AA endógenos})}{\text{toma de AA}} \times 100\%$$

15

[0076] Los resultados fueron analizados utilizando análisis de varianza univariante (procedimiento GLM). Las diferencias entre dietas fueron consideradas significativas con p<0.05 según el test LSD.

20

[0077] Los resultados de la tabla 2 muestran que el pH de la digesta ileal fue la misma. También la osmolaridad era la misma. La cantidad de ingesta de proteína cruda fue máxima en la fórmula hidrolizada y en la fórmula fermentada. De manera interesante, la cantidad de proteína en la digesta ileal y la cantidad relativa de proteína basada en la toma de proteína fue significativamente inferior en los lechones que consumieron fórmula fermentada que en los otros dos grupos. Este flujo de proteína al colon es por lo tanto mínimo en lechones que consumieron fórmula fermentada. La digestibilidad de proteína cruda ileal aparente y real fue más alta en lechones que consumieron la fórmula fermentada que en el grupo que consumió la fórmula estándar. La digestibilidad de aminoácido ileal aparente y real fue más alta en los lechones que consumieron la fórmula fermentada que en el grupo que consumió la fórmula estándar. Lo mismo es aplicable para la mayoría de los aminoácidos individuales. La digestibilidad de glicina real difiere de forma máxima. Esto es indicativo de una reducción en la secreción de proteína endógena. El flujo de aminoácido endógeno era rico principalmente en ácido glutámico, treonina, ácido aspártico, prolina y serina.

25

ES 2 539 607 T3

Tabla 2. Ingesta de dieta, características de digesta ileal & digestibilidad de AA ileales

	Nutrilon	Lactofidus	Pepti	SE en conjunto
Toma de DM (g/día)	403 <sup>a</sup>	388 <sup>b</sup>	391 <sup>b</sup>	3.641
Toma de CP (g/día)	37.4 <sup>a</sup>	45.4 <sup>b</sup>	46.4 <sup>c</sup>	0.317
Toma de AA total (g/día)	39.1 <sup>a</sup>	47.7 <sup>b</sup>	50.2 <sup>c</sup>	0.347
Osmolaridad de digesta Ileal (mOsm/kg)	305	305	309	3.3
Digesta Ileal pH	7.91	7.95	7.90	0.06
Digesta Ileal de CP (g/g CPi)	0.16 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.16 <sup>a</sup>	0.01
Digesta ileal Total CP (g/día)	5.96 <sup>a</sup>	3.64 <sup>b</sup>	7.27 <sup>c</sup>	0.279
Digestibilidad de proteína cruda ileal aparente (%)	84.2 <sup>a</sup>	92.0 <sup>b</sup>	x	0.81
digestibilidad aparente ileal de AA (%)	89.1 <sup>a</sup>	94.4 <sup>b</sup>	x	0.53
Alanina	85.0 <sup>a</sup>	91.1 <sup>b</sup>	x	0.81
Arginina	85.8 <sup>a</sup>	93.1 <sup>b</sup>	x	0.68
Ácido aspártico	88.6 <sup>a</sup>	93.8 <sup>b</sup>	x	0.51
Cistina	85.1	89.5	x	1.06
Ácido glutámico	93.1 <sup>a</sup>	96.3 <sup>b</sup>	x	0.29
Glicina	48.5	78.5 <sup>b</sup>	x	4.81
Histidina	88.9 <sup>a</sup>	94.5 <sup>b</sup>	x	0.51
Isoleucina	91.9 <sup>a</sup>	95.8 <sup>b</sup>	x	0.34
Leucina	93.4 <sup>a</sup>	96.5 <sup>b</sup>	x	0.29
Lisina	91.1 <sup>a</sup>	96.1 <sup>b</sup>	x	0.31
Metionina	93.9 <sup>a</sup>	97.2 <sup>b</sup>	x	0.36
Fenilalanina	88.8 <sup>a</sup>	94.6 <sup>b</sup>	x	0.40
Prolina	90.1 <sup>a</sup>	95.4 <sup>b</sup>	x	0.59
Serina	84.6 <sup>a</sup>	92.2 <sup>b</sup>	x	0.63
Treonina	79.0 <sup>a</sup>	88.1 <sup>b</sup>	x	1.05
Tirosina	90.7 <sup>a</sup>	94.7 <sup>b</sup>	x	0.37
Valina	90.6 <sup>a</sup>	95.2 <sup>b</sup>	x	0.54
Digestibilidad de proteína cruda ileal real (%)	94.2 <sup>a</sup>	99.9 <sup>b</sup>	x	0.89
Digestibilidad de AA Ileal real (%)	97.1 <sup>a</sup>	100.8 <sup>b</sup>	x	0.61
Alanina	96.7 <sup>a</sup>	101.2 <sup>b</sup>	x	0.87
Arginina	94.4 <sup>a</sup>	99.4 <sup>b</sup>	x	0.82
Ácido aspártico	97.3 <sup>a</sup>	101.3 <sup>b</sup>	x	0.58
Cistina	97.0 <sup>a</sup>	102.2 <sup>b</sup>	x	1.01
Ácido glutámico	98.6 <sup>a</sup>	100.6 <sup>b</sup>	x	0.34
Glicina	72.4 <sup>a</sup>	97.4 <sup>b</sup>	x	4.74
Histidina	96.4 <sup>a</sup>	100.3 <sup>b</sup>	x	0.63
Isoleucina	99.1 <sup>a</sup>	101.7 <sup>b</sup>	x	0.42
Leucina	98.5 <sup>a</sup>	100.7 <sup>b</sup>	x	0.35
Lisina	96.6 <sup>a</sup>	100.6 <sup>b</sup>	x	0.37
Metionina	98.8 <sup>a</sup>	100.9 <sup>b</sup>	x	0.42
Fenilalanina	96.3 <sup>a</sup>	100.1 <sup>b</sup>	x	0.53
Prolina	97.4 <sup>a</sup>	100.8 <sup>b</sup>	x	0.66
Serina	96.6 <sup>a</sup>	101.3 <sup>b</sup>	x	0.73
Treonina	96.5 <sup>a</sup>	102.7 <sup>b</sup>	x	1.12
Tirosina	97.8	100.0	x	0.53
Valina	98.5 <sup>a</sup>	101.3 <sup>b</sup>	x	0.43

x = no determinado  
<sup>(a-c)</sup>valores con letras diferentes en la misma fila son diferentes (p<0.05)

Tabla 3 Actividades de enzimas proteolíticas Ileales

	Nutrilon	Lactofidus	Pepti	SE en conjunto
Actividad proteolítica total				
AU x 10 <sup>3</sup> /8h	1599 <sup>a</sup>	477 <sup>b</sup>	759 <sup>b</sup>	140
AU x 10 <sup>3</sup> /g CPi	41.4 <sup>a</sup>	10.5 <sup>b</sup>	16.5 <sup>b</sup>	3.3
Actividad de tripsina				
AU x 10 <sup>3</sup> /8h	908 <sup>a</sup>	334 <sup>b</sup>	621 <sup>c</sup>	74
AU/g CPi	23.9 <sup>a</sup>	7.4 <sup>b</sup>	13.5 <sup>c</sup>	1.6
Actividad de quimotripsina				
AU/8h	665 <sup>a</sup>	294 <sup>b</sup>	486 <sup>ab</sup>	73
				1.8
AU/g CPi	17.2 <sup>a</sup>	6.5 <sup>b</sup>	10.3 <sup>b</sup>	
Actividad de elastasa				
AU / 8h	191 <sup>a</sup>	69 <sup>b</sup>	123 <sup>c</sup>	13
AU / CPi	4.78 <sup>a</sup>	1.45 <sup>b</sup>	2.47 <sup>c</sup>	0.27

NS = no significativo, x = no determinado.

<sup>(a-c)</sup> Los valores con letras diferentes en la misma fila son diferentes (p<0.05)

5 [0078] Los resultados en la tabla 3 muestran que la cantidad de actividad proteolítica segregada durante las 8 h de recogida es mínima en lechones que consumieron lactofidus, la fórmula infantil fermentada, en comparación con la fórmula no fermentada estándar o una FLI hidrolizada predigerida. Este es el caso de la actividad proteolítica total al igual que la tripsina y quimotripsina. Este es el caso de la actividad de elastasa. Este efecto también se observó cuando se basó en la cantidad de toma de proteínas.

10 [0079] La actividad proteolítica está principalmente derivada de proteasas de serina (es decir, enzimas pancreáticas tales como tripsina y quimotripsina), puesto que el inhibidor específico AEBSF de serina proteasa bloqueó la actividad proteolítica en más de 90%. Así, la cantidad de actividad proteolítica que accede al colon es inferior después del consumo de una fórmula fermentada, que lo asemeja más a la situación de bebés alimentados a pechos (véase ejemplo 1).

15 [0080] Sorprendentemente la digestibilidad aparente y real de proteína es máxima cuando se consumió la fórmula fermentada, aunque se formó la cantidad mínima de proteasas. Esto significa que la eficacia digestiva (en [proteína ingerida/actividad de proteasa en AU]) es más alta. Asimismo, la cantidad de actividad proteolítica por g de toma de proteína es inferior, lo que es indicativo de un esfuerzo digestivo disminuido.

20 Ejemplo 3: fórmula infantil baja en proteína

[0081] Una fórmula infantil reconstituida que comprende por 100 ml:

25 12.3 g de sustancia seca, 66 kcal  
 1.19 g de proteína (proteína/caseína de suero de leche bovino en 1/1 proporción en peso), 7.2 % basado en calorías totales  
 7.76 g de carbohidrato (principalmente lactosa)  
 3.36 g de grasa (principalmente grasa vegetal).

30 [0082] De esta composición el 30 % basado en peso en seco es derivado de lactofidus-1 como se describe en el ejemplo 2. La composición comprende además vitaminas, minerales, oligoelementos y otros micronutrientes según directivas internacionales.

**REIVINDICACIONES**

1. Método no terapéutico para

- 5 a reducir el esfuerzo digestivo,
- b mejorar la eficacia de digestión de proteína,
- c reducir la pérdida de proteína endógena,
- d reducir la secreción endógena de proteasas, y/o
- 10 e reducir la carga de proteína que entra en el colon

10 en comparación con una composición nutricional que no comprende una composición fermentada por bacterias de ácido láctico que comprende proteína, dicho método comprendiendo la administración de una composición nutricional que comprende de 5 a 20 % en peso de proteína basado en el peso en seco de la composición nutricional y que comprende al menos 10 % en peso de una composición fermentada por bacterias de ácido láctico que comprende la proteína, donde las bacterias de ácido láctico son inactivadas después de la fermentación, con base en el peso en seco de la composición nutricional.

20 2. Método según la reivindicación 1 donde la composición nutricional comprende de 0.10 a 1.5 % en peso de la suma de ácido láctico y lactato basado en el peso en seco.

20 3. Método según la reivindicación 2 donde la suma de ácido L-láctico y L-lactato es mayor que el 50 % en peso basado en la suma total de ácido láctico y lactato.

25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende la proteína, se fermenta por *Streptococcus thermophilus*, y/o *Bifidobacterium breve*.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la proteína comprende proteína seleccionada del grupo que consiste en proteína de suero de leche y caseína.

30 6. Método según la reivindicación 5 donde la proteína comprende proteína de suero de leche y caseína en una proporción en peso de 20:80 a 80:20.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la composición nutricional es un líquido.

35 8. Método según la reivindicación 7, donde la composición nutricional líquida tiene un pH de 5.5 a 6.0.

40 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la composición nutricional comprende proteína que proporciona 5 a 15 % calorías, carbohidrato digerible que proporciona 35 a 60 % calorías y lípido que proporciona 35 a 60 % de calorías con base en las calorías totales de la composición nutricional.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para suministrar alimentación a un bebé con una edad de 0 a 36 meses, preferiblemente 0 a 12 meses.

45 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la composición nutricional es seleccionada del grupo consistente en una fórmula para lactantes, una fórmula de continuación, una fórmula de niño pequeño y una leche para el crecimiento.

50 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la proteasa endógena es una serina proteasa, de forma más preferible una serina proteasa seleccionada del grupo consistente en tripsina, quimotripsina y elastasa.

13. Composición nutricional para bebés que comprende:

55 a. proteína

- i. en una cantidad de 5 a 20 % en peso basado en el peso en seco de la composición nutricional, y
- ii. en una cantidad de 6% a 7.4% de calorías con base en las calorías totales de la composición nutricional,

60 b. lípidos en una cantidad de 35 a 60 % de calorías con base en las calorías totales de la composición nutricional, y

c. carbohidratos en una cantidad de 40 a 60 % de calorías con base en las calorías totales de la composición nutricional,

65 donde la composición nutricional comprende al menos 10 % en peso de una composición fermentada por bacterias de ácido láctico que comprende proteína, donde las bacterias de ácido láctico son inactivadas después de la fermentación, con base en el peso en seco de la composición nutricional.

14. Composición nutricional según la reivindicación 13, donde la composición nutricional comprende de 0.10 a 1.5 % en peso de la suma de lactato y ácido láctico basado en el peso en seco y donde la suma de ácido L-láctico y L-lactato es mayor que 50 % en peso con base en la suma de ácido láctico y lactato total.
- 5 15. Composición nutricional según la reivindicación 13 o 14, donde la composición fermentada por bacterias del ácido láctico que comprende proteína se fermenta por *Streptococcus thermophilus*, y/o *Bifidobacterium breve*.
16. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que es un líquido con un pH de 5.5 a 6.0.
- 10 17. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, donde la composición nutricional es seleccionada del grupo consistente en una fórmula infantil, una fórmula de continuación, una fórmula para niño pequeño y una leche para el crecimiento, preferiblemente fórmula infantil.
- 15 18. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, donde la proteína comprende proteína de suero de leche y caseína en una proporción en peso de 20:80 a 80:20, de forma más preferible 35:65 a 55: 45.
19. Composición nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18 para el método de cualquiera reivindicación 1 a 12.