

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 236**

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 14155359 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2732710**

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:

**02.10.2015**

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:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 547 236 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

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se encuentra en el campo de las composiciones nutricionales entéricas. Más en particular, se refiere a una composición de caseína micelar acuosa que comprende 6 a 20 g de caseína micelar por 100 ml de composición, y que tiene un pH de aproximadamente 6 a 8, así como a una composición nutricional entérica que comprende una alta cantidad de caseína micelar, y a los problemas de controlar -independientemente- la viscosidad, transparencia y niveles de fosfato en tal composición.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Preferentemente, los productos lácteos medicinales están altamente concentrados en nutrientes, en particular en proteínas y minerales, para satisfacer la ingesta diaria de nutrientes en pacientes malnutridos. Estos pacientes pueden ser pacientes caquéticos o personas que padecen SIDA terminal, cáncer o tratamiento del cáncer, enfermedades pulmonares graves como COPD (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), tuberculosis, y otras enfermedades infecciosas o personas que han experimentado una cirugía grave o traumatismos como quemaduras.
- 15 Además, personas que padecen trastornos de garganta o la boca tales como cáncer esofágico o estomatitis y personas que tienen problemas con la deglución como las personas disfágicas, que necesitan una nutrición líquida especial, de bajo volumen. También para personas que tienen solo apetito reducido o pérdida del gusto, que se beneficiarán de un alimento de bajo volumen, preferentemente líquido. Estos pacientes pueden ser también personas ancianas y ancianos en riesgo de debilitarse. A este respecto, aunque las necesidades de energía de una
- 20 persona anciana pueden estar reducidas, su capacidad para consumir productos también puede estar disminuida. Por ejemplo, pueden tener dificultad para consumir un producto, por ejemplo, debido a dificultades para deglutir, o debido a que tengan que consumir una cantidad de producto demasiado grande para satisfacer la ingesta diaria de nutrientes. Por lo tanto, la conformidad no es óptima, y a menudo, la ingesta es subóptima, dando lugar a una nutrición subóptima, y al final, a malnutrición.
- 25 Los grupos de pacientes mencionados anteriormente pueden ser extremadamente sensibles a la consistencia del alimento y a las propiedades organolépticas del producto, tal como, por ejemplo, la viscosidad, la sensación en boca, el sabor, olor y color. También, los pacientes tales como los pacientes caquéticos, sufren típicamente de debilidad extrema que a menudo impide que se sitúen en una posición vertical y que puedan beber el alimento de un cartón o que incluso que lo puedan aspirar con una paja. Estos pacientes se benefician mucho de composiciones entéricas
- 30 líquidas de bajo volumen con un alto contenido en nutrientes, en particular proteínas.

Sin embargo, las altas cantidades de proteína y minerales aumentan la viscosidad total del producto durante el proceso y almacenamiento debido a los cambios en el equilibrio proteínico-mineral. Los productos líquidos de baja viscosidad, sin embargo, son más apreciados por los pacientes, lo que hace que formular tales productos sea un desafío.

- 35 Por lo tanto, el problema subyacente en la presente invención es proporcionar una composición entérica líquida para proporcionar nutrición, sea como suplemento, o como una nutrición completa, que comprenda un alto contenido de una proteína intacta, en particular caseína micelar, como fuente principal de proteína, en el menor volumen de líquido, y que dé soporte nutricional y bienestar en los diferentes grupos de pacientes mencionados anteriormente, en particular a una persona anciana o un paciente enfermo.
- 40 Las micelas de caseína en la leche concentrada interactúan más frecuentemente entre ellas que en la leche bovina debido a las distancias menores entre las micelas. La leche concentrada, por lo tanto, se comporta como un fluido de fluidificación por cizalla no Newtoniano, lo que significa que la viscosidad depende de la velocidad de cizalladura (Karlsson y col., 2005). La viscosidad de los sistemas coloidales, en general, depende de la viscosidad de la fase continua, forma, y tamaño de la distribución de las partículas, y de sus interacciones mutuas junto con las suposiciones sobre cómo la viscosidad sigue la fracción de volumen. La fracción de volumen ( $\Phi$ ) de las micelas de caseína es un número sin dimensiones, definido como la fracción del volumen total ocupado por las partículas. Se puede determinar midiendo la viscosidad ( $\eta$ ) de la solución. Eilers (1945) generó la fórmula (1) para estimar la viscosidad de los sistemas de lácteos concentrados.

$$\eta = \eta_0 \left( 1 + \frac{1,25\Phi}{1 - \Phi/\Phi_{\text{máx}}} \right)^2 \quad (1)$$

- 50  $\eta_0$  representa la viscosidad de la fase continua y es 1 mPa·s.  $\Phi_{\text{máx}}$  representa la fracción de volumen compactado máximo por la que la viscosidad tiende al infinito. Se utiliza normalmente un valor de 0,74 para  $\Phi_{\text{máx}}$  en una solución con esferas de tamaños similares (Eilers, 1945), pero con la leche concentrada, en la que las partículas tienen tamaños distintos, se debería usar un valor de  $\Phi_{\text{máx}}$  de 0,79. Esta fórmula se extiende a partir de la relación de Einstein, que describe la viscosidad de las dispersiones en sistemas muy diluidos, en que las partículas son
- 55 esféricas y no son deformables o no están afectadas por la presencia de las otras (Dewan y col., 1972; Eilers, 1945;

Karlsson y col., 2005).

La voluminosidad se define como el volumen total que ocupa un gramo de proteína y se ha relacionado con la fracción de volumen  $\Phi$  de las proteínas en la solución (Eilers, 1941). La voluminosidad de las micelas de caseína es un factor determinante de la viscosidad de la solución. La voluminosidad de las micelas de caseína aumenta cuando las micelas están más hidratadas (por ejemplo, debido a agotamiento del calcio), que produce la liberación de caseínas específicas de la micela y la expansión y tumefacción de las micelas. La magnitud de la liberación de caseínas específicas depende de la cantidad de restos de fosfoserina y por lo tanto de la sensibilidad específica por iones de calcio. Según se agota más el calcio de las micelas, más caseína se liberará de la micela de caseína. Como resultado, el orden de disociación es  $\beta$ -caseína >  $\alpha_{s1}$ -caseína >  $\alpha_{s2}$ -caseína (Holt, 1997). Aunque la  $\kappa$ -caseína tiene 0 o 1 restos de fosfoserina, probablemente permanecerá estancada en la micela de caseína debido a sus interacciones hidrófobas. Por ejemplo, la cantidad de  $\beta$ -caseína que abandona las micelas de caseína aumenta con el descenso de la temperatura y el contenido en calcio. El aumento de tamaño de las micelas de caseína se produce por expansión y tumefacción de las micelas de caseína, lo que es debido al aumento de repulsión electrostática y ósmosis de la fase continua en las micelas, respectivamente (Leviton y Pallansch, 1962). Además, los iones calcio libres en la fase continua reducen la repulsión electrostática en las micelas de caseína, que mantiene las micelas más compactas.

Las interacciones entre las micelas de caseína en la leche concentrada están fuertemente influenciadas, por ejemplo, por la fuerza iónica, el contenido y composición mineral, pH, y temperatura (Karlsson y col., 2005). Los fosfatos y citrato que son minerales que frecuentemente se añaden a la nutrición medicada, el queso procesado, o la leche UHT (concentrada), interactúan con las micelas de caseína uniéndose a los iones de calcio o uniéndose directamente a la micela de caseína (Kocak y Zadow, 1985; Mizuno y Lucey, 2005; Vujicic y col., 1968). En general, su capacidad de unión al calcio se puede clasificar en el siguiente orden: fosfato de cadena larga > tripolifosfato > priofosfato > citrato > ortofosfato (Zittle, 1966).

#### TÉCNICA PRECEDENTE

Aunque hay disponible una gran cantidad de bibliografía técnica anterior (que se cita en la solicitud cuando sea apropiado), solo unas pocas publicaciones tratan de composiciones nutricionales entéricas líquidas que comprendan altas cantidades de caseína micelar, en el intervalo de 6 a 20 g/100 ml de la composición.

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

El documento US 5.683.984 desvela una composición de alimentación por tubo entérico con un componente proteico de caseína micelar nativa. Los problemas de viscosidad se identifican y abordan en el documento WO 2099/072885, que desvela una composición líquida de nutrición entérica que contiene caseína micelar y caseinato, y opcionalmente una pequeña cantidad de suero.

Además, una gran cantidad de publicaciones tratan el efecto de turbidez de la adición de sales de fosfato sobre los productos lácteos tales como la leche desnatada, sin embargo, ninguno describe el efecto de estas sales en las composiciones nutricionales entéricas líquidas que comprenden altas cantidades de caseína micelar, en el intervalo de 6 a 20 g/100 ml.

Liang y col. (Nippon Nogei Kagaku Kaishi (1974), 48(1), 49-56 describen los efectos del glicerofosfato en la gelación de las micelas de caseína y en la turbidez de la leche desnatada (que contiene aproximadamente 3 g/100 ml de micelas de caseína).

El documento WO 01/72135 A1 (Australian Food Industry Science Center) y el documento US 6.455.082 B1 (Nestec) trata la adición de fosfatos a la leche con el fin de estabilizar la leche (que contiene aproximadamente 3 g/100 ml de micelas de caseína). Aunque desvelan un efecto sobre la viscosidad, no enseñan sobre su efecto en la transparencia, y ciertamente no sobre un sistema alto en proteínas, que es mucho más crítico que un sistema bajo en proteínas tal como la leche con respecto al comportamiento en viscosidad y transparencia.

#### **Descripción detallada de la invención**

Por lo tanto, la invención se refiere a una composición nutricional líquida que comprende de 9 a 20 g de proteína por 100 ml de la composición y que tiene un pH de aproximadamente 6 a 8, comprendiendo dicha composición uno o más agentes quelantes que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, un ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o una mezcla de los mismos, y en que la composición tiene una viscosidad de menos de 200 mPa.s cuando se mide en un reómetro rotacional utilizando una geometría de cilindros concéntricos a 20 °C a una velocidad de cizalladura de 50 s<sup>-1</sup> y en que la composición comprende una cantidad de 1 a 120 mEq.l<sup>-1</sup> de dicho uno o más agentes quelantes.

- La invención también se refiere al uso de uno o más agentes quelantes seleccionados de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, un ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o una mezcla de los mismos para controlar independientemente la viscosidad y la transparencia de una composición nutricional líquida que comprende de 9 a 20 g de proteína por 100 ml de la composición y que tiene un pH de aproximadamente 6 a 8, dicha composición comprende al menos 6 g/100 ml de caseína micelar y uno o más agentes quelantes que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, un ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o una mezcla de los mismos.
- Los inventores han encontrado ahora que utilizando uno o más agentes quelantes que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, un ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o una mezcla de los mismos, la viscosidad y la transparencia de una composición de caseína micelar, que comprende de 6 a 20 g/100 ml de caseína micelar y que tiene un pH de aproximadamente 6 a 8, se podrían controlar independientemente una de otra. El uso de un agente quelante para controlar independientemente la viscosidad y la transparencia de una composición micelar acuosa no se conoce en la técnica.
- En una realización, la composición comprende, uno o más agentes quelantes que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, un ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o una mezcla de los mismos, siempre que se excluya el ácido cítrico, una sal citrato soluble o una mezcla de los mismos como agente quelante único.
- En una realización, la composición comprende uno o más agentes quelantes que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, una sal fosfato soluble, o una mezcla de los mismos.
- En una realización, la composición de caseína micelar acuosa no contiene o sustancialmente no contiene ninguna grasa, carbohidratos digeribles y no digeribles. Con "sustancialmente no contiene" se pretende que las contribuciones de estos componentes es preferentemente menor del 5% en peso, en base al total de sustancia seca de la composición.
- Preferentemente, el uso se efectúa añadiendo agentes quelantes a la composición de caseína micelar acuosa.
- Con la palabra "independientemente" se quiere decir que la viscosidad y transparencia se pueden fijar en cualquier valor independiente uno del otro, seleccionando el agente quelante apropiado con una concentración apropiada o cualquier combinación de un agente quelante apropiado con su concentración apropiada. De esta manera, es posible obtener composiciones tanto transparentes como muy viscosas, incluso también composiciones muy lechosas y muy líquidas. Este último grupo de propiedades es muy interesante e importante para el desarrollo de composiciones nutricionales, en particular de nutrición medicada basada en lácteos, que comprende altas cantidades de caseína micelar, que comprende en particular de 6 a 20 g/100 ml de caseína micelar.
- Con "soluble" se pretende referirse a una sal que es soluble en agua a un pH de 6-8.
- Preferentemente, la composición de caseína micelar acuosa de acuerdo con 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, preferentemente de 11 a 18 g/100 ml, más preferentemente de 12 a 18 g/100 ml, y más preferentemente de 14 a 18 g/100 ml.
- El pH de la composición de caseína micelar acuosa debería estar entre 6 y 8. El pH se determina en la composición de caseína micelar acuosa y se puede hacer por procedimientos de rutina, conocidos en la técnica, tal como utilizando un dispositivo medidor de pH disponible comercialmente.
- Además, con la elección apropiada de agente quelante de acuerdo con la invención, es posible, independientemente de la viscosidad y transparencia, añadir cantidades de fósforo (como un ácido fosfórico o un fosfato) a una composición de caseína micelar acuosa, que comprende de 6 a 20 g/100 ml de caseína micelar y que tiene un pH de aproximadamente 6 a 8.
- Dentro del significado de la presente invención, la palabra "transparencia" es lo contrario de la palabra "turbidez". Turbidez es el nombre del parámetro que se mide en los experimentos. El presente experto está familiarizado con el concepto de turbidez (por ejemplo, a 700 nm) utilizando espectrofotometría concerniente a las caseínas (Philippe y col., 2003).
- La caseína micelar, a veces denominada también caseína micelar "nativa", se refiere a la caseína en forma de micelas, que es la forma nativa de la caseína en la leche. Es una proteína de leche de alta calidad que se encuentra naturalmente en la leche con una concentración de aproximadamente 2,6 g/100 ml (Dairy Science and Technology, Walstra y col., CRC Press, 2006). Se concentra por un proceso que no desnaturaliza o sustancialmente no desnaturaliza las proteínas caseínas y se comercializa como Aislado de Caseína Micelar (MCI). La leche desnatada original se somete a un proceso de microfiltración, que en su mayoría es el mismo proceso utilizado para concentrar la proteína del suero, para producir una proteína de leche sustancialmente no desnaturalizada pura con su estructura nativa. El material resultante contiene entre un 90% y 95%, preferentemente más del 95% por peso de caseína micelar en sustancia seca, el resto es principalmente proteína de suero y otros nitrógenos no proteicos 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 Daltons y una relación por peso de calcio: fósforo de 1,4 a 2,4, siendo el contenido en calcio muy alto, del orden de aproximadamente 25 g/kg de proteína. Tiene una viscosidad intrínseca baja y por lo tanto una composición líquida que comprende dicha MCI es fácil de beber. La cantidad de iones metálicos monovalentes, en particular Na y K, es muy baja, típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 a 2 g/kg de proteína.

Por el contrario, la caseína, como se utiliza en el contexto de la presente invención, se refiere a la forma en cuajada de la caseína, que ha perdido su estructura micelar nativa. Está unida a un metal tal como sodio, potasio, calcio y magnesio, y se llama comúnmente caseinato.

En el contexto de la presente invención, se entiende que la caseína micelar también se puede proporcionar por otras fuentes de proteína de leche, tales como, por ejemplo, fuentes que conservan esencialmente la relación natural 80:20 de caseína respecto a suero, tal como el Concentrado de Proteína de Leche (MPC), que es un producto en polvo habitualmente preparado por ultracentrifugación con un contenido proteico medio de aproximadamente el 80% en peso, Aislado de Proteína de Leche (MPI), un producto en polvo que se prepara habitualmente por precipitación con un contenido proteico medio de más del 85% en peso, y leche desnatada concentrada. La caseína micelar también se puede proporcionar en forma líquida por medio de ultrafiltrado o microfiltrado.

De acuerdo con una realización, el ácido fosfórico se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido monofosfórico de uridina, ácido monofosfórico de citidina, ácido ortofosfórico, ácido hexafosfórico de inositol, ácido hexametafosfórico, o una mezcla de los mismos, y la sal fosfato se selecciona de entre el grupo que consiste en monofosfato de uridina, monofosfato de citidina, ortofosfato, hexafosfato de inositol, hexametafosfato, o una mezcla de los mismos.

De acuerdo con otra realización, la sal soluble es una sal monovalente, preferentemente una sal de sodio, una sal de potasio, o una mezcla de las mismas. Estas sales se prefieren para el desarrollo de composiciones nutricionales ya que introducen metales como contra iones (por ejemplo, sodio o potasio) que son esenciales en una dieta normal.

De acuerdo con otra realización más, el contra ion (por ejemplo, sodio o potasio) están presentes en una cantidad menor o igual a una cantidad equimolar, respecto al ácido. Por ejemplo, una molécula de fosfato de inositol puede por lo tanto contener moléculas con un número diferente de contra iones, tal que el equivalente total de contra iones en el producto es menor o igual que el equivalente total de hexafosfato de inositol.

De acuerdo con otra realización más. La sal fosfato se selecciona de entre el grupo que consiste en monofosfato disódico de uridina (**Na<sub>2</sub>UMP**, un ortofosfato orgánico), monofosfato disódico de citidina (**Na<sub>2</sub>CMP**, un ortofosfato orgánico), ortofosfato disódico (**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**, un ortofosfato inorgánico), fitato sódico, también llamado hexafosfato dodecasódico de inositol (**SP**, polifosfato inorgánico), y hexametafosfato (hexa)sódico (**SHMP**, un polifosfato inorgánico). Preferentemente, la sal citrato es citrato trisódico (**TSC**). Se entiende que -en la práctica- un producto no siempre contiene una cantidad equimolar de contra iones metálicos, con respecto al ácido, aunque el producto se designe como tal. Tales productos también están comprendidos en la definición de las sales fosfato y citrato de acuerdo con la invención.

Preferentemente, el uno o más agentes quelantes se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, una sal fosfato soluble, o una mezcla de los mismos.

Más preferentemente, la sal fosfato es monofosfato disódico de uridina, o monofosfato disódico de citidina, preferentemente monofosfato disódico de uridina. Utilizando esta sal, se obtiene una composición de caseína micelar líquida con una transparencia y una viscosidad que no están sustancialmente afectadas, proporcionando además el fósforo y contra iones necesarios para una composición nutricional.

La capacidad de unión al calcio de las sales de acuerdo con la invención se basa en su número de cargas. Su orden en capacidad de unión al calcio disminuye desde el SP > SHMP > TSC = Na<sub>2</sub>HPO > Na<sub>2</sub>UMP = Na<sub>2</sub>CMP. Además, varios de estos fosfatos tienen la capacidad de interactuar con las micelas de caseína. El calcio libre y los iones fosfato, complejos de fosfato cálcico, y los iones de calcio y fosfato incorporados en las micelas de caseína están en equilibrio entre ellos en los sistemas lácteos (Figura 1). La adición de agentes quelantes de acuerdo con la invención cambiará este equilibrio, ya que quelan los iones calcio. Como resultado, esto afectará a la voluminosidad de las micelas de caseína, debido a que las micelas tienen más agotamiento de calcio, las micelas se pueden disociar y las caseínas específicas se liberan de la micela de caseína.

La voluminosidad puede disminuir también con la adición, por ejemplo, de iones de calcio, debido a que se incorporarán a las micelas de caseína (Walstra y col., 2006). Estos cambios de voluminosidad afectan tanto a la viscosidad como a la estabilidad con calor en sistemas de leche en 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 produce la unión de iones fosfato con iones calcio y se formarán microcristales. Se producirá reorganización de la estructura micelar y el cambio en la voluminosidad, debido a complejos tales como Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, que se integrarán en las micelas de caseína (Guo y col., 2003). El Na<sub>2</sub>UMP tiene una capacidad de unión con el calcio débil (de Kort y col., 2009) y solo afecta ligeramente a la voluminosidad de las micelas de caseína. El Na<sub>2</sub>CMP tiene un

comportamiento similar. No hay ninguna información disponible sobre la interacción de  $\text{Na}_2\text{UMP}$  y  $\text{Na}_2\text{CMP}$  con las micelas de caseína. Los polifosfatos tales como el SHMP y SP, están cargados aniónicamente altamente, lo que les brinda la posibilidad de unirse a los aminoácidos cargados positivamente de los restos de caseína o CCP (Mizuno y Lucey, 2007; Vujicic y col., 1968; Zittle, 1966). La interacción de los polifosfatos con las micelas de caseína a pH neutro en la leche (concentrada) crea cargas negativas netas extra en las micelas lo que produce la expansión de las micelas de caseína (Leviton y Pallansch, 1962). El SHMP aumenta la viscosidad e incluso produce gelación en los sistemas de caseína debido a que el SHMP tiene la capacidad de formar enlaces cruzados con las micelas de caseína por medio de la interacción con los CCP o grupos amida (Kocak y Zadow, 1985; Mizuno y Lucey, 2007; Vujicic y col., 1968). El citrato no se une ni forma enlaces cruzados con las caseínas (Mizuno y Lucey, 2005), pero quela los iones de calcio que están unidos a las micelas de caseína. El citrato y los complejos de citrato cálcico que se forman permanecen como complejos estables solubles en la fase de suero (Mizuno y Lucey, 2007; Morr, 1967; Vujicic y col., 1968) o forman cristales de citrato cálcico insolubles durante el almacenamiento. La adición de citrato da como resultado un aumento de la hidratación de micelas de caseína, tumefacción de las micelas que se mide como un aumento de la viscosidad y transparencia de las soluciones (Morr, 1967). La transparencia se puede determinar midiendo la turbidez de la solución con un espectrofotómetro. Esta es una herramienta importante para relacionar cambios en las distribuciones de iones, proteínas y agua con las propiedades fisicoquímicas de las soluciones y más específicamente, de las micelas de caseína (Philippe y col., 2003). La densidad y el índice de refracción, por ejemplo, cambiarán con la disminución, disociación o tumefacción de las micelas de caseína.

Se ha estudiado el efecto de los orto y polifosfatos y citrato sobre las propiedades físicas de leche desnatada normal o concentrada (Mizuno y Lucey, 2007; Morr, 1967; Vujicic y col., 1968), pero estos sistemas contienen proteína de suero y concentraciones relativamente bajas de proteína (máximo -6,5% por peso de caseinato). Además, la investigación se centraba en la preparación de geles de leche con fosfatos (Mizuno y Lucey, 2007) o en la aceleración o retraso de la gelación por envejecimiento tras la adición de fosfatos o citrato (Harwalkar, 1982; Kocak y Zadow, 1985; Leviton y Pallansch, 1962). También, se utilizaron concentraciones relativamente bajas de fosfato o citrato en estos estudios.

La cantidad de agente quelante se debería elegir de acuerdo con la invención, pero se ha demostrado que la adición de 1 a 120  $\text{mEq.l}^{-1}$  de dicho agente quelante, preferentemente de 5 a 100  $\text{mEq.l}^{-1}$ , más de 10 a 80  $\text{mEq.l}^{-1}$ , más preferentemente 20 a 60  $\text{mEq.l}^{-1}$  de dicho agente quelante es suficiente para obtener los efectos reivindicados.

Utilizando un agente quelante de acuerdo con la invención, se pueden producir tres tipos de composiciones (Figura 3 en combinación con la Figura 8). Se descubrió que una composición se vuelve más viscosa tras 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) da lugar a composiciones altamente viscosas y transparentes e incluso a la formación de gel. Por el contrario, se pueden añadir altas concentraciones de monofosfato de uridina (tal como  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ) sin afectar significativamente la viscosidad y sin apenas cambiar la transparencia de la composición.

Utilizando dos o más agentes quelantes de acuerdo con la invención, se puede producir cualquier tipo de composición, que tenga cualquier viscosidad, transparencia y contenido en fósforo que se desee.

### Composición nutricional

La invención se refiere a una composición nutricional que comprende de 9 a 20 g de proteína por 100 ml de la composición y que tiene un pH de aproximadamente 6 a 8, en la que preferentemente toda o la mayor parte de dicha proteína comprende caseína micelar, que comprende uno o más agentes quelantes que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, un ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o una mezcla de los mismos, así como varias realizaciones preferidas de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. La cantidad de agente quelante se podría escoger de acuerdo con la invención; la composición comprende de 1 a 120  $\text{mEq.l}^{-1}$  de dicho agente quelante, preferentemente de 5 a 100  $\text{mEq.l}^{-1}$ , más de 10 a 80  $\text{mEq.l}^{-1}$ , más preferentemente de 20 a 60  $\text{mEq.l}^{-1}$  de dichos agentes quelantes.

En una realización preferida, la composición comprende uno o más agentes quelantes que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, un ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o una mezcla de los mismos, siempre que el ácido cítrico, una sal citrato soluble o una mezcla de los mismos esté excluido como agente quelante único.

En una realización preferida, la composición nutricional comprende uno o más agentes quelantes que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, una sal fosfato soluble, o una mezcla de los mismos.

Preferentemente, la composición nutricional de acuerdo con la invención comprende al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 g y como mucho 20 g de proteína por 100 ml de composición, preferentemente de 11 a 18 g/100 ml, más preferentemente de 12 a 18 g/100 ml, y más preferentemente de 14 a 18 g/100 ml, en que toda o la mayoría de dicha proteína comprende caseína micelar.

En el contexto de la presente solicitud, la expresión "toda o la mayor parte" en relación con la caseína micelar

debería interpretarse como una cantidad de caseína micelar que varía del 70 al 100% de la proteína total.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, la composición nutricional de la invención comprende opcionalmente como mucho un 30% por peso de caseinato, en base al peso total de la proteína.

5 De acuerdo con otra realización de la presente invención, la proteína proporciona del 10% al 100%, más preferentemente del 30% al 60% del contenido energético total de la composición. Los altos niveles de proteína son beneficiosos para los pacientes que no son capaces físicamente de recibir un gran volumen, por ejemplo, pacientes con restricción de fluidos. A tales pacientes se les puede dar un nivel bajo de fluidos a la vez que reciben una cantidad necesaria de soporte nutricional por día. La composición se puede utilizar como una nutrición completa, como adición o como sustitución de un consumo normal de comida. La composición se puede utilizar también como un suplemento, además de la consumición normal de comida, cuando la ingesta de grasas y carbohidratos es un problema menor.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, la composición nutricional tiene una densidad energética de al menos 0,36 kcal/ml, más preferentemente de al menos 1,0 kcal/ml, particularmente de al menos 1,5 kcal/ml de composición, más en particular de al menos 2,0 kcal/ml.

15 Aunque la composición tiene una alta densidad energética, eligiendo los agentes quelantes apropiados de acuerdo con la invención, puede tener también una viscosidad suficientemente baja para permitir que se consuma por personas que tienen dificultad en deglutir productos o las que se alimentan por tubo. Por lo tanto, en una realización, la composición nutricional es un líquido, que tiene una viscosidad preferentemente menor de 200 mPa.s, preferentemente menor de 80 mPa.s, preferentemente menor de 70 mPa.s, más preferentemente menor de 50 mPa.s, más preferentemente menor de 40 mPa.s, más preferentemente igual a aproximadamente 20 mPa.s.

En una realización de la presente invención, la cantidad de caseína micelar en la composición nutricional de acuerdo con la invención es al menos de un 70% por peso, preferentemente al menos de un 80% por peso, más preferentemente al menos de un 90% por peso, más preferentemente al menos de un 95% por peso y como mucho un 100% por peso de la proteína presente en la composición nutricional.

25 Como se ha mencionado anteriormente, la composición nutricional de la presente invención no debería contener grandes cantidades de proteínas distintas de la caseína micelar y, de acuerdo con una realización, opcionalmente como mucho un 30% por peso de caseinato. En una realización más de la presente invención, la composición nutricional puede comprender hasta aproximadamente un 15% por peso de suero, preferentemente menos de o igual a un 10% por peso de suero, más preferentemente de un 1 a un 10% por peso de la proteína total presente en la composición nutricional; en una realización, la composición comprende menos de o igual a un 5% por peso de suero de la proteína total presente en la composición nutricional.

En una realización de la presente invención, la relación de peso de la caseína micelar respecto al caseinato varía desde aproximadamente 100:0 a aproximadamente 70:30. Preferentemente, la relación de peso de la caseína micelar respecto al caseinato varía desde aproximadamente 80:20 a aproximadamente 100:0.

35 La composición nutricional de acuerdo con la invención está diseñada o para suplementar la dieta de una persona o para proporcionar soporte nutricional completo. Por lo tanto, la composición de acuerdo con la invención puede además comprender al menos grasa y/o carbohidratos y/o una fuente de vitaminas, minerales, elementos traza y/o una fuente de carbohidratos no digeribles. Preferentemente, la composición de acuerdo con la invención es una composición nutricional completa.

40 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para proporcionar nutrición a una persona que necesita la misma, que comprende las etapas de administración de la composición nutricional a dicha persona como se describe en el presente documento. La persona es preferentemente una persona anciana, una persona que está en un estado de enfermedad, una persona que se recupera de un estado de enfermedad, una persona que está malnutrida, o una persona sana tal como un deportista o una deportista o un anciano activo. A este respecto, se propone que en el contexto de esta solicitud, una persona anciana es una persona con una edad de 50 años o más, en particular de 55 años o más, más en particular con una edad de 65 años o más.

### Grasas

En una realización la presente composición nutricional entérica además comprende grasas. La cantidad de grasa puede variar entre un 5 y un 95%, preferentemente entre un 10 y un 70%, más preferentemente entre un 20 y un 40%, con respecto al contenido energético total de la composición.

55 Con respecto al tipo de grasa, es posible una amplia elección, siempre que la grasa tenga calidad alimentaria. La grasa puede ser o una grasa animal o una grasa vegetal o ambas. Aunque las grasas animales tales como el tocino o la mantequilla tienen esencialmente valores nutricionales y calóricos iguales y se pueden utilizar de manera intercambiable, se prefieren más los aceites vegetales en la práctica de la presente invención debido a su disponibilidad fácil, facilidad de formular, ausencia de colesterol y baja concentración de ácidos grasos saturados. En una realización, la presente composición comprende aceite de colza, aceite de maíz o aceite de girasol.

La grasa puede incluir una fuente de ácidos grasos de cadena media, tal como los triglicéridos de cadena media (MCT, principalmente de 8 a 10 átomos de carbono de longitud), una fuente de ácidos grasos de cadena larga (LCT) y ácidos grasos unidos a fosfolípidos tales como EPA o DHA, o cualquier combinación de los dos tipos de fuentes. Los MCT son beneficiosos porque se absorben y metabolizan fácilmente en un paciente metabólicamente estresado.

5 Además, el uso de MCT reducirá el riesgo de malabsorción de nutrientes. Las fuentes de LCT, tales como aceite canola, aceite de soja, 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 beneficiosas porque se sabe que los LCT pueden modular la respuesta inmunitaria en el cuerpo humano.

10 En una realización específica, la grasa comprende un 30 a 60% por peso de grasa animal, de algas o fúngica, un 40 a 70% por peso de grasa vegetal y opcionalmente del 0 a un 20% por peso de MCT basado en la grasa total de la composición. La grasa animal preferentemente comprende una baja cantidad de grasa láctea, es decir, menor del 6% por peso, especialmente menor de un 3% por peso basándose en la grasa total. En particular, se utiliza una mezcla de aceite de maíz, aceite de huevo, y/o aceite canola y cantidades específicas de aceite marino. Los aceites de huevo, aceites de pescado y aceites de algas son una fuente preferida de grasas no vegetales. Especialmente para las composiciones que se van a consumir por vía oral, con el fin de evitar la formación de malos sabores y para disminuir el sabor de pescado pasado se recomienda seleccionar ingredientes que sean bajos en ácido docosahexanoico (DHA), es decir, menos del 6% por peso, preferentemente menos del 4% por peso basándose en la grasa total. Los aceites marinos que contienen DHA están presentes preferentemente en la composición de acuerdo con la invención en una cantidad menor del 25% por peso, preferentemente menos del 15% por peso basándose en la grasa total. Por otra parte, la inclusión de ácido eicosapentanoico (EPA) es altamente deseable para obtener el máximo efecto saludable. Por lo tanto, en otra realización, la cantidad de EPA puede variar entre un 4% por peso y un 15% por peso, más preferentemente entre un 8% por peso y un 13% por peso basándose en la grasa total. La relación de peso EPA:DHA es ventajosamente al menos de 6:4, por ejemplo, entre 2:1 y 10:1. En otra realización más, la cantidad de EPA es muy baja, tal como 0,1 a 1% por peso, preferentemente un 0,3% por peso o un 0,6% por peso, basándose en la grasa total.

También, la composición nutricional de acuerdo con la invención puede comprender beneficiosamente un emulsionante. Se pueden utilizar emulsionantes que se conocen comúnmente y generalmente el emulsionante contribuye al contenido energético de la grasa en dicha composición.

### **Carbohidratos digeribles**

30 En una realización de la presente invención, la composición nutricional de acuerdo con la invención comprende además un carbohidrato digerible. Preferentemente, el carbohidrato digerible proporciona entre el 30 al 60% del contenido energético total de la composición de acuerdo con la invención. El carbohidrato digerible puede comprender carbohidratos simples o complejos, o cualquier mezcla de los mismos. Son adecuados para su uso en la presente invención la glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, palatinosa, jarabe de maíz, malta, maltosa, isomaltosa, almidón de maíz parcialmente hidrolizado, maltodextrinas, oligo y polisacáridos de glucosa.

35 La composición del carbohidrato digerible preferentemente es tal que se eviten altas viscosidades, excesivo dulzor, caramelización excesiva (reacciones de Maillard) y osmolaridades excesivas. Las viscosidades y osmolaridades aceptables se pueden conseguir ajustando el promedio de longitud de cadena (media del grado de polimerización, DP) de los carbohidratos digeribles entre 1,5 y 6, preferentemente entre 1,8 y 4. Con el fin de evitar un dulzor excesivo, el nivel total de sacarosa y fructosa es preferentemente menor del 60%, más preferentemente menor del 52%, más preferentemente menor del 40% del peso del carbohidrato, especialmente del carbohidrato digerible. Los carbohidratos digeribles de cadena larga tales como el almidón, fracciones de almidón e hidrolizados de almidón medio (DE > 1, DE < 20), también pueden estar presentes, preferentemente en una cantidad de menos del 25% por peso, especialmente menos del 15% por peso del carbohidrato digerible, y menos de 6 g/100 ml, preferentemente menos de 4 g/100 ml del total de la composición de acuerdo con la invención.

En una realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrina con un alto DE (equivalente de dextrina). En una realización, el carbohidrato digerible incluye maltodextrina con un DE > 10, preferentemente un DE > 20, más preferentemente > 30 o incluso > 40, tal como un DE de 47. En una realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrina con un DE > 10 y sacarosa.

50 Sorprendentemente, el uso de maltodextrina da lugar a productos con poca o ninguna reacción de Maillard cuando se calientan. Sin quedar ligado a explicación alguna, este efecto puede atribuirse 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 realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrina con alto DE en una cantidad de al menos un 35% por peso, preferentemente al menos un 50% por peso, preferentemente al menos un 65% por peso, preferentemente al menos un 90% por peso del peso total del carbohidrato digerible. En una realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrina con un DE bajo de 2 a 20. En una realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrina con un DE bajo de 2 a 10, preferentemente con un DE bajo de aproximadamente 2. En una realización de la presente invención, el carbohidrato digerible incluye maltodextrina con un DE bajo en una cantidad de menos del 35% por peso, preferentemente menos del 20% por peso, preferentemente menos del 10% por peso del carbohidrato digerible. La

maltodextrina con un DE bajo también se puede denominar maltodextrina. En otra realización de la presente invención. El carbohidrato digestible incluye maltodextrina con un DE alto, preferentemente un DE de > 20, preferentemente > 30 o incluso > 40, más preferentemente un DE de 47 en combinación con maltodextrina con un DE bajo, preferentemente un DE bajo de 2 a 20, más preferentemente un DE bajo de 2 a 10, más preferentemente con un DE bajo de aproximadamente 2. Como se sabe, la maltodextrina con un DE bajo, tal como de aproximadamente 2, da lugar a una alta viscosidad. La maltodextrina con un DE alto, tal como de aproximadamente 47 da lugar a una baja viscosidad, pero es muy dulce. La combinación de ambas maltodextrinas optimiza el equilibrio entre dulzor y viscosidad. En una realización de la presente invención el carbohidrato digestible incluye al menos un 65% por peso, preferentemente al menos un 90% por peso, en base al peso total de carbohidrato digestible de maltodextrina con un DE > 40, preferentemente con un DE de aproximadamente 47 y 0 a 10% por peso de maltodextrina con un DE de 2 a 10, preferentemente con un DE de aproximadamente 2.

En otra realización de la presente invención, el carbohidrato digestible incluye trehalosa. Uno de los objetivos principales de la invención es proporcionar una composición nutricional con una viscosidad baja. La sacarosa se adecúa muy bien para tal fin, pero da lugar a composiciones demasiado dulces, que en general no gustan al consumidor. La maltodextrina con un DE bajo, tal como de aproximadamente 2, no tiene este último inconveniente, pero da lugar a alta viscosidad. La maltodextrina con un DE alto, tal como de aproximadamente 47 da lugar a una baja viscosidad, pero de nuevo es muy dulce y además da lugar a la aparición de reacciones de Maillard no deseadas. La trehalosa es una elección de carbohidrato preferida, ya que da lugar a baja viscosidad, no da reacciones de Maillard no deseadas y tiene un dulzor aproximadamente la mitad que la sacarosa. En una realización de la presente invención, el carbohidrato digestible incluye trehalosa en una cantidad del 20% al 60% del peso del carbohidrato, en una cantidad del 20% al 45%, más preferentemente en una cantidad del 25% al 45% del peso del carbohidrato digestible.

#### **Vitaminas, minerales y elementos traza**

La composición de acuerdo con la invención puede contener una variedad de vitaminas, minerales y elementos traza.

En una realización de la presente invención, la composición de acuerdo con la invención proporciona todas las vitaminas necesarias, la mayoría de los minerales y elementos traza. Por ejemplo, la composición de acuerdo con la invención preferentemente proporciona 6 mg de zinc por 100 ml de la composición que es beneficioso para la reparación tisular en un paciente herido. Preferentemente, la composición de acuerdo con la invención (también) proporciona 25 mg de vitamina C por 100 ml de la composición para ayudar a pacientes con necesidades de curación más importantes. Además, preferentemente, la composición de acuerdo con la invención (también) proporciona 2,25 mg de hierro por 100 ml de la composición. El hierro es beneficioso para mantener los fluidos corporales así como las funciones del sistema circulatorio en un paciente anciano.

La invención implica que una composición de acuerdo con la presente invención puede contener niveles de sodio y/o potasio fuera de los niveles de la legislación de FSMP (Alimentos para Fines Médicos Especiales).

#### **Carbohidratos no digeribles**

La composición nutricional entérica de acuerdo con la invención puede fortificarse opcionalmente con carbohidratos no digeribles (fibra alimentaria) tal como fructo-oligosacáridos o inulina. En una realización de la presente invención comprende 0,5 g/100 ml a 6 g/100 ml de carbohidratos no digeribles. La fibra alimentaria incluye oligosacáridos no digeribles que tienen un DP de 2 a 20, preferentemente de 2 a 10. Más preferentemente, estos oligosacáridos no contienen cantidades sustanciales (menos de un 5% por peso) de sacáridos fuera de estos intervalos, y son solubles. Estos oligosacáridos pueden comprender fructo-oligosacáridos (FOS), trans-galacto-oligosacáridos (TOS), xilo-oligosacáridos (XOS), oligosacáridos de soja, polisacáridos de acacia (fibra de acacia o goma arábiga), celulosa, almidón resistente, y similares que se pueden incorporar en la composición de acuerdo con la presente invención. La cantidad de fibra insoluble tal como celulosa es preferentemente más baja del 20% por peso de la fracción de fibra alimentaria de la composición de acuerdo con la presente invención, y/o por debajo de 0,6 g/100 ml. La cantidad de polisacáridos espesantes tales como carragenanos, xantanos, pectinas, galactomananos y otros polisacáridos indigeribles de alto peso molecular (DP > 50) preferentemente es baja, es decir, menor del 20% del peso de la fracción de fibra, o menor de 1 g/100 ml. Por el contrario, los polisacáridos hidrolizados tales como pectinas y galactomananos hidrolizados se pueden incluir ventajosamente.

Un componente de fibra preferido es un oligosacárido indigerible con una cadena larga (DP) de 2 a 10, por ejemplo Fibersol® (oligoglucosa resistente), en particular Fibersol® hidrogenado, o una mezcla de oligosacáridos que tengan una DP de 2 a 10, tal como fructo-oligosacáridos o galacto-oligosacáridos, que puede contener también una pequeña cantidad de sacáridos mayores (por ejemplo con una DP de 11 a 20). Tales oligosacáridos preferentemente comprende un 50% por peso a 90% por peso de la fracción de fibra, o 0,5 g/100 ml a 3 g/100 ml de la composición de acuerdo con la invención. Otros componentes de fibra adecuados incluyen sacáridos que tienen solo una digestibilidad parcial.

En una realización particular, la composición de acuerdo con la invención comprende uno o más oligosacáridos,

inulina, polisacáridos de goma arábica, polisacáridos de soja, celulosa y almidón resistente.

En otra realización de la presente invención, la composición de acuerdo con la invención puede comprender una mezcla de oligosacáridos neutros y ácidos como se desvela en el documento WO 2005/039597 (N.V. Nutricia), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Más particular, el oligosacárido ácido tiene un grado de polimerización (DP) entre 1 y 5000, preferentemente entre 1 y 1000, más preferentemente entre 2 y 250, incluso más preferentemente entre 2 y 50, más preferentemente entre 2 y 10. Si se utiliza una mezcla de oligosacáridos ácidos con diferentes grados de polimerización, el promedio DP de la mezcla de oligosacáridos ácidos es preferentemente entre 2 y 1000, más preferentemente entre 3 y 250, incluso más preferentemente entre 3 y 50. El oligosacárido ácido puede ser un carbohidrato homogéneo o heterogéneo. Los oligosacáridos ácidos se pueden preparar a partir de pectina, pectato, alginato, condroitina, ácidos hialurónicos, heparina, heparano, carbohidratos bacterianos, sialoglicanos, fucoidano, fuco-oligosacáridos o carragenano, y se preparan preferentemente a partir de pectina o alginato. Los oligosacáridos ácidos se pueden preparar por los procedimientos que se describen en el documento WO 01/60378, que se incorpora en el presente documento por referencia. El oligosacárido ácido se prepara preferentemente a partir de pectina altamente metoxilada que se caracteriza por un grado de metoxilación por encima del 50%. Como se utiliza en el presente documento, "grado de metoxilación" (también denominado DE o "grado de esterificación") se pretende que signifique la extensión a la que los grupos carboxílicos libres contenidos en la cadena del ácido poligalacturónico han sido esterificados (por ejemplo, por metilación). Los oligosacáridos ácidos se caracterizan preferentemente por un grado de metoxilación por encima del 20%, preferentemente por encima del 50%, incluso más preferentemente por encima del 70%. Preferentemente los oligosacáridos ácidos tienen un grado de metilación por encima del 20%, preferentemente por encima del 50%, incluso más preferentemente por encima del 70%. El oligosacárido ácido se administra preferentemente en una cantidad de entre 10 mg y 100 g por día, preferentemente entre 100 mg y 50 gramos por día, incluso más entre 0,5 y 20 gramos por día.

La expresión oligosacáridos neutros como se utiliza en la presente invención se refiere a sacáridos que tienen un grado de polimerización de unidades monosa que tienen un grado de polimerización de unidades monosa que exceden de 2, más preferentemente que exceden de 3, incluso más preferentemente que exceden de 4, más preferentemente que exceden de 10, que no se digieren o solo parcialmente, en el intestino por acción de los 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 preferentemente carecen de grupos ácidos. El oligosacárido neutro es diferente estructuralmente (químicamente) del oligosacárido ácido. La expresión oligosacáridos neutros como se utiliza en la presente invención se refiere preferentemente a sacáridos que tienen un grado de polimerización del oligosacárido por debajo de 60 unidades de monosa, preferentemente por debajo de 40, incluso más preferentemente por debajo de 20, más preferentemente por debajo de 10. La expresión unidades de monosa se refiere a unidades que tienen una estructura de anillo cerrado, preferentemente hexosa, por ejemplo, formas piranosa o furanosa. El oligosacárido neutro comprende preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos un 95% de unidades monosa que se seleccionan de entre el grupo que consiste en manosa, arabinosa, fructosa, fucosa, ramnosa, galactosa,  $\alpha$ -D-galactopiranosil, ribosa, glucosa, xilosa y derivados de las mismas, que se calcula sobre el número total de unidades de monosa que contienen. Los oligosacáridos neutros adecuados se fermentan preferentemente por la flora intestinal. Preferentemente el oligosacárido se selecciona de entre el 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 unidas en  $\alpha$ -1-4; hexámero- $\alpha$ -ciclodextrina, heptámero- $\beta$ -ciclodextrina y octámero- $\gamma$ -ciclodextrina), dextrina indigestible, gentío-oligosacáridos (mezcla de restos de glucosa con uniones  $\beta$ -1-6, algunas uniones 1-4), gluco-oligosacáridos (mezcla de  $\alpha$ -D-glucosa), isomalto-oligosacáridos (restos lineales de glucosa con uniones  $\alpha$ -1-6 con algunas uniones 1-4), isomaltosa (6-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-glucosa); isomaltrosia (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-glucosa), leucrosa (5-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-fructopiranosil), 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-*líxo*-hexulosa, lactosacarosa (O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-4)-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -D-fructofuranósido),  $\alpha$ -galacto-oligosacáridos 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), galacto-oligosacáridos sintéticos (neogalactobiosa, isogalactobiosa, galsacarosa, isolactosa I, II y III), fructanos tipo Levan ( $\beta$ -D-(2 $\rightarrow$ 6)-fructofuranosil)<sub>n</sub>  $\alpha$ -D-glucopiranosil), fructanos tipo inulina ( $\beta$ -D-((2 $\rightarrow$ 1)-fructofuranosil)<sub>n</sub>  $\alpha$ -D-glucopiranosil), 1 f- $\beta$ -fructofuranosilnistosa ( $\beta$ -D-((2 $\rightarrow$ 1)-fructofuranosil)<sub>n</sub> B-D-fructofuranósido), xilo-oligosacáridos (B-D-((1 $\rightarrow$ 4)-xilosa)<sub>n</sub>, lafinosa, lactosacarosa y arabino-oligosacáridos.

De acuerdo con una realización preferida más el oligosacárido neutro se selecciona de entre el grupo que consiste en fructanos, fructo-oligosacáridos, galactooligosacáridos dextrinas indigestibles (incluyendo los transgalacto-oligosacáridos), xilo-oligosacáridos, arabino-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, mano-oligosacáridos, fuco-oligosacáridos, y mezclas de los mismos. Más preferentemente, el oligosacárido neutro se selecciona de entre el grupo que consiste en fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos y transgalacto-oligosacáridos.

Los oligosacáridos y sus procedimientos de producción se describen más 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, Holanda), que se incorpora en el presente documento en su contenido íntegro por referencia. Los transgalacto-oligosacáridos (TOS) se venden por ejemplo, bajo la marca comercial Vivinal™ (Borculo Domo Ingredients, Holanda). La dextrina indigestible, que se puede producir por pirolisis del almidón de maíz comprende enlaces glucosídicos  $\alpha(1\rightarrow4)$  y  $\alpha(1\rightarrow6)$ , como están presentes en el almidón nativo, y contiene enlaces  $1\rightarrow2$  y  $1\rightarrow3$  y levoglucosano. Debido a estas características, la dextrina indigestible contiene partículas ramificadas bien desarrolladas que son parcialmente hidrolizadas por las enzimas digestivas humanas. Hay fácilmente disponibles muchas otras fuentes comerciales de oligosacáridos indigestibles y son conocidas por los expertos. Por ejemplo, el transgalacto-oligosacárido está disponible en Yakult Honsha Co., Tokyo, Japón. El oligosacárido de soja está disponible en Calpis Corporation distribuido por Ajinomoto U.S.A. Inc., Teaneck, N.J.

En una realización preferida más, la composición de acuerdo con la invención comprende un oligosacárido ácido con un DP entre 2 y 250, preparado a partir de pectina, alginato, y mezclas de los mismos; y un oligosacárido neutro, que se selecciona de entre el grupo que consiste en fructanos, fructo-oligosacáridos, dextrinas indigestible, galacto-oligosacáridos que incluyen transgalacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, arabino-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, fuco-oligosacáridos, y mezclas de los mismos.

En una realización preferida más la composición de acuerdo con la invención comprende dos oligosacáridos neutros químicamente distintos. Se descubrió que la administración de oligosacáridos ácidos combinados con dos oligosacáridos neutros químicamente distintos proporciona un efecto inmunoestimulante sinérgico óptimo. Preferentemente la composición de acuerdo con la invención comprende:

- un oligosacárido ácido 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), preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste en galacto-oligosacáridos y transgalacto-oligosacáridos; y
- un oligosacárido neutro basado en fructosa y/o glucosa (del que más del 50% de las unidades de monosa son unidades de fructosa y/o glucosa, preferentemente de fructosa), preferentemente inulina, fructano y/o fructo-oligosacáridos, más preferentemente fructo-oligosacáridos de cadena larga (con un DP medio de 10 a 60).

La mezcla de oligosacáridos ácidos y neutros preferentemente se administra en una cantidad de entre 10 mg y 100 gramos por día, preferentemente entre 100 mg y 25 gramos por día, incluso más preferentemente entre 0,5 y 20 gramos por día.

### Viscosidad y osmolaridad

En el contexto de la presente invención, la viscosidad se mide en un reómetro rotacional utilizando una geometría de cilindros concéntricos a 20 °C y una velocidad de cizalladura de 50 s<sup>-1</sup>.

La viscosidad de la composición nutricional entérica es menor de 200 mPa.s, más preferentemente menor de 150 mPa.s, más preferentemente menos de 120 mPa.s, más preferentemente menor de 100 mPa.s, más preferentemente menor de 80 mPa.s, y más preferentemente menor de 50 mPa.s. Una viscosidad baja es ideal para la administración oral de la composición nutricional entérica líquida de acuerdo con la invención, por que una persona puede consumir fácilmente una ración que tenga baja viscosidad tal como el que se presenta por la presente invención. Esto es ideal también para dosificaciones unitarias que se suministran por tubo.

En una realización de la presente invención, la osmolaridad de la composición es preferentemente más menor de 1200 mOsm/l, más preferentemente menor de 900 mOsm/l, más preferentemente menor de 800 mOsm/l, y más preferentemente menor de 700 mOsm/l.

### Unidad de dosificación

La composición nutricional entérica de acuerdo con la invención puede tener la forma de un alimento completo, es decir, puede satisfacer todas las necesidades nutricionales del usuario. Como tal, contiene preferentemente 1200 a 2500 kcal por dosificación diaria. Las cantidades de dosificación diaria se dan con respecto a un suministro energético diario de 2000 kcal para un adulto saludable que tiene un peso corporal de 70 kg. Para personas de diferente estado y diferente peso corporal, los niveles se deberían adaptar en consecuencia. Se entiende que la media diaria de ingestión de energía es aproximadamente 2000 kcal. El alimento completo puede estar en forma de múltiples unidades de dosificación, por ejemplo, de 4 (250 ml/unidad) a 40 (20 ml/unidad) por día para un suministro energético de 2000 kcal/día utilizando una composición nutricional entérica de acuerdo con la invención de 2,0 kcal/ml.

La composición nutricional entérica puede también ser un suplemento alimentario, por ejemplo para utilizarse además de un alimento no medicado. Preferentemente como suplemento, la composición nutricional entérica contiene por dosificación diaria menos de 1500 kcal, en particular como suplemento, la composición nutricional entérica contiene de 400 a 1000 kcal por dosis diaria. El suplemento alimentario puede estar en forma de unidades de dosificación múltiples, por ejemplo desde 2 (250 ml/unidad) a 10 (50 ml/unidad) por día para un suministro energético de 1000 kcal/día utilizando una composición nutricional entérica de acuerdo con la invención de 2,0

kcal/ml.

En una realización de la presente invención, una unidad de dosificación comprende cualquier cantidad de la composición nutricional entérica de acuerdo con la invención entre 10 ml y 250 ml, incluidos los valores extremos de este intervalo, más preferentemente cualquier cantidad entre 25 ml y 200 ml, incluidos los valores extremos de este intervalo, más preferentemente cualquier cantidad entre 50 ml y 150 ml, incluidos los valores extremos de este intervalo, más preferentemente aproximadamente 125 ml. Por ejemplo, a una persona que recibe unidades de dosificación de 50 ml se le pueden dar 10 unidades de dosificación por día para proporcionar soporte nutricional utilizando la composición nutricional entérica de acuerdo con la invención de 2,0 kcal/ml. De manera alternativa a una persona que recibe 125 ml de unidades de dosificación se le puede dar 4 o 5 o 6 o 7 o 8 unidades de dosificación por día para proporcionar soporte nutricional utilizando una composición nutricional entérica de acuerdo con la invención de 2,0 kcal/ml. Se prefieren tales pequeñas unidades de dosificación debido a su mejor cumplimiento.

En una realización de la presente invención, la composición se proporciona en una forma lista para su uso y no necesita reconstitución o mezclado antes de su uso. La composición de acuerdo con la invención se puede suministrar por tubo o se administra vía oral. Por ejemplo, la composición de acuerdo con la invención se puede proporcionar en una lata, como un aditivo, o en una bolsa para colgar. Sin embargo, una composición se puede proporcionar a una persona que necesite de la misma en forma de polvo, adecuado para reconstituir utilizando una solución acuosa o agua tal que se produzca la composición de acuerdo con la invención. Por lo tanto en una realización de la presente invención, la presente composición está en forma de un polvo, acompañado de instrucciones para disolverlo o reconstituirlo en una composición acuosa o agua para obtener la composición nutricional entérica de acuerdo con la presente invención. En una realización de la presente invención, la presente composición nutricional entérica se puede obtener disolviendo o reconstituyendo un polvo, preferentemente en una composición acuosa, en particular en agua.

En una realización de la presente invención, la composición de acuerdo con la invención se puede utilizar como una base para la fabricación de una composición nutricional semi-sólida, tal como una crema, un pudín, unas natillas, una sopa, un helado, o una jalea. En este extremo, la composición de acuerdo con la invención se procesa para convertir la composición de baja viscosidad de acuerdo con la invención en una más sólida o viscosa, por ejemplo, añadiendo espesantes o agentes gelificantes y procesando más la muestra en el producto final. Los espesantes y/o agentes gelificantes también pueden estar en la formulación desde un estadio más temprano del proceso, o incluso estar disueltos junto con los nutrientes al principio del proceso.

En una realización de la presente invención, la composición de acuerdo con la invención está envasada. El envase puede tener cualquier forma adecuada, por ejemplo, de cartón con forma cúbica, por ejemplo, para vaciarse con una paja; un vaso de cartón o plástico con tapa retirable; una botella pequeña por ejemplo para un intervalo de 80 a 200 ml, y pequeñas copas por ejemplo para un intervalo de 10 ml a 30 ml. Otro modo de envasado adecuado es la inclusión de pequeños volúmenes (por ejemplo, 10 ml a 20 ml) en vainas o cápsulas comestibles sólidas o semi-sólidas, por ejemplo con cubiertas tipo gelatina y similares. Otro modo de envasado adecuado es un polvo en un envase, por ejemplo, un papelillo, preferentemente con instrucciones para disolverlo o reconstituirlo en una composición acuosa o agua.

## EXPERIMENTACIÓN

Lo siguiente sirve para poner en evidencia los conceptos inventivos. Sin embargo, la invención no se considera ligada por ninguna de las teorías o hipótesis que explican los fenómenos observados que se exponen a continuación en el presente documento.

El uso de sistemas simplificados de leche concentrada, en vez de las completas recetas de nutrición medicada (es decir, sistemas que contienen altas concentraciones de iones mono y divalentes, carbohidratos y grasas), es una manera eficaz de determinar la influencia de los fosfatos y citratos en la voluminosidad de las micelas de caseína. Los inventores han seleccionado una fuente proteica comercial, a saber el aislado de caseína micelar (**MCI**), que contiene una cantidad insignificante de proteína del suero y prepararon soluciones altas en proteínas del 9% p/v a las que se añadieron fosfatos y citratos en un gran intervalo de concentraciones. En esta solicitud, los inventores desvelan el efecto de orto y polifosfatos y citrato sobre la voluminosidad de las micelas de caseína. Se hicieron mediciones de la viscosidad y ultracentrifugación para investigar cambios en la solución total y la voluminosidad de las micelas de caseína, mientras que se hicieron mediciones de la turbidez y actividad del ion de calcio para investigar cambios en las micelas de caseína. En esta especificación, los inventores solo utilizan los términos tumefacción o disminución o disociación de las micelas y no liberación de caseína específica cuando los inventores exponen el cambio de voluminosidad de las micelas de caseína, ya que la liberación de caseína específica no se determinaba en este estudio.

## MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

### Preparación de muestras

Para preparar una solución del 9% de aislado de caseína micelar, **MCI** (Nutripro™, DairyGold Food Ingredients,

Cork, Irlanda), se disolvió el polvo de proteína en un 80% de agua desmineralizada total a temperatura ambiente, mientras se agitaba a 600 rpm con un agitador de laboratorio (RW 20.n, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania). Una solución de MCl al 9% p/v contiene aproximadamente  $8,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  de sodio,  $4,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  de potasio,  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  de cloro,  $59,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  de calcio,  $43,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  de fósforo, y  $3,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  de magnesio. La solución proteica se homogeneizó con un homogeneizador de laboratorio de alta presión (NS2006L, GEA Niro Soari S.P.A., Parma, Italia) a  $350 + 50 \text{ bar}$  para obtener micelas de caseína simples con un diámetro  $D_{[4,3]}$  de  $0,15 \mu\text{m}$  como se determina con un Mastersizer 2000 que contiene un baño de agua hydro 2000G (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). La temperatura de la solución proteica era de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  tras la homogeneización.

Posteriormente, se añadieron intervalos de concentración de  $0\text{-}105 \text{ mEq}\cdot\text{l}^{-1}$  de monofosfato de uridina disódico (Yamasa Corporation, Chiba, Japón), fosfato disódico de hidrógeno (Merck & Co. Inc, Darmstadt, Alemania), hexametfosfato sódico (VWR International Ltd, Poole, England), sal hidrato de ácido fítico dodecasódico (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemania), o citrato trisódico (Gadot Biochemical Industries Ltd., Haifa Bay, Israel). Las concentraciones se basaron en miliequivalentes de los fosfatos y citrato para añadir una cantidad similar de cargas a las muestras. Solamente se utilizaron fuentes de sodio, debido a que el tipo de contra ion puede también tener influencia en las interacciones proteicas (Fox, Harper, Holsinger y Pallansch, 1965). El pH de las muestras se ajustó a  $7,0 \pm 0,05$  con  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  de hidróxido sódico (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Alemania) o  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  de ácido clorhídrico (Merck & Co. Inc, Darmstadt, Alemania) tras agitarse durante 30 min. Finalmente, las muestras se llevaron a una concentración proteica del 9% p/v con agua desmineralizada. Las muestras se almacenaron durante una noche a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  durante aproximadamente 17 h. El pH de las muestras se ajustó a  $7,0 \pm 0,05$  a la mañana siguiente, en el caso de que se hubieran producido desviaciones durante el almacenamiento. Las desviaciones que se produjeron durante el almacenamiento eran pequeñas y las muestras no mostraban ningún deterioro visible. Las muestras se analizaron por duplicado en cuanto al pH final, actividad de ion calcio, turbidez, y viscosidad. Las muestras también se ultracentrifugaron, y el aglomerado y el sobrenadante se recolectaron, se pesaron y se analizaron en cuanto a su contenido proteico.

#### 25 **Actividad del ion calcio**

La actividad del ion calcio se midió con un dispositivo medidor de calcio Mettler Toledo Seven Multi™ (con un medidor pH Inlab® Expert Pro) (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza) utilizando un electrodo Orion 9300BH y un electrodo de referencia Orion 900100. La calibración de los electrodos, las mediciones de las muestras, y los cálculos de las actividades del ion calcio se llevaron a cabo como se describe en De Kort y col. (2009).

#### 30 **Turbidez**

La turbidez se midió con un espectrofotómetro (4053 Kinetics, LKB Biochrom, Midland, Canadá). Se utilizaron cubetas de plástico con una ruta de 1 cm. Las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente utilizando una longitud de onda de 700 nm. Las muestras se diluyeron al 10% de su sustancia seca inicial en agua desmineralizada para que estuviera en los límites de detección del espectrofotómetro.

#### 35 **Viscosidad**

Las muestras se analizaron a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  con un reómetro MCR 300 (Anton Paar Physica, Graz, Austria) utilizando una geometría de cilindros concéntricos (cilindro CC27). La viscosidad se midió a velocidades de cizalladura de  $1 \text{ s}^{-1}$  a  $1000 \text{ s}^{-1}$ . La mayoría de las muestras se comportaron casi igual que los líquidos Newtonianos.

#### **Ultracentrifugación**

40 Se realizó la ultracentrifugación con una ultracentrífuga Centrikon T-1080A (Kontron Instruments Ltd., Milano, Italia) con un rotor de titanio de ángulo fijo (tipo TFT 45.94). Las muestras se ultracentrifugaron a  $150.000 \text{ g}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 60 minutos. Se separaron las fracciones de aglomerado y sobrenadante, se pesaron y se analizó su contenido proteico.

#### **Contenido proteico**

45 El contenido proteico se determinó en los aglomerados de la ultracentrifugación, los sobrenadantes y las muestras totales. Se utilizó el analizador de Proteínas y Nitrógeno NA 2100 (CE Instruments, Milán, Italia) para determinar el contenido en nitrógeno de las muestras con el procedimiento de Dumas. Se utilizó un factor de conversión de 6,38 para convertir el nitrógeno en contenido proteico. Aproximadamente 100 mg de muestra se pesaron en una copa metálica. Se secó la muestra en un horno a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 2,5 horas. A continuación se añadieron 25 mg de absorbente (82009101, Interscience B.V., Breda, Holanda) y la copa se cerró. Las copas se colocaron en el auto-analizador de muestras y se analizaron en cuanto a su contenido en nitrógeno.

#### **Voluminosidad**

55 La voluminosidad de la micela se calculó de dos maneras: a partir de la viscosidad y a partir de las mediciones de la ultracentrifugación. Los valores de la viscosidad se insertaron en la ecuación de Eilers (Eilers, 1941) para calcular la fracción de volumen de las micelas en la solución. La voluminosidad de la micela se calculó a partir de la fracción de

volumen. Se escogió la viscosidad que se midió a una velocidad de cizalladura de  $50 \text{ s}^{-1}$ , ya que esta velocidad de cizalladura corresponde al corte organoléptico durante la bebida. Se utilizó una fracción de volumen compactado máximo ( $\Phi_{\text{máx}}$ ) de 0,79 (Snoeren y col., 1982) en los cálculos de la voluminosidad. La viscosidad de electrolitos de fondo ( $\eta_0$ ) se fijó en  $1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ .

- 5 La voluminosidad de la micela también se calculó a partir de los datos de la ultracentrifugación dividiendo el volumen total del aglomerado ( $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$ ) por la cantidad de proteína en el aglomerado ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). El volumen total del aglomerado se calculó como describen Van Hoooydonk, Hagedoom y Boerrigter (1986). El volumen que ocupan los minerales en el aglomerado es insignificante, ya que las proteínas dominan en el volumen de aglomerado. La voluminosidad se expresaba en  $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$ .
- 10 Se verificó que las voluminosidades de las micelas que se calcularon por medio de la viscosidad correspondían con las voluminosidades de las micelas obtenidas a partir de la ultracentrifugación. Los resultados representados posteriormente se basan en las mediciones de la viscosidad.

### Listado de figuras

- 15 Figura 1: Equilibrios salinos entre los iones libres de calcio, los complejos quelantes de calcio, y las micelas de caseína en sistemas lácteos. Los quelantes en este estudio eran  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , SHMP, SP, y TSC.
- Figura 2: Actividad del ion calcio en la solución MCI al 9% p/v en función de la concentración de fosfato y citrato. Los símbolos representan: (●)  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ; (◆)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; (■) SHMP (▲) SP; (x) TSC.
- 20 Figura 3: Viscosidad a la velocidad de cizalladura de  $50 \text{ s}^{-1}$  de la solución MCI al 9% p/v en función de la concentración de fosfato y 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 de Eilers, a una velocidad de cizalladura de  $50 \text{ s}^{-1}$  de una solución de MCI al 9% p/v en función de la concentración de fosfato y citrato. Los símbolos representan: (●)  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ; (◆)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; (■) SHMP (▲) SP; (x) TSC.
- 25 Figura 5: Cantidad de aglomerado ultracentrifugado de una solución MCI al 9% p/v en función de la concentración de fosfato y citrato. Los símbolos representan: (●)  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ; (◆)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; (■) SHMP (▲) SP; (x) TSC.
- Figura 6: Cantidad de proteína en el aglomerado ultracentrifugado de una solución MCI al 9% p/v en función de la concentración de fosfato y citrato. Los símbolos representan: (●)  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ; (◆)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; (■) SHMP (▲) SP; (x) TSC.
- 30 Figura 7: Correlación entre las voluminosidades basándose en las mediciones de la viscosidad y ultracentrifugación. Los símbolos representan: (●)  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ; (◆)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; (■) SHMP (▲) SP; (x) TSC; (-)  $x = y$ .
- Figura 8: Turbidez de la solución MCI al 9% p/v diluida al 10% de su sustancia seca inicial en agua desmineralizada en función de la concentración de fosfato y citrato. Los símbolos representan: (●)  $\text{Na}_2\text{UMP}$ ; (◆)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; (■) SHMP (▲) SP; (x) TSC.

### 35 Resultados y conclusión

- La actividad del ion calcio disminuye con la adición de los fosfatos y citrato (Figura 2), debido a que los iones de calcio se quelan en la fase de suero y las micelas de caseína. Una disminución comparable en la actividad del ion calcio se midió en cuanto al SHMP, SP, TSC, y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . La viscosidad aumentaba hasta un extremo comparable tras la adición de SP, TSC y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Figura 3). El mayor aumento de la viscosidad se midió con las muestras de SHMP, que es debido a la capacidad del SHMP para su unión cruzada con caseínas (Kocak y Zadow, 1985; Mizuno y Lucey, 2007; Vujicic y col., 1968). Esto daba como resultado en formación de gel con la adición de más de  $45 \text{ mEq}\cdot\text{l}^{-1}$  de SHMP. La actividad del ion calcio solo disminuía ligeramente con la adición de  $\text{Na}_2\text{UMP}$ , debido a que el  $\text{Na}_2\text{UMP}$  es un enlazador débil del calcio (De Kort y col., 2009). En consecuencia, la viscosidad se afectaba de manera insignificante.
- 45 Los valores de la viscosidad (a una velocidad de cizalladura de  $50 \text{ s}^{-1}$ ) se insertaron en la fórmula de Eilers para calcular la voluminosidad de la micela de caseína. Las soluciones se fluidifican por cizalladura a concentraciones de quelante más altas ( $\geq 75 \text{ mEq}\cdot\text{l}^{-1}$  para SP, TSC y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\geq 45 \text{ mEq}\cdot\text{l}^{-1}$  para SHMP), cuando se medían viscosidades más altas. Esto parece significar que la interpretación por medio de viscosidades de  $50 \text{ s}^{-1}$  resulta ambigua. Sin embargo, en esta región de alta viscosidad, la sensibilidad de la fracción de volumen que se calcula por la ecuación de Eilers al valor actual de la viscosidad es baja: las fracciones de volumen están próximas al valor  $\Phi_{\text{máx}}$  de compactación máxima. Los resultados de la Figura 4 muestran que la micela de caseína en una solución de MCI al 9% p/v tiene una voluminosidad de  $4,5 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$ . Walstra y col. (2006) midió la voluminosidad de  $4 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$  para las micelas de caseína en la leche. La adición de  $\text{Na}_2\text{UMP}$  tenía un efecto insignificante en la voluminosidad de la micela de caseína. Se calcularon fracciones de volumen más grandes para las muestras con SHMP, en

consecuencia, la voluminosidad de las micelas de caseína no se podían deducir a partir de la viscosidad por la ecuación de Eilers, debido a que las interacciones entre las micelas no solamente eran de naturaleza hidrodinámica. El efecto de SP, TSC y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sobre la viscosidad y por lo tanto de la voluminosidad que se derivaba eran comparables. La voluminosidad de la micela de caseína aumentaba desde  $4,5 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $\Phi = 0,41$ ) a aproximadamente  $7,5 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $\Phi = 0,69$ ) con la adición de  $105 \text{ mEq}\cdot\text{l}^{-1}$  de SP, TSC, o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . La adición de SP, TSC y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ni se unía de forma cruzada con las micelas de caseína ni producía gelación en el intervalo de concentraciones estudiado, que está de acuerdo con el comportamiento del TSC en la leche (Mizuno y Lucey, 2005).

La voluminosidad de la micela de caseína también puede deducirse por las fracciones ultracentrifugadas dividiendo el volumen total del aglomerado por la cantidad de proteína en el aglomerado. La cantidad del aglomerado y la cantidad de proteína en el aglomerado tras la ultracentrifugación se muestran en las Figuras 5 y 6, respectivamente. La cantidad de aglomerado ultracentrifugado está influenciado por el tiempo y aceleración de la centrifugación, 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 y col., 1972): cuanto más CCP y caseínas estén presentes en las micelas de caseína (intactas) más baja es la viscosidad, y más fácilmente precipitan las micelas en el aglomerado. Aproximadamente se formó un 30% p/p de aglomerado con ultracentrifugación durante 1 h de la MCI al 9% p/v y su aglomerado contenía un 7,5% p/p de proteína. La cantidad de aglomerado y la cantidad de proteína en el aglomerado disminuía con la adición de TSC, SP y SHMP, mientras que la cantidad de aglomerado aumentaba y la cantidad de proteína en el aglomerado disminuía ligeramente con la adición de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{UMP}$ .

La Figura 7 muestra la correlación entre las voluminosidades calculadas a partir de las mediciones de la viscosidad y la ultracentrifugación. En general las voluminosidades que se obtienen a partir de la ultracentrifugación están por debajo de las voluminosidades obtenidas a partir de la viscosidad debido a la compresión de la capa externa "pilosa" de las micelas en el aglomerado. Esto también lo observaron Dewan y col. (1972) y Van Hooydonk y col. (1986). Las voluminosidades se correlacionan para las muestras de TSC, SP,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{UMP}$ , Para las muestras de SHMP, se correlacionan hasta con  $15 \text{ mEq}\cdot\text{l}^{-1}$  de SHMP, pero empieza a desviarse a concentraciones de SHMP más altas. Esto se debe a las altas viscosidades que se miden en las muestras de SHMP. La voluminosidad de la micela de caseína que se calcula por medio de las mediciones de viscosidad están por encima en las muestras de SHMP, debido a que las caseínas están unidas de manera cruzada. La cantidad de aglomerado ultracentrifugado es también menor a alta viscosidad. Por lo tanto, la voluminosidad de la micela de caseína en muestras SHMP no se puede calcular ni por medio de la viscosidad ni por medio de ultracentrifugación.

Los quelantes del calcio también afectan a la turbidez de las soluciones de leche (Odagiri y Nickerson, 1964). La turbidez de la solución de caseína micelar al 9% p/v disminuía con la adición de los fosfatos y citrato en un orden de  $\text{SHMP} > \text{SP} > \text{TSC} > \text{Na}_2\text{HPO}_4 > \text{Na}_2\text{UMP}$  (Figura 8). Mizuno y Lucey (2005) también observaron una disminución de la turbidez en un orden  $\text{SHMP} > \text{TSC} > \text{Na}_2\text{HPO}_4$  en las muestras preparadas a partir de concentrado de proteínas lácteas a pH 5,8. La turbidez disminuía en una extensión comparable tras la adición de  $45 \text{ mEq}\cdot\text{l}^{-1}$  de SP o SHMP, mientras que se medían grandes diferencias en la viscosidad de estas muestras. Esto implica que el SHMP tiene la capacidad de unirse de manera cruzada con caseínas en este intervalo de concentración, mientras que el SP no. La hipótesis que sostienen los inventores es que se debe a la forma y la distribución de cargas alrededor de las moléculas. El SHMP tiene seis cargas negativas distribuidas homogéneamente alrededor de su molécula, mientras que el SP tiene doce cargas negativas, agrupadas en pares, alrededor de su molécula. Esta distribución homogénea de las cargas hace posible que el SHMP interactúe con los cationes y las caseínas al mismo tiempo. El SP puede aproximarse menos fácilmente a las caseínas que el SHMP debido a la distribución de cargas alrededor de la molécula de SP y, de esta manera, se inhibe la unión de manera cruzada. El SP también es un quelante del calcio muy potente y puede quelar inmediatamente iones de calcio libres hasta una extensión que no deja cargas ni iones de calcio disponibles para unirse de manera cruzada a las caseínas. Esto se midió como un descenso más fuerte de la actividad del ion calcio para SP que para SHMP (Figura 2). Mizuno y Lucey (2007) investigaron la capacidad de unión cruzada del pirofosfato tetrasódico (**TSPP**) en una solución de proteína de leche concentrada. Sugieren que los complejos de pirofosfato cálcico se unen de manera cruzada con las caseínas o reducen la repulsión electrostática entre las caseínas, lo que facilita la asociación hidrófoba. El TSPP probablemente se une de manera cruzada a las caseínas más fácilmente que el SHMP, ya que tiene solo cuatro cargas distribuidas homogéneamente alrededor de su molécula. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para aclarar el mecanismo exacto de unión cruzada a caseínas de los distintos polifosfatos.

Es sorprendente que SP, TSC y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  demuestren un aumento comparable en la viscosidad y voluminosidad y un descenso en la actividad del ion calcio, aunque estos quelantes tienen un impacto diferente sobre la turbidez y (proteína en) aglomerado ultracentrifugado. Los iones de calcio de la micela de caseína se unen a los restos fosfoserina o son parte de los complejos CCP. El quelante añadido compite con los restos de fosfoserina y CCP en la micela de caseína por los iones de calcio. Debido a las diferencias en la afinidad por los iones de calcio de SP, TSC y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (De Kort y col., 2009; Mekmene, Le Graet y Gaucheron, 2009; Turner, Paphazy, Haygarth y Mckelvie, 2002; Upreti, Buhlmann y Metzger, 2006), los quelantes eran capaces de liberar diferentes cantidades de CCP desde la micela. Esto no afecta necesariamente la integridad de la estructura de la micela, debido a las interacciones hidrófobas entre las caseínas que rodea los grupos de CCP evitan la disociación completa de las micelas cuando se solubiliza el CCP (McMahon y Oommen, 2007; Munyua y Larsson-Raznikiewicz, 1980).

En general, la dispersión de partículas se determinan por la concentración, el tamaño de las partículas, y el 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 la luz de la micela de caseína (Munyua y Larsson-Raznikiewicz, 1980). La retirada de CCP de las micelas reduce el índice de refracción de las micelas de caseína lo que se mide como un descenso de la turbidez de las soluciones lácteas. El estudio de Smiddy, Martin, Kelly, y De Kruif (2006) sobre las micelas de caseína unidas internamente de manera cruzada mostraba que tras la adición de 50 mmol·l<sup>-1</sup> de citrato (150 mEq·l<sup>-1</sup>) a leche desnatada, se medía una disminución en la dispersión de la luz de aproximadamente el 50%. Estos autores sugerían que se había retirado todo el CCP (7% de sustancia seca de la micela de caseína) de las micelas unidas de manera cruzada a esta concentración, mientras que la estructura micelar permanecía intacta. Los inventores midieron una disminución de la turbidez del 97% para el SHMP y SP, un 87% para el TSC, y un 60% para el Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tras la adición de 105 mEq·l<sup>-1</sup> del quelante a una solución MCI al 9% p/v (Figura 8). Por lo tanto, estas disminuciones en la turbidez no se puede atribuir solamente a la liberación de CCP de la micela. Algunas caseínas específicas también se pueden liberar de la micela de caseína con la retirada del calcio y el CCP de la micela. Solamente se midió un ligero descenso de la cantidad de proteína en el aglomerado en las muestras de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Figura 6), mientras que se midió una disminución mucho mayor en la cantidad de proteína en el aglomerado en las muestras con SP y TSC. Sin embargo, la viscosidad de las muestras con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> aumentaban en cantidades comparables a la viscosidad de las muestras con TSC y SP. Esto ilustra que la diferencia en la disminución de turbidez para las muestras con SP, TSC y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> no se pueden explicar por la liberación de CCP solamente 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 producir la fuerte disminución de la turbidez. La dispersión de Rayleigh indica que la intensidad de la dispersión de la luz varía con el tamaño de la partícula elevado a la sexta potencia (Van De Hulst, 1957) y en consecuencia el tamaño de la partícula realiza la contribución principal al cambio de turbidez de la solución. El tamaño de partícula de las micelas de caseína se afecta cuando las micelas se hinchan o se disocian en estructuras más pequeñas. Huppertz (2007) describe que la adición de 6 mol·l<sup>-1</sup> de urea a las micelas de caseína unidas internamente de manera cruzada induce la tumefacción de las micelas, que se mide como un descenso de la turbidez del 40%. La disminución de la turbidez en las muestras MCI de los inventores es demasiado grande para atribuirla solamente a la tumefacción de las micelas de caseína. Una explicación más de la tumefacción de las micelas de caseína se describirá posteriormente. El descenso principal se debe más probablemente a la disociación de las micelas de caseína en estructuras más pequeñas. Las micelas disociadas se precipitarán menos fácilmente que las micelas de caseína intactas durante la ultracentrifugación, debido a que los fragmentos de las micelas disociadas son más pequeñas y ligeras que las micelas de caseína intactas. Basándose en estos fenómenos, los resultados de la turbidez y ultracentrifugación indican que la disociación micelar ocurría con la mayor extensión con la adición de SHMP y SP, seguida por TSC y finalmente por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Lo más probable es que la disociación micelar no se producía en las muestras de Na<sub>2</sub>UMP.

Sin embargo, se puede deducir una voluminosidad comparable con la adición de SP, TSC o Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en las soluciones que contienen micelas disociadas o intactas, debido a que el volumen total de proteína por gramo no cambia. Esto indica, por ejemplo, que la voluminosidad de la micela intacta en una solución con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> es comparable a la voluminosidad de la micela disociada en una solución con SP siempre que las actividades del ion calcio sean comparables en ambas soluciones. Como resultado, se midió un aumento de la viscosidad y voluminosidad de la micela de caseína en las muestras con SP, TSC y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. El fenómeno de las soluciones lácteas que contienen micelas de caseína intactas y disociadas con la adición de polifosfato o EDTA había sido presentado anteriormente, por ejemplo, por Lin y col. (1972), Griffin y col. (1988), Panouillé y col. (2005) y Pitkowski y col. (2009).

Como se ha mencionado, las micelas de caseína también se hinchan con la adición de quelantes del calcio. La Figura 2 muestra que la actividad del ion calcio disminuía en una extensión comparable con la adición de SHMP, SP, TSC y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. La repulsión electrostática de las micelas de caseína aumentaba debido a la disminución de iones de calcio libres en la fase continua. En consecuencia, las micelas de caseína se hidratan y se hinchan, lo que se mide como un aumento de la viscosidad de las soluciones MCI (Figura 3) y también como un aumento de la voluminosidad de la micela de caseína (Figuras 4 y 7). El fenómeno de tumefacción de las micelas de caseína se puede derivar del aglomerado ultracentrifugado en las muestras con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Figura 5). En estas muestras el volumen del aglomerado aumentaba con altas concentraciones de quelante, mientras que en las muestras con SHMP, SP, o TSC el volumen del aglomerado disminuía. La densidad, peso molecular, y tamaño de las micelas de caseína son importantes para la cantidad de aglomerado ultracentrifugado que se obtiene y se determinan por la cantidad de caseína, CCP, y agua presentes en las micelas de caseína (Walstra y col., 2006). Gaucher y col. (2007) y Guo y col. (2003) observaron que el ortofosfato precipitaba con el calcio de las micelas de caseína. Por ejemplo, se puede formar una cantidad de aproximadamente 3 g de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> con la adición de 60 mEq·l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, del que una gran parte de iones de calcio son parte ya de las micelas de caseína. El aumento de peso molecular es insignificante en comparación con el aumento observado en la cantidad de aglomerado. Este aumento se achaca a la tumefacción de las caseínas. La Figura 5 muestra también que la micela de caseína se hincha con la adición de Na<sub>2</sub>UMP, debido también al aumento de la cantidad de aglomerado en estas muestras. Estos hallazgos de tumefacción de las micelas con la adición de EDTA no se observó por Lin y col. (1972) y Pitkowski y col. (2009). Ambos describen que a ciertas concentraciones de EDTA solo una fracción de las micelas se disociaban, pero que el radio hidrodinámico del resto de micelas de caseína permanecía constante. Sin embargo, Sood y Gaiind (1979) ya cuestionaban las observaciones de Lin y col. (1972) de que las micelas intactas permanecieran con un radio

constante, debido a que midieron un aumento de voluminosidad con la adición de EDTA. Por lo tanto, concluían que las micelas deberían ser capaces de hincharse o encogerse cuando se cambia el contenido en calcio de las micelas de caseína. Además, Huppertz y col. (2007) demostraban por tres procedimientos de dispersión de la luz que incluso las caseínas unidas de manera cruzada eran capaces de hincharse con la adición de citrato o urea, lo que se midió como un aumento de los tamaños de las partículas y una disminución de la turbidez. Estos resultados están en línea con las observaciones de los inventores en las que la adición de quelantes de calcio inducirán una tumefacción de las micelas de caseína intactas y la disociación de una fracción de las micelas. Esto también sugiere que la unión laxa con el calcio, es decir, la unión con las cadenas laterales de aminoácidos con carga negativa y grupos fosfato, está presente en la micela de caseína además de la fuerte unión al calcio en los complejos CCP. El primer tipo tiene una función estructural y su liberación se relaciona con la tumefacción de la micela, que se mide por el aumento de la viscosidad. La liberación del último, está relacionada con la disociación de las micelas de caseína, que se mide como una disminución de la turbidez y la cantidad de aglomerado ultracentrifugado. La hipótesis de que los dos tipos de interacciones con el calcio están presentes en las micelas de caseína fue propuesta por Munyua y Larsson-Raznikiewicz (1980). En general, parece que la actividad del ion calcio es buena para predecir las viscosidades y voluminosidades que se observan, pero es un indicador pobre cuando las micelas de caseína empiezan a disociarse.

### CONCLUSIÓN

Los quelantes del calcio inducen cambios físicos en las soluciones concentradas de caseína micelar afectando la microestructura de las micelas de caseína. La adición de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , TSC, y SP producían un aumento comparable en la viscosidad de las soluciones MCI, mientras que la turbidez disminuía con el orden  $\text{SP} > \text{TSC} > \text{Na}_2\text{HPO}_4$ . La adición de SP y SHMP producía una disminución comparable de la turbidez, pero la viscosidad de las muestras con SHMP era mucho más alta. Esto es debido a la capacidad del SHMP para unirse de manera cruzada a las micelas de caseína. La actividad del ion calcio disminuía en una extensión comparable con la adición de SHMP, SP, TSC o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , que inducía la tumefacción de las micelas de caseína.

La voluminosidad de la micela de caseína (es decir, la tumefacción) se podía calcular por las mediciones de la viscosidad y la ultracentrifugación con la adición de SP, TSC,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{UMP}$ . Las voluminosidades que se obtienen por los dos procedimientos de cálculo se correlacionan en estas muestras. La voluminosidad de la micela de caseína en las muestras con SHMP no se podía derivar de los resultados de la viscosidad y ultracentrifugación debido a las uniones de manera cruzada que se forman entre las caseínas. El débil quelante de calcio  $\text{Na}_2\text{UMP}$  tenía un efecto insignificante en la viscosidad y turbidez de la solución MCI y solamente disminuía ligeramente la actividad del ion calcio. La disminución de la actividad del ion calcio predecía el aumento de la viscosidad y la tumefacción relacionada de la micela hasta que la micela comienza a disociarse. Esto confirma la hipótesis de que están presentes dos tipos de interacciones con el calcio en el caso de las micelas. La extensión de la disociación micelar depende del tipo y concentración del quelante de calcio que se añade.

### Listado de las realizaciones preferidas

1. El uso de uno o más agentes quelantes que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o una mezcla de los mismos, para controlar independientemente la viscosidad y transparencia de una composición nutricional líquida que comprende de 9 a 20 g de proteína por 100 ml de la composición y que tiene un pH de aproximadamente 6 a 8, que dicha composición comprende al menos 6 g/100 ml de caseína micelar y uno o más agentes quelantes que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o una mezcla de los mismos.

2. El uso de acuerdo con la realización 1, en que el ácido fosfórico se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido monofosfórico uridina, ácido monofosfórico citidina, ácido ortofosfórico, ácido hexafosfórico inositol, ácido hexametafosfórico, o una mezcla de los mismos, y la sal fosfato se selecciona de entre el grupo que consiste en monofosfato de uridina, monofosfato de citidina, ortofosfato, hexafosfato de inositol, hexametafosfato, o una mezcla de los mismos.

3. El uso de acuerdo con la realización 1, en que la sal soluble es una sal monovalente, preferentemente una sal sódica, una sal potásica, o una mezcla de las mismas.

4. El uso de acuerdo con la realización 3, en que el contra ion presente en la sal monovalente está presente en una cantidad menor o igual a una cantidad equimolar, con respecto al ácido.

5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en que la sal se selecciona de entre el grupo que consiste en monofosfato disódico de uridina, monofosfato disódico de citidina, ortofosfato disódico, ortofosfato disódico, hexafosfato dodecasódico de inositol, hexametafosfato hexasódico, citrato trisódico, o mezclas de los mismos.

6. El uso de acuerdo con la realización 5, en que la sal fosfato es monofosfato disódico de uridina.

7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en que se utiliza una cantidad de aproximadamente 1 a 120  $\text{mEq}\cdot\text{l}^{-1}$ , preferentemente de 20 a 60  $\text{mEq}\cdot\text{l}^{-1}$  de uno o más agentes quelantes.

8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 7 en la fabricación de una composición nutricional.

9. Una composición nutricional que comprende de 9 a 20 g de proteína por 100 ml de la composición y que tiene un pH de aproximadamente 6 a 8, que comprende dicha composición uno o más agentes quelantes que se seleccionan de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o

una mezcla de los mismos, y en que la composición tiene una viscosidad menor de 200 mPa.s cuando se mide en un reómetro rotacional utilizando una geometría de cilindros concéntricos a 20 °C y una velocidad de cizalladura de 50 s<sup>-1</sup> y en que la composición comprende una cantidad de 1 a 120 mEq·l<sup>-1</sup> de dicho uno o más agentes quelantes.

5 10. La composición nutricional de acuerdo con la realización 9, en que la sal se selecciona de entre el grupo que consiste en monofosfato de uridina, monofosfato de citidina, ortofosfato, hexafosfato de inositol, hexametafosfato, citrato o una mezcla de los mismos, y la sal fosfato se selecciona de entre el grupo que consiste en monofosfato de uridina, monofosfato de citidina, ortofosfato, hexafosfato de inositol, hexametafosfato, o una mezcla de los mismos.

10 11. La composición nutricional de acuerdo con la realización 9, en que la sal se selecciona de entre el grupo que consiste en monofosfato disódico de uridina, monofosfato disódico de citidina, ortofosfato disódico, hexafosfato dodecasódico de inositol, hexametafosfato hexasódico, citrato trisódico, o una mezcla de los mismos.

12. La composición nutricional de acuerdo con la realización 9, en que la sal es monofosfato disódico de uridina.

13. La composición nutricional de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 9 a 12, a la que se ha añadido una cantidad de aproximadamente 1 a 120 mEq·l<sup>-1</sup>, preferentemente de 20 a 60 mEq·l<sup>-1</sup>, de uno o más agentes quelantes.

15 14. La composición nutricional de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 9 a 13, que comprenden una o más grasas, carbohidratos digestibles y no digestibles.

15. La composición nutricional de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 9 a 14, en que la composición es una composición líquida.

20 16. Un procedimiento para proporcionar nutrición a una persona que necesita la misma, que comprende las etapas de administración a dicha persona la composición nutricional de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 9 a 15.

17. El procedimiento de acuerdo con la realización 16, en que la persona es una persona anciana, una persona que está en un estado enfermo, una persona que está malnutrida, o una persona sana tal como un deportista o una deportista o un anciano activo.

## 25 **Referencias**

de Kort, E. J. P., M. Minor, T. H. M. Snoeren, A. C. M. van Hooijdonk, y E. van der Linden. 2009. Calcium binding capacity of organic and inorganic orthoand polyphosphates. *Journal of dairy science and technology*. 89:283-299.

30 Dewan, R. K., V. A. Bloomfield, A. chudgar, y 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.

35 Fox, K. K., M. K. Harper, V. H. Holsinger, y M. J. Pallansch. 1965. Gelation of milk solids by orthophosphate. *J. Dairy Sci.* 48:179-185.

Gaucher, I., Piot, M., Beaucher, E., y 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., y Price, J. C. (1988). The disaggregation of calcium-depleted casein micelles. *European Journal of Biochemistry*, 174, 339-343.

40 Griffin, M. C. A., Price, J. C., y 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, y 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. y P. Dejmek. 1988. Rheological properties of ultrafiltered skim milk. II. Protein voluminosity. *Milchwissenschaft*. 43(2):95-97.

45 Harwalkar, V. R. 1982. Chapter 7: Age gelation of sterilised milks. Páginas 229-269 in *Developments in dairy chemistry*. Vol. 1. P. F. Fox, ed. Applied Science Publishers, London.

Huppertz, T., Smiddy, M. A., y De Kruif, C. G. (2007). Biocompatible micro-gel particles from cross-linked casein micelles. *Biomacromolecules*, 8, 1300-1305.

50 Holt, C. 1997. The milk salts and their interaction with casein. *Advanced Dairy Chemistry*. 3:233-256. Karlsson, A. O., R. Ipsen, K. Schrader, y 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. y J. G. Zadow. 1985. Controlling age gelation of UHT milk with additives. *The Australian journal of dairy technology*. 40:58-64.

55 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.

60 Leviton, A. y 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., y 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., y 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., y Oommen, B. S. (2007). Supramolecular structure of the casein micelle. *Journal of Dairy Science*, 91, 1709-1721.
- 5 Mekkeme, O., Le Graet, Y., y Gaucheron, F. (2009). A model for predicting salt equilibria in milk and mineral-enriched milks. *Food Chemistry*, 116, 233-239.
- Mizuno, R. y 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. y J. A. Lucey. 2007. Properties of milk protein gels formed by phosphates. *J. Dairy Sci.* 90:4524-4531.
- 10 Morr, C. V. 1967. Some effects of pyrophosphate and citrate ions upon the colloidal caseinate-phosphate micelles and ultrafiltrate of raw and heated skim milk. *J. Dairy Sci.* 50:1038-1044.
- Munyua, J. K., y 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.
- 15 Odagiri, S., y 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.
- Panouillé, M., Nicolai, T., Benyahia, L., y Durand, D. (2005). Aggregation and gelation of casein submicelles. Special publication - Royal society of chemistry, 298, 194-208.
- 20 Philippe, M., F. Gaucheron, Y. Le Graet, F. Michel, y A. Garem. 2003. Physicochemical characterisation of calcium-supplemented skim milk. *Lait*. 83:45-59. Pitkowski, A., Nicolai, T., y 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., y Huppertz, T. (2006). Stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase. *Journal of Dairy Science*, 89, 1906-1914.
- 25 Snoeren, T. H. M., Damman, A. J., y Klok, H. J. (1982). The viscosity of skim-milk concentrates. *Netherlands milk and dairy journal*, 36, 305-316.
- Sood, S. M., y Gaiand, 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, y I. D. McKelvie. 2002. Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* 357:449-469.
- 30 Udabage, P., McKinnon, I. R., y 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, y 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.
- 35 Van de Hulst, H. C. (1957). *Light scattering in small particles*. New York, USA: Wiley.
- van Hooydonk, A. C. M., Hagedoorn, H. G., y Boerrigter, I. J. (1986). pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 1. Effect of acidification on physicochemical properties. *Netherlands milk and dairy journal*, 40, 281-296.
- Vujcic, I., J. M. de Man, y I. L. Woodrow. 1968. Interaction of polyphosphates and citrate with skim milk proteins. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 1:17-21.
- 40 Walstra, P., J. T. M. Wouters, y T. J. Geurts. 2006. *Dairy science and technology*. 2 ed. CRC press, Boca Raton, USA.
- Ward, B. R., Goddard, S. J., Augustin, M.-A., y 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.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición nutricional líquida que comprende de 9 a 20 g de proteína por 100 ml de la composición y que tiene un pH de 6 a 8, comprendiendo dicha composición uno o más agentes quelantes seleccionados de entre el grupo que consiste en un ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o una mezcla de los mismos, y en que la composición tiene una viscosidad menor de 200 mPa.s cuando se mide en un reómetro rotacional con geometría de cilindros concéntricos a 20 °C a una velocidad de cizalladura de 50 s<sup>-1</sup> y en que la composición comprende una cantidad de 1 a 120 mEq·l<sup>-1</sup> de dichos uno o más agentes quelantes.
2. La composición nutricional de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos 6 g/100 ml de caseína micelar.
- 10 3. La composición nutricional de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además caseinato, que está presente preferentemente como mucho en un 30% en peso de dicho caseinato, en base en el peso total de proteína; y/o dicha composición comprende caseína micelar y caseinato en una relación ponderal de 100:0 a 70:30, preferentemente de 100:0 a 80:20.
- 15 4. La composición nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además hasta un 15% en peso de proteína de suero, en base en el peso total de proteína.
5. La composición nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene una densidad energética de al menos 2,0 kcal/ml.
6. La composición nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende de 20 a 60 mEq·l<sup>-1</sup> de dichos agentes quelantes.
- 20 7. La composición nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el ácido fosfórico se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido fosfórico uridina, ácido fosfórico citidina, ácido ortofosfórico, ácido hexafosfórico inositol, ácido hexametafosfórico, o una mezcla de los mismos, y la sal fosfato se selecciona de entre el grupo que consiste en monofosfato de uridina, monofosfato de citidina, ortofosfato, hexafosfato de inositol, hexametafosfato, o una mezcla de los mismos.
- 25 8. La composición nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que la sal se selecciona de entre el grupo que consiste en monofosfato disódico de uridina, monofosfato disódico de citidina, ortofosfato disódico, hexafosfato dodecasódico de inositol, hexametafosfato hexasódico, citrato trisódico, o una mezcla de los mismos, y en que dicha sal es preferentemente monofosfato disódico de uridina.
- 30 9. La composición nutricional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en proporcionar nutrición a una persona que necesita la misma, en que la persona es preferentemente una persona anciana, una persona que está en un estado enfermo, una persona que se está recuperando de un estado enfermo, una persona que está malnutrida, o una persona sana tal como un deportista o una deportista o un anciano activo.
- 35 10. El uso de uno o más agentes quelantes seleccionados de entre el grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble o una mezcla de los mismos, para controlar independientemente la viscosidad y transparencia de una composición nutricional líquida que comprende de 9 a 20 g de proteína por 100 ml de la composición y que tiene un pH de 6 a 8, comprendiendo dicha composición al menos 6 g/100 ml de caseína micelar y uno o más agentes quelantes seleccionados de entre el grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido cítrico, una sal fosfato soluble, una sal citrato soluble, o una mezcla de los mismos.
- 40 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en que la viscosidad de la composición se controla a menos de 200 mPa.s cuando se mide en un reómetro rotacional utilizando una geometría de cilindros concéntricos a 20 °C a una velocidad de cizalladura de 50 s<sup>-1</sup>.
- 45 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, comprendiendo además dicha composición caseinato, en el que dicho caseinato preferentemente está presente como mucho en un 30% en peso, en base en el peso total de la proteína, y/o dicha composición comprende caseína micelar y caseinato en una relación ponderal de 100:0 a 70:30, preferentemente de aproximadamente 100:0 a aproximadamente 80:20.
13. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en que dicha composición comprende además hasta el 15% de proteína de suero, en base en el peso total de la proteína.
14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en que dicha composición tiene una densidad energética de al menos 2,0 kcal/ml.
- 50 15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en que dicha composición comprende 1 a 120 mEq·l<sup>-1</sup>, preferentemente 20 a 60 mEq·l<sup>-1</sup> de dichos agentes quelantes.

*Fig 1*

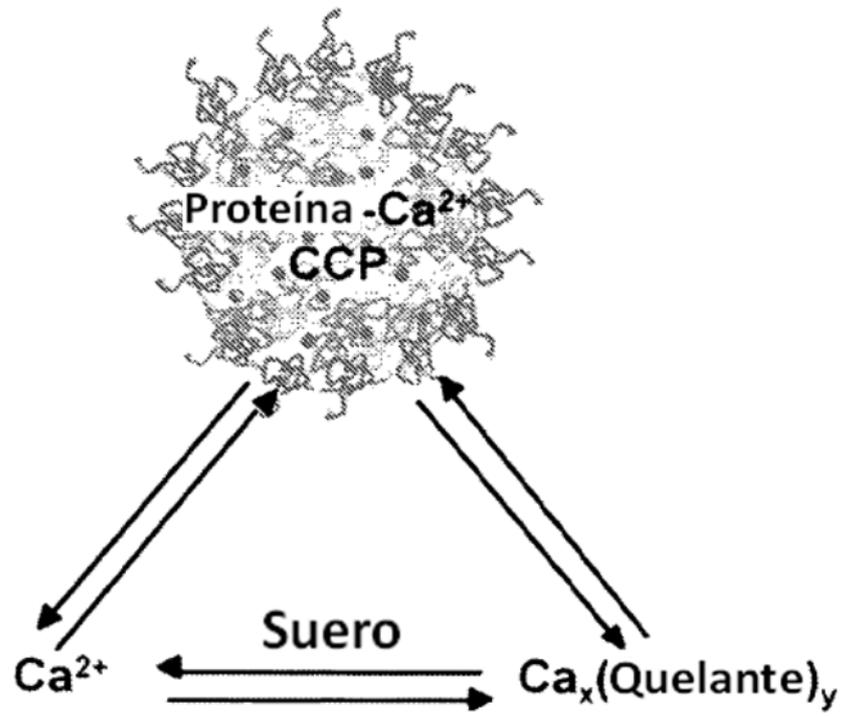


Fig 2

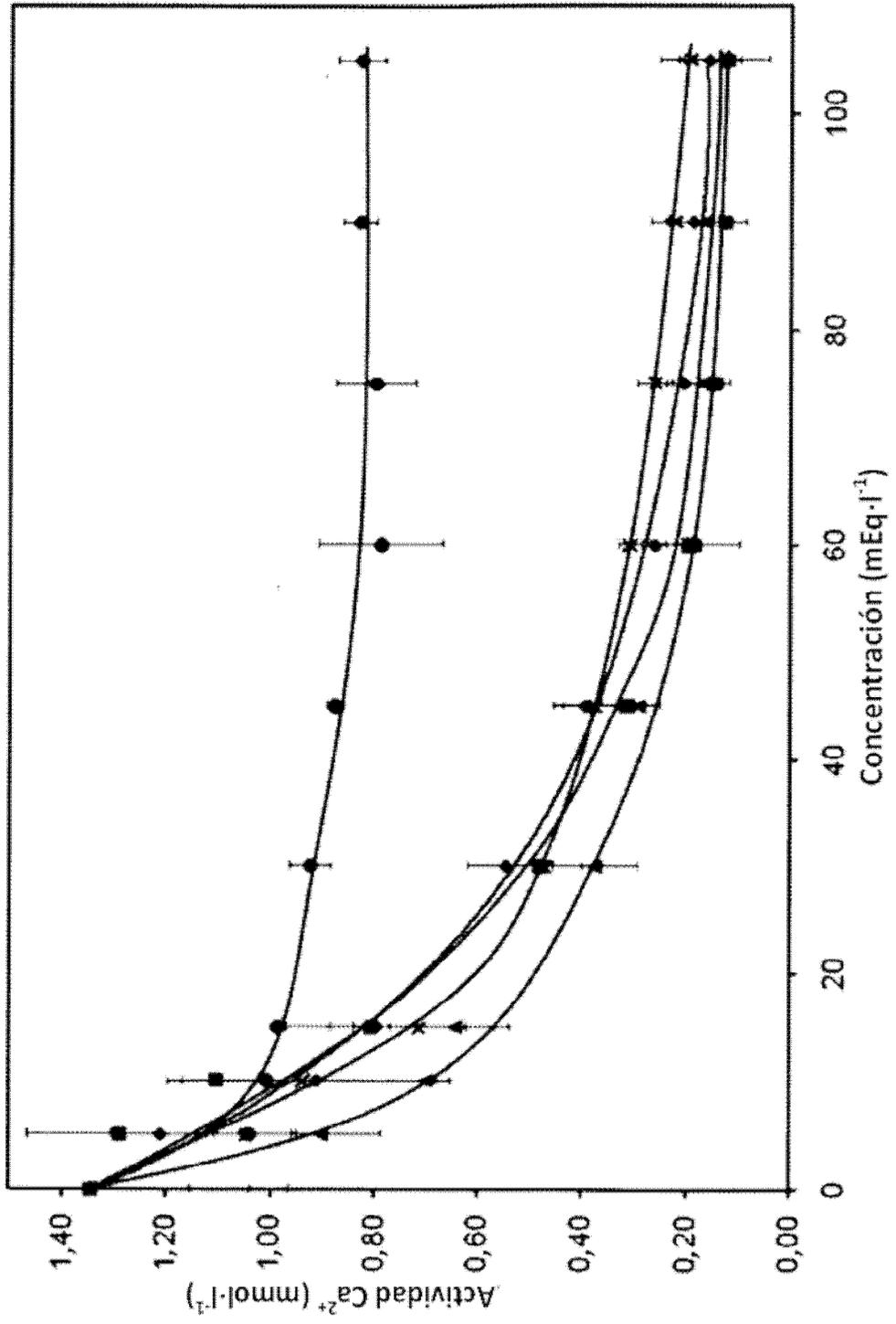
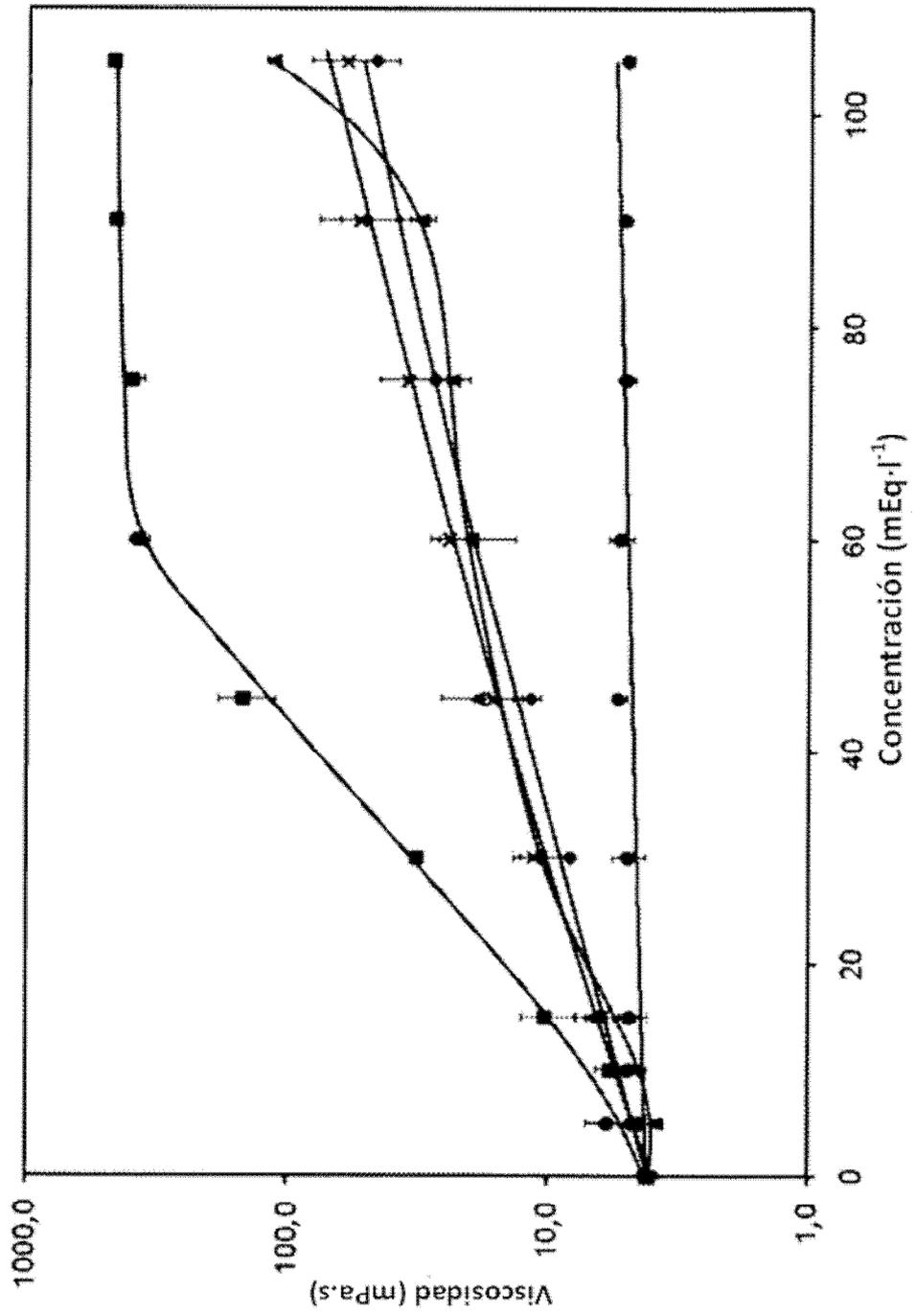


Fig 3



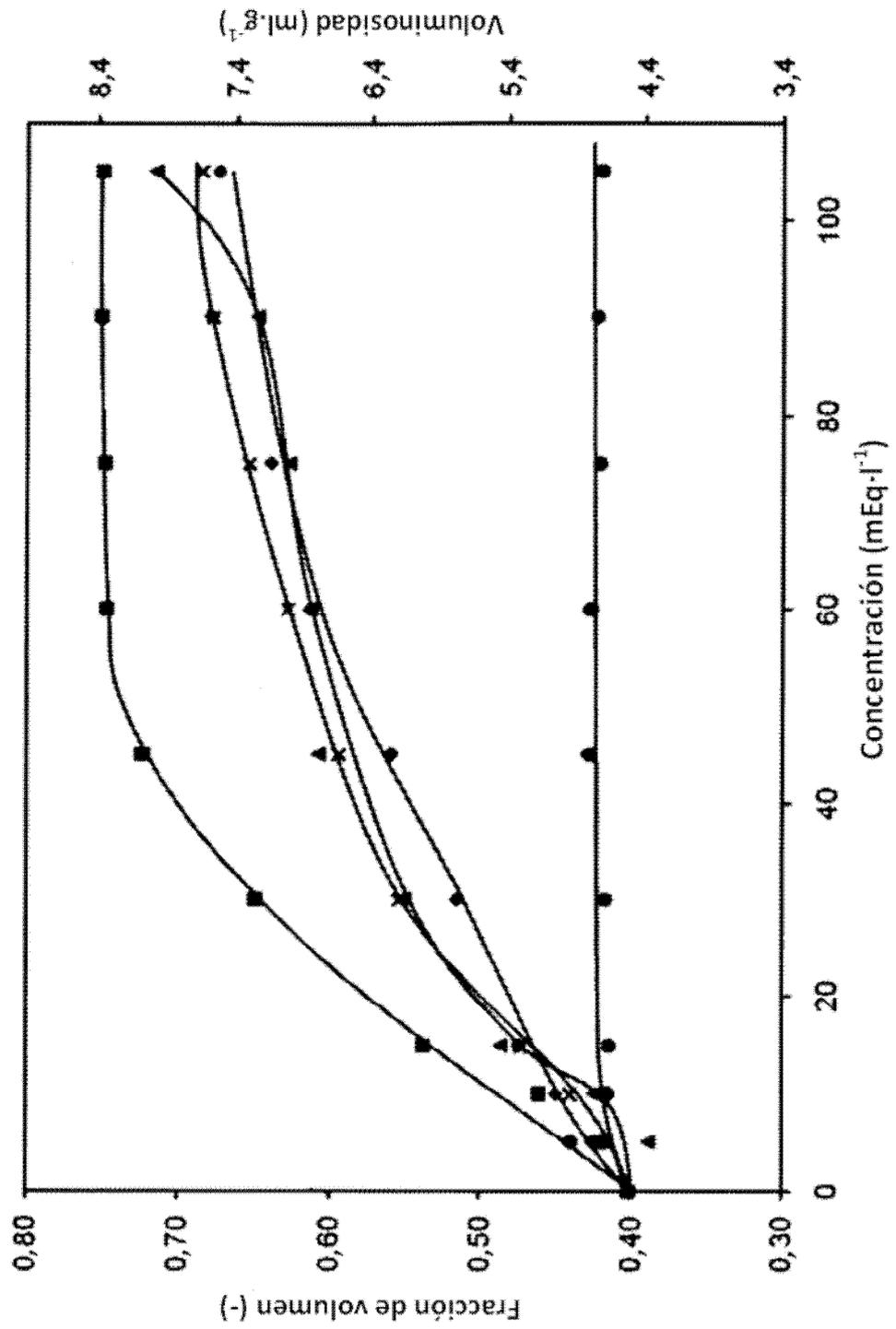


Fig 4

