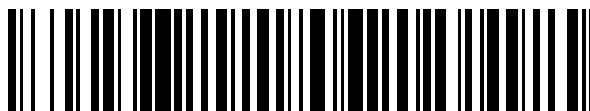


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 852**

51 Int. Cl.:

C07H 19/00 (2006.01)

C12P 19/26 (2006.01)

A23C 9/146 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2010 E 10710394 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2408794**

54 Título: **Aislamiento y purificación de componentes de suero de leche**

30 Prioridad:

17.03.2009 GB 0904562

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

11.11.2013

73 Titular/es:

**SEPARATION TECHNOLOGIES INVESTMENTS
LIMITED (100.0%)
Mill Race Compton Abdale
Cheltenham GL54 4DR, GB**

72 Inventor/es:

**SCOTT, STEPHEN NIALL y
KRISHNAPILLAI, ASHOK**

74 Agente/Representante:

BALLESTER CAÑIZARES, Rosalía

ES 2 428 852 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).

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE COMPONENTES DE SUERO DE LECHE**Descripción**

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento y purificación de los componentes de suero de leche, particularmente pero no exclusivamente a partir de permeado de suero de leche, especialmente el aislamiento de sialil lactosa, específicamente 3'-sialil lactosa (de otro modo conocida como 3'-SL o 3-SL o 3 prima).

[0002] La producción de queso generalmente implica la coagulación de proteína de leche (caseína) para atrapar sólidos de la leche y grasa de la leche en una matriz de cuajo ya sea por la acción de las enzimas en la leche o al reducir el pH de la leche utilizando un ácido apropiado. Esta matriz de cuajo se consolida entonces para expresar una fracción líquida, conocida como suero de leche de queso. El suero de leche de queso contiene sólidos de leche que no se conservan en la matriz de cuajo, particularmente sacáridos leche y proteínas solubles. El suero de leche comprende el 80-90% del volumen total de leche utilizado en el proceso de fabricación de queso y contiene más de la mitad de los sólidos de la leche entera original, incluyendo el 20% de la proteína y la mayor parte de la lactosa y tiene un contenido orgánico muy alto.

[0003] La eliminación del suero de leche ha sido siempre un problema para la industria láctea debido a su alto contenido orgánico. Ahora es posible recuperar las proteínas solubles del suero de leche y el valor de la lactosa y es claramente beneficioso recuperar la mayor cantidad de contenido orgánico como sea posible para reducir la carga orgánica del flujo del efluente y para obtener un mayor retorno del suero de leche. Las empresas de procesamiento de queso están haciendo importantes esfuerzos para desarrollar usos para este producto.

[0004] Se ha convertido en algo común en el comercio someter el suero de leche a ultrafiltración (UF) para proporcionar un concentrado de proteína y permeado de suero de leche. El concentrado de proteína ha encontrado aplicaciones en alimentación animal, fertilizantes, fermentación y como relleno de alimentos. Sin embargo, el permeado rico en lactosa a menudo sigue siendo un producto de desecho debido a la incapacidad de aislar satisfactoriamente y purificar los componentes individuales del permeado que los harían adecuados para su posterior uso.

[0005] El permeado rico en lactosa incluye varios oligosacáridos, tales como 3'-sialil lactosa. Se ha descubierto que esto tiene una aplicación valiosa en, por ejemplo, productos farmacéuticos y aplicaciones de comida para bebés, pero se necesita proporcionar el componente en una forma suficientemente pura.

[0006] US 6 323 008 (Pelletier) proporciona métodos para producir sialiloligosacáridos a partir de fuentes lácteas y flujos de desecho de procesamiento de queso mediante el uso de la actividad catalítica de $\alpha(2-3)$ trans-sialidasas para explotar las altas concentraciones de la lactosa y sialosidos que se dan naturalmente en los residuos de procesamiento de queso para conducir la síntesis enzimática de $\alpha(2-3)$ sialil-lactosa. La sialil lactosa producida por esta acción enzimática es purificada al pasar la mezcla a través de una resina catiónica seguida de una resina aniónica fuerte. La sialil lactosa se recoge en la resina aniónica y se eluye mediante una solución apropiada. Este proceso sí que purificar la sialil lactosa, pero tiene el inconveniente de que la resina catiónica sólo elimina algunos de los cationes con las especies positivas restantes formando una sal con la sialil lactosa. Esto requiere entonces una fuerte resina aniónica para dividir la sal y permitir la unión de la sialil

lactosa a la resina. Sin embargo, la cantidad de sialil lactosa que en realidad se une a la columna dependerá de la cantidad de otros aniones presentes en los residuos relativos a la sialil lactosa y, por lo tanto, esto requerirá una limpieza del material eluido que será rico en otros aniones.

[0007] Es un objetivo de la presente invención proporcionar un proceso para el aislamiento y purificación de los componentes del suero de leche, especialmente 3'-sialil lactosa, en particular, pero no exclusivamente a partir de permeado de suero de leche, que supera o al menos alivia los inconvenientes mencionados anteriormente.

[0008] Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención proporciona un proceso para el aislamiento y/o purificación de un componente deseado de suero de leche, tal como 3'-sialil lactosa, a partir de suero de leche que comprende las etapas siguientes:

poner en contacto el suero de leche con al menos una serie de resinas de intercambio iónico, dicha serie comprendiendo una primera resina catiónica, una primera resina aniónica, una segunda resina catiónica y una segunda resina aniónica para desmineralizar el suero de leche;

poner en contacto este suero de leche desmineralizado con dos resinas de intercambio iónico adicionales o finales comprendiendo una resina catiónica de ácido fuerte y una resina aniónica de base débil donde el componente deseado se recoge en la resina aniónica; y eluir el componente deseado de la resina aniónica final mediante un eluyente apropiado.

[0009] En un modo de realización preferido de la presente invención, se somete suero de leche cruda a ultrafiltración antes de ponerse en contacto con las resinas de intercambio iónico, la etapa de ultrafiltración proporcionando un concentrado de proteína de suero de leche y un permeado en el cual el permeado de suero de leche entra en contacto con las resinas de intercambio iónico. Sin embargo, se puede utilizar suero de leche cruda o suero de leche desmineralizado para el proceso.

[0010] El componente deseado es preferiblemente 3'-sialil lactosa. Otros componentes pueden incluir 6'-sialil lactosa y/u otros oligosacáridos aniónicos presentes en el permeado.

[0011] Preferiblemente, la primera resina catiónica es una resina catiónica de ácido débil. Es preferible que la segunda resina catiónica sea una resina catiónica de ácido fuerte. Si la segunda resina catiónica es un catión de ácido débil, el pH del material que entra en la resina debe ser mantenido por encima de pH 5, preferiblemente por encima de pH 5,5.

[0012] Preferiblemente, los primer y segundo aniones de base comprenden aniones de base débil.

[0013] El permeado de suero de leche ultrafiltrado (UF) se puede hacer pasar directamente a través de las resinas de intercambio iónico o se puede someter a una etapa de pre-desmineralización completa, o más preferiblemente parcial, usando una técnica tal como diálisis, electrodiálisis, nanofiltración o cualquier combinación de las anteriores para optimizar rentabilidad y/o eficiencia técnica.

[0014] En un modo de realización de la presente invención, el permeado de suero de leche UF se concentra mediante nanofiltración antes de poner en contacto el material concentrado con la serie de resinas tal como se define en el primer aspecto de la presente invención. En este modo de realización, es preferible poner en contacto el material concentrado con dos series de resinas, es decir, una primera serie de catión de ácido débil, anión de base, catión de ácido fuerte, anión de base, seguida de una segunda serie de catión de ácido débil, anión de base, catión de ácido fuerte,

anión de base. El anión de base puede ser fuerte o débil, pero preferiblemente es débil para minimizar pérdidas y optimizar la elución.

[0015] El permeado puede ser sometido a una desmineralización parcial por electrodiálisis. Éste se hace pasar a continuación a través de una serie de resinas de catiónicas y aniónicas para permitir una limpieza completa y posterior unión de 3'-SL en una resina aniónica final.

[0016] En un modo de realización de la presente invención, el contenido de 3'-SL relativa en el permeado de suero de leche UF concentrado se puede incrementar por medio de cromatografía por permeación iónica (o cromatografía de exclusión iónica) antes de entrar en contacto con la serie de resinas de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. Preferiblemente, la cromatografía por permeación iónica se lleva a cabo a una temperatura elevada, siendo preferiblemente al menos 50°C, preferiblemente de 50°C a 80°C. El material de elución comprende una primera fracción que contiene moléculas cargadas incluyendo 3'-sialil lactosa seguida de una segunda fracción que contiene moléculas no cargadas, tales como lactosa. La primera fracción que contiene la lactosa 3'-sialil lactosa se pone en contacto entonces con la serie de resinas con la lactosa 3'-sialil recogida en una resina aniónica.

[0017] La resina de separación cromatográfica es preferiblemente CR1310K suministrada por Rohm & Haas. Sin embargo, existen otras resinas adecuadas. Ejemplos incluyen, sin carácter limitativo, CR1310Ca & Na o CR1320 Ca, K o Na, DOWEX Monosphere 99Ca/320 de Dow o Diaion UBK530 de Mitsubishi o PCR145K de Purolite.

[0018] La 3'-sialil lactosa se eluye a partir de la resina aniónica mediante ya sea una solución diluida de manera apropiada de álcali, sal, soluciones tampón o ácido. El álcali utilizado incluye hidróxido de amonio, NaOH, KOH; la solución salina incluye NaCl, KCl, cloruro de amonio, acetato de amonio, formiato de amonio, carbonato de amonio, etc.; y los ácidos incluyen HCl diluido, ácido acético, ácido fórmico y/o tampones que contienen aniones de contador suficientes para eluir eficazmente la 3'-sialil lactosa de la resina aniónica o mezclas adecuadas de los anteriores. Sin embargo, se prefiere una sal de amonio, ya que tienden a ser volátiles.

[0019] La lactosa 3'-sialil eluida mediante una base apropiada o sal de la resina aniónica puede ser sometida a la eliminación de las sales utilizando una resina desalinizadora tal como Sephadex G25. Por ejemplo, el producto de elución podrá ser concentrado en ~20-30% de sólidos mediante nanofiltración y el material resultante se cromatografía en Sephadex G25 (u otras tales resinas desalinizadoras disponibles en el mercado). El primer material para eluir es 3'-sialil lactosa junto con algunas de las moléculas más grandes seguidas de las moléculas más pequeñas tales como los NPN y sales. Si se fuera a usar una solución que contiene iones grandes tales como acetato, formiato, etc., la eliminación de esas moléculas mediante Sephadex G25 o su resina equivalente sería algo pobre. No obstante, se puede mejorar la pureza mediante el ajuste de la profundidad del lecho de resina y las tasas de flujo. En tal caso, se puede elegir eliminar las impurezas mediante una resina aniónica adecuada (resina aniónica de base fuerte o de base débil) seguida de una resina catiónica de ácido débil para ajustar el pH a neutro. La sal también puede ser eliminada por diafiltración, nanofiltración, electrodiálisis, diálisis u otros procedimientos.

[0020] El material eluido limpiado puede concentrarse más por nanofiltración y/o evaporación y se seca preferiblemente para formar un producto blanco.

[0021] Se pueden utilizar cualquier resina catiónica y aniónica fuerte y débil adecuada en el proceso de la presente invención. El primer catión de ácido débil es preferiblemente un catión de ácido débil poliacrílico, preferiblemente el suministrado con el nombre comercial IMAC HP336. Cationes débiles poliacrílicos alternativos incluyen PWC11 suministrado por Rohm and Haas, DOWEX MAC-3
 5 suministrado por Dow o Diaion WK10 y WK40 suministrado por Mitsubishi. El primer anión débil es preferiblemente un anión de base débil acrílico, preferiblemente el suministrado con el nombre comercial FPA55. Aniones de base débil acrílicos alternativos incluyen Diaion WA10, WA20, WA21J y WA30 suministrados por Mitsubishi o A847 o PFA847 suministrados por Purolite. También se pueden usar resinas aniónicas de base débil estirénicas. También se pueden utilizar resinas aniónicas de
 10 base fuerte, pero esto podría dar lugar al aumento del uso de regenerantes para la limpieza posterior de las resinas.

[0022] El segundo catión de ácido fuerte es preferiblemente un catión de ácido fuerte estireno-DVB, más preferiblemente el que se vende con el nombre comercial HP1110. Cationes de ácidos fuertes alternativos incluyen FPC23 suministrado por Rohm and Haas, DOWEX 88, DOWEX 88 MB, DOWEX
 15 Monosphere 88 suministrado por Dow, Diaion SK1B, SK104, SK110, SK112, SK116, PK208, PK212, PK216, PK220, PK228 o HPK25 suministrado por Mitsubishi o PFC100 o PFC150 suministrado por Purolite.

[0023] El segundo anión de base débil es preferiblemente un anión de base débil estireno-DVB, más preferiblemente siendo el vendido con el nombre comercial FPA51. Aniones de base débil alternativos
 20 incluyen DOWEX 66, DOWEX Monosphere 66 o DOWEX Monosphere 77 suministrado por Dow o Diaion WA10, WA20, WA21 y WA30 J suministrados por Mitsubishi.

[0024] Las resinas aniónicas de base débil pueden ser sustituidos con resinas aniónicas fuertes, aunque se prefieren resinas aniónicas de base débil. Dichas resinas incluyen, sin carácter limitativo, FPA42 , FPA90 de Rohm & Haas; A600, A400E, A420 y A850 de Purolite y Dowex A, Dowex 1,
 25 Dowex 22, Dowex SAR de Dow Chemical Co.

[0025] En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un proceso para la preparación de un producto lácteo enriquecido con un componente deseado de suero de leche, cuyo procedimiento comprende la preparación de un componente deseado de suero de leche de acuerdo con el proceso de un primer aspecto de la presente invención. El componente deseado de suero de
 30 leche puede ser opcionalmente lactosa 3'sialil, y el proceso puede ser opcionalmente para la preparación de un producto lácteo enriquecido con 3'sialil lactosa. Opcionalmente, el producto lácteo es un producto de leche, pero podría ser utilizado cualquier producto lácteo a ser enriquecido con un componente deseado de suero de leche. El producto lácteo enriquecido con un componente deseado de suero de leche se puede preparar al poner en contacto el componente deseado eluido con un flujo
 35 de producto lácteo. El componente deseado eluido y el flujo de producto lácteo pueden ser cada uno independientemente un líquido o un sólido. Opcionalmente, el componente deseado eluido y el flujo de producto lácteo son cada uno independientemente un líquido. Opcionalmente, el proceso para la preparación de un producto lácteo comprende la etapa adicional de concentrar el producto lácteo. La etapa de concentración puede involucrar cualquiera, o una combinación de nanofiltración,
 40 evaporación y secado del producto lácteo.

[0026] La invención se describirá ahora más concretamente, a modo de ejemplo solamente, con los

ejemplos adjuntos, en los cuales el Ejemplo 1 describe el aislamiento directo de 3'-sialil lactosa del permeado de suero de leche UF usando el procedimiento de la presente invención; el Ejemplo 2 describe el aislamiento de 3'-sialil lactosa del permeado de suero de leche UF concentrado usando el proceso de la presente invención en el cual el permeado de suero de leche UF se concentra primero mediante nanofiltración; y los Ejemplos 3 a 7 describen el aislamiento de sialil lactosa del permeado de suero de leche UF concentrado usando el procedimiento de la presente invención en el cual el permeado de suero de leche UF se concentra primero mediante nanofiltración seguida de cromatografía por permeación iónica, y con referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra las etapas implicadas en el proceso del Ejemplo 1;

La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra las etapas implicadas en el proceso del Ejemplo 2; y

La Figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra las etapas implicadas en el proceso del Ejemplo 3.

Ejemplo 1

[0027] La primera etapa de la presente invención para todos los ejemplos es una etapa de ultrafiltración (UF) por la cual se elimina una proporción importante de la proteína en el suero de leche del queso. La etapa de UF puede incluir la producción de concentrado de proteína de suero de leche (WPC, por sus siglas en inglés) 35, 60, 80 y 85. Un subproducto de este proceso es el permeado de suero de leche en ~4 al 7% de sólidos que se compone de aproximadamente del 90 al 95% de lactosa, del 1 al 5% de proteína (NPN y proteína verdadera), del 4 al 7% de ceniza y del 0,05 al 0,25% de 3'-sialil lactosa (3-SL). En ciertas épocas del año, la proporción de 3-SL puede ser significativamente más alta, hasta tanto como 0,5% por peso de los sólidos.

[0028] En el presente ejemplo, el permeado UF se puso en contacto directamente con una serie de resinas y el 3-SL finalmente se recogió en una resina aniónica. Las etapas se resumen en la Figura 1 de los dibujos adjuntos.

[0029] 1035 litros de flujo de permeado de suero de leche UF en ~5% de sólidos y ~60 ppm de 3'-SL se pusieron en contacto directamente con las siguientes resinas en serie al ser bombeados a través de ellas en columnas de 200 mm de diámetro:

- 15 litros de IMAC HP336 (un catión de ácido débil poliacrílico);
- 22 litros de FPA55 (un anión de base débil acrílico);
- 23 litros de HP1110 (catión de ácido fuerte estireno-DVB);
- 23 litros de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB);
- 17 litros de HP1110 (catión de ácido fuerte estireno-DVB);
- 17 litros de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB).

[0030] La 3-SL se recogió en la última resina aniónica, que fue eluida con 28 litros de 4,4% de hidróxido de amonio seguido de 50 litros de agua desmineralizada. El material de elución contenía aproximadamente del 6 al 15% en peso de 3'-sialil lactosa. A continuación, éste se puso en contacto con 30 litros de IMAC HP336 (un catión de ácido débil poliacrílico), seguido de 23 litros de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB) para eliminar el exceso de amoníaco y para ajustar el pH del

producto final a entre 7 y 9,5.

[0031] El producto resultante contenía una forma pura muy alta de 3'-sialil lactosa en la región del 12 al 50 % en peso de sólidos. El contenido de cenizas en el material acabado fue de <10%, el resto siendo proteínas. Aproximadamente del 20 al 50% del valor de proteína fue de NPN. Por lo tanto, en este ejemplo el permeado se pone en contacto directamente mediante el bombeo de 3-SL con una tasa de flujo fija a través de las siguientes resinas en serie: catión - anión - catión - anión - catión - anión. Esto permite la eliminación de moléculas no deseadas que interfieren, lo que luego da lugar a que 3-SL se recoja específicamente en la última columna de resina aniónica. Específicamente, la siguiente secuencia dio los mejores resultados con una recuperación máxima de 3-SL:

- catión de ácido débil (WAC, por sus siglas en inglés) - anión de base débil (WBA) - catión de ácido fuerte (SAC) - anión de base débil (WBA) - catión de ácido fuerte (SAC) - anión de base débil (AMB).

[0032] 3-SL se recoge en la última columna de anión junto con una pequeña cantidad de proteína (proteína verdadera + NPN) y algunos aniones. 3-SL se eluye a continuación usando hidróxido de amonio (también se puede emplear con éxito el cloruro de amonio, potasio, sodio, magnesio o calcio o combinaciones de los mismos).

[0033] En caso de que la caída de presión a través de los lechos fuese muy grande, se puede usar un depósito de separación en una posición adecuada para recoger el permeado tratado, que es bombeado entonces a través del resto de las columnas.

[0034] La 3-SL eluida fue limpiada después en una resina catiónica seguida de una resina aniónica para eliminar las sales. La sal puede, alternativamente, ser eliminada por diafiltración, NF, electrodiálisis, diálisis u otros procedimientos. Una ventaja añadida de la utilización de tecnología de resina es la eliminación de ciertos NPN no deseados también.

[0035] El material resultante tiene un contenido de 3-SL de entre 7-42% por peso de 3-SL, que puede ser concentrado por NF y/o evaporación y finalmente es secado para producir un producto de color blanco con una concentración muy alta de 3-SL.

[0036] La absorción de 3'-SL a partir del permeado en la resina aniónica de base débil final estuvo cerca del 100% con elución siendo del 85 al 100% de toda la 3'-SL adsorbida. En el proceso anterior es posible que un experto en la técnica de tecnología de resina de intercambio iónico pueda considerar alterar la concentración o el volumen o ambos de hidróxido de amonio para optimizar la elución y de ese modo obtener la pureza más alta con o sin comprometer el rendimiento. También se puede elegir eluir algunos de los materiales no deseados de la resina aniónica como una etapa preliminar mediante al usar una menor concentración de hidróxido de amonio y luego eluir con una concentración óptima de hidróxido de amonio para obtener la pureza y el rendimiento más altos de 3-SL.

Ejemplo 2

[0037] El permeado de suero de leche se sometió otra vez a una etapa de ultrafiltración (UF) como en el Ejemplo 1 anterior. El permeado UF a continuación fue concentrado hasta un contenido en sólidos del 30% usando nanofiltración (NF) y el material concentrado se puso en contacto con una serie de resinas de acuerdo con la presente invención, en la cual 3-SL finalmente fue recogida en una resina aniónica. Las etapas se resumen en la Figura 2 de los dibujos adjuntos.

[0038] El permeado UF fue concentrado mediante nanofiltración para producir un retentado de NF en ~15 al 25% de sólidos y que contiene entre 186 y 208 ppm de 3'-sialil lactosa. 2.500 ml del retentado de NF anterior se pasaron/bombearon a través de las siguientes resinas en serie al ser bombeados a través de ellas en columnas de un diámetro de 25 mm:

- 5 • 120 ml de IMAC HP336 (un catión de ácido débil poliacrílico);
- 180 ml de FPA55 (un anión de base débil acrílico),
- 180 ml de HP1110 (catión de ácido fuerte estireno-DVB);
- 180 ml de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB);
- 100 ml de IMAC HP336 (un catión de ácido débil poliacrílico);
- 10 • 150 ml de FPA55 (un anión de base débil acrílico);
- 150 ml de HP1110 (catión de ácido fuerte estireno-DVB);
- 150 ml de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB).

[0039] De nuevo, se utilizó con éxito un depósito de separación después de la cuarta columna para evitar problemas de caída de presión.

- 15 **[0040]** La 3-SL fue recogida en la última resina aniónica, que se eluyó con 180 ml de 4,4% de hidróxido de amonio seguido por 300 ml de agua desmineralizada. El material de elución contenía aproximadamente del 6 al 18% en peso de 3'-sialil lactosa. A continuación, esta se puso en contacto con 250 ml de IMAC HP336 (un catión de ácido débil poliacrílico) seguido por 120 ml de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB) para eliminar el exceso de amoníaco y para ajustar el pH del
- 20 producto final a entre 7 y 9,5. El producto resultante contenía una forma pura muy alta de 3'-sialil lactosa en la región del 20 al 50 % en peso de sólidos. El contenido de cenizas del material acabado era <10%, siendo el resto proteínas. Aproximadamente del 20 al 50% del valor proteico era NPN.

Ejemplo 3

- 25 **[0041]** El permeado de suero fue de nuevo sometido a una etapa de ultrafiltración como se ha descrito en relación con los Ejemplos 1 y 2. El permeado UF se concentró a continuación a un contenido de sólidos del 20 al 30% (preferiblemente 25%) mediante nanofiltración y el permeado se sometió entonces a cromatografía por permeación iónica (de otro modo conocida como cromatografía de exclusión iónica) a una elevada temperatura de entre 50 y 80°C. El material de elución se dividió en dos fracciones: una fracción inicial conteniendo las moléculas cargadas que incluían una
- 30 proporción importante de la proteína (incluyendo NPN), minerales y 3-SL seguido de una fracción conteniendo las moléculas sin carga tales como lactosa. La fracción inicial conteniendo la 3-SL se puso entonces en contacto con una serie de resinas como se muestra en el Ejemplo 1 y la 3-SL finalmente fue recogida en una resina aniónica. Los pasos se resumen en la Figura 3 de los dibujos adjuntos.

- 35 **[0042]** En más detalle, la etapa de permeación iónica involucrada utilizando una columna cromatográfica conteniendo 650 litros de CR1310K para dar una altura de lecho de 3 metros calibrado con agua de proceso. Una temperatura de funcionamiento de entre +4 y 75°C se evaluó, con los mejores resultados habiendo sido obtenidos a las temperaturas elevadas. El permeado UF se concentró mediante nanofiltración para producir un retentado de NF en ~22 al 25% de sólidos y
- 40 conteniendo entre 118 y 304 ppm (220 ppm de media) de 3'-sialil lactosa. A continuación, este

material se sometió a un proceso de exclusión iónica mediante el bombeo del material nanofiltrado a través del lecho de resina de exclusión iónica seguido de agua. Para obtener resultados óptimos, se mantuvo el ratio de carga resina a retentado de NF por ciclo en 1:0,1 seguido de 0,9 bv de agua (donde 1 bv = volumen total de resina, es decir = 650 litros). Se evaluó una velocidad de flujo constante de entre 0,3 a 0,86 bv/hora. La variación en la velocidad de flujo no tuvo ninguna influencia significativa sobre la naturaleza del cromatograma obtenido. El material de elución se dividió en dos fracciones: una fracción inicial conteniendo 3'-sialil lactosa junto con minerales y proteína (incluyendo NPN) seguida de una segunda fracción conteniendo una forma casi pura de lactosa. El volumen neto de la fracción de 3'-sialil lactosa enriquecido obtenido por ciclo fue de 135 litros. El contenido de sólidos varió entre 0,5 a 1 % y el nivel de 3'-sialil lactosa fue 0,5 a 1,3% en peso de sólidos. La recuperación de 3'-sialil lactosa estuvo en el rango del 80 al 100% con una recuperación media del 85% en más de 95 ciclos de operación.

[0043] 950 litros de la fracción enriquecida con 3-SL se pasaron entonces a través de las siguientes resinas en serie:

- 15 litros de IMAC HP336 (un catión de ácido débil poliacrílico);
- 22 litros de FPA55 (un anión de débil base acrílico),
- 17 litros de HP1110 (catión de ácido fuerte estireno-DVB);
- 17 litros de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB) .

[0044] La 3-SL fue recogida en la última resina aniónica, que fue eluída con 28 litros de 4,4% amonio seguido de 50 litros de agua desmineralizada. El material de elución contenía aproximadamente del 6 al 15% en peso de 3'-sialil lactosa. A continuación, ésta se puso en contacto con 30 litros de IMAC HP336 (un catión de ácido débil poliacrílico) seguido de 23 litros de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB) para eliminar el exceso de amoníaco y para ajustar el pH del producto final a entre 7 y 9,5. El producto resultante con un contenido de sólidos de entre 0,3 a 1% contenía 3'-sialil lactosa en la región de 0,5 a 3% en peso de sólidos. El contenido de cenizas en el material acabado era <10 %, el contenido de lactosa era del 30 al 50%, siendo el resto proteínas. Aproximadamente del 20 al 50% del valor proteico era NPN.

Ejemplo 4.

[0045] En un proceso alternativo, 1.600 litros de una fracción enriquecida con 3-SL producida por nanofiltración y una etapa de permeación iónica tal como se describe en el Ejemplo 3 se pusieron en contacto con las siguientes resinas en serie al ser bombeados a través de ellas en columnas de 200 mm de diámetro:

- 15 litros de IMAC HP336 (un catión de ácido débil poliacrílico);
- 22 litros de FPA55 (un anión débil base de acrílico);
- 17 litros de HP1110 (catión de ácido fuerte estireno-DVB);
- 17 litros de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB);
- 17 litros de HP1110 (catión de ácido fuerte estireno-DVB);
- 17 litros de FPA51 (anión de base débil estireno -DVB) .

[0046] La 3-SL fue recogida en la última resina aniónica, que fue eluída con 28 litros de 4,4% hidróxido de amonio seguido de 50 litros de agua desmineralizada. El material de elución contenía

aproximadamente 6 al 15% en peso de 3'-sialil lactosa. A continuación, ésta se puso en contacto con 30 litros de IMAC HP336 (un catión de ácido débil poliacrílico) seguido de 23 litros de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB) para eliminar el exceso de amoníaco y para ajustar el pH del producto final a entre 7 y 9,5. El producto resultante contenía una concentración muy alta de 3'-sialil lactosa purificada en la región del 20 al 70% en peso de sólidos. El contenido de cenizas en el material acabado era <10%, siendo el resto proteínas. Aproximadamente 15 al 30% del valor de proteico era NPN.

Ejemplo 5

[0047] El permeado de suero de leche fue de nuevo sometido a un paso de ultrafiltración como se ha descrito en relación con los Ejemplos 1 y 2. El permeado UF se puso en contacto con una serie de resinas en dos fases de acuerdo con la presente invención, donde la 3-SL finalmente fue recogida en una resina aniónica. Los pasos son una variante de los resumidos en la Figura 1 de los dibujos adjuntos.

[0048] Se utilizó permeado de UF en 2 a 6% de sólidos y conteniendo entre 30 y 80 ppm de 3'-sialil lactosa.

[0049] En la Fase I del presente ejemplo, una cantidad de la fracción retentado de UF anterior se pasó/bombéo a través de las siguientes resinas en serie al ser bombeado a través de ellas en columnas con un diámetro de 200 mm:

- 15 litros de IMAC HP336 (un catión de ácido débil poliacrílico);
- 22 litros de FPA55 (un anión de base débil acrílico);
- 17 litros de HP1110 (catión de ácido fuerte estireno-DVB);
- 17 litros de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB);

[0050] El punto de corte de la carga de retentado UF se determinó como el punto en el cual la conductividad del efluente alcanzó aproximadamente de 300 a 400 microSiemens. Tres repeticiones sucesivas del procedimiento anterior dieron lugar a cargas retentado de 610 litros, 650 litros y 600 litros, respectivamente. El producto de interés (retentado) conteniendo 3'-SL desmineralizada habiendo estado a través de las cuatro columnas de resina anteriores, se desvió con 100 litros de agua de proceso, produciendo 684 litros, 724 litros y 674 litros del producto de Fase I de en las tres repeticiones sucesivas descritas anteriormente.

[0051] En la Fase II del presente ejemplo 800 litros del material de elución de la Fase I se pusieron entonces en contacto con 17 litros de HP1110 (catión de ácido fuerte estireno-DVB) seguido de 17 litros de FPA51 (anión de base débil estireno-DVB). El producto de interés conteniendo 3'-SL purificada se recogió en la última resina y se eluyó de ella con 20 litros de 1% cloruro de potasio seguido de 45 litros de agua de proceso.

[0052] En dos repeticiones de la Fase II, se obtuvo un total de 120 litros de producto eluido. A continuación, éste se sometió a nanofiltración seguido de diafiltración para producir 7,3 litros de retentado. Este producto contenía 27% en peso de sólidos de 3'-sialil lactosa.

[0053] Después de la liofilización, 2,96 litros del producto nanofiltrado y diafiltrado produjeron 420g de producto seco conteniendo 30% en peso de sólidos de 3'-SL. El contenido de ceniza en el material final fue del 16%, la proteína fue del 30% con el 2% del valor de la proteína siendo NPN.

Ejemplo 6

[0054] En otro proceso, la fracción enriquecida con 3-SL del paso de exclusión iónica descrito en el Ejemplo 3 se concentró hasta un contenido de sólidos del ~12% mediante nanofiltración. 15 ml de este material se cromatografiaron en 150 ml de Sephadex G25 para producir un producto acabado que contenía 3-SL en 4 al 6% en peso de sólidos. La recuperación fue ~98%. Se puede utilizar cualquier resina de desalación a granel tal como Toyopearl HW40 o Bio-Gel P-4 o Bio-Gel P-6 o cualesquier otra tal resina de desalación incluyendo Sephadex G 10 que estén disponibles en el mercado.

[0055] Como se ilustra en los ejemplos anteriores, el proceso de aislamiento de la presente invención en esencia implica hacer pasar el material permeado (el permeado UF sin tratar en el en el caso del Ejemplo 1, permeado nanofiltrado en el caso del Ejemplo 2 o material de exclusión iónica en el caso de los Ejemplos 3 a 6) a través de las siguientes resinas:

- resina catiónica de ácido débil (por ejemplo, Imac HP 336 o WK 40)
- resina aniónica débil o fuerte (por ejemplo, FPA55 o FPA42)
- resina catiónica de ácido fuerte (por ejemplo, Imac HP 1110 o FPC23)
- resina aniónica débil o fuerte (por ejemplo, FPA51, FPA55 o FPA42)

[0056] Esto permite la limpieza del material permeado. Después de la limpieza, la 3-SL puede ser absorbida en una resina de intercambio aniónico adecuada (en un modo de realización preferido, ésta era FPA51, ya que permite la mejor elución). El material se puede hacer pasar a través de una resina catiónica antes de la resina aniónica para permitir que toda la 3'-SL sea recogida en la resina aniónica. El uso de un anión de base fuerte con o sin un catión en frente también daría lugar a la 3'-SL siendo recogida en la resina, pero requeriría una mayor fuerza de los medios de elución. La elución de la resina se logró usando hidróxido de amonio, cloruro de calcio, NaCl y KCl o una combinación de los mismos.

Ejemplo 7

[0057] En otra serie de experimentos llevados a cabo a lo largo de las mismas líneas que en el Ejemplo 5, la fracción de elución de 3'-sialil lactosa se dividió en varias fracciones y una fracción de 3'-sialil lactosa 100% pura se obtuvo con un rendimiento reducido del 19-20%.

[0058] La fracción se puede liofilizar o deshidratar en spray directamente después de la concentración de los sólidos mediante un método apropiado.

[0059] El principio entorno al proceso de la presente invención consiste en la eliminación de moléculas cargadas negativamente no deseadas y/o que interfieren a un nivel que es suficiente para permitir que la 3-SL se una preferentemente a la resina aniónica (FPA51). Las resinas catiónicas son esenciales para permitir que la 3-SL sea cargada negativamente, antes de que pueda ser recogida por la resina aniónica.

[0060] Se puede haber esperado que la 3-SL sería recogida en cualquier resina aniónica después de la eliminación de las moléculas cargadas positivamente mediante cualquier resina catiónica fuerte. Pero sorprendentemente este no parece ser el caso, lo que sugiere que el vínculo entre 3'-SL y la resina es muy débil, que es afectado fácilmente por la presencia de cualquiera de las especies aniónicas competidoras. Es fundamental contar con todas las cuatro resinas de la serie mencionada anteriormente. En el caso cuando se utiliza permeado nanofiltrado como el material de partida (véase el Ejemplo 2), es muy deseable tener las cuatro resinas mencionadas anteriormente más estas cuatro

resinas de nuevo para que la 3-SL sea recogida en la última columna que contiene una resina aniónica débil.

[0061] 3-SL en su forma pura y natural existe como una molécula muy débil cargada negativamente.

La resina aniónica sólo puede recoger la 3-SL si se han eliminado casi todas las especies catiónicas que excluyen iones H⁺ y se ha eliminado la mayor parte de los aniones competidores. El proceso de la presente invención tiene como objetivo obtener una forma purificada de 3-SL variando en concentración de cualquiera entre 3 a 60% en peso de sólidos. Esto no es sencillo de lograr. El primer catión de ácido débil elimina gran parte de los cationes divalentes tales como Ca y Mg, y en menor medida Na y K, que están presentes en el suero de leche, así como ciertos aminoácidos y proteínas. La segunda resina, un anión de base débil, recoge algunas de las moléculas cargadas negativamente, tales como cloruros, fosfatos y sulfatos y hasta cierto punto citratos, lactatos y aminoácidos cargados negativamente y proteínas. La tercera resina es una resina catiónica fuerte que a continuación recoge casi todos los cationes restantes. La cuarta resina es un anión de base débil que recoge cualquier aniones restantes preferentemente por encima de la 3-SL. Con el fin de garantizar que 3-SL mínima sea recogida por esta columna, es preferible sobreprocesar de modo que cualquiera de la 3-SL recogida por la cuarta resina sea extraída selectivamente por los aniones competidores. Una vez que se ha limpiado el material (o desmineralizado >90%), se puede enviar a través de un catión de ácido fuerte para limpiar casi todos los cationes restantes permitiendo de este modo que la 3-SL exista en su estado natural o libre (más probable que sea "H-3-SL"). El anión débil en su forma -OH reaccionará entonces fácilmente con "H-3-SL" (H reacciona con OH para formar agua) y la ahora cargada negativamente 3-SL es recogida fácilmente por la resina aniónica débil.

[0062] Es evidente a partir de lo anterior, que antes de poner en contacto el material que contiene 3'-SL con las resinas, se puede optar por reducir la carga iónica sobre las resinas con los procedimientos/técnicas seleccionados del grupo de diálisis, electrodiálisis, diafiltración, etc. Esto mejoraría la capacidad de carga de las resinas, pero no altera el principio subyacente de aislar el oligosacárido de interés.

[0063] En todos los casos, la última resina es un anión de base débil, aunque técnicamente un anión de base fuerte funcionaría igualmente bien en la recogida de la 3-SL. Sin embargo, la elución de un anión de base fuerte es más difícil en comparación con el anión de base débil. Se prefiere una sal de cloruro tal como KCl, NaCl o CaCl₂ o una combinación de las mismas. Otras sales de volátiles incluirían hidróxido de amonio, acetato de amonio, formiato de amonio, ácido fórmico, ácido acético, etc.

[0064] Después de la elución de la columna de aniones, el material se pone en contacto con un catión de ácido débil para eliminar el amoníaco y/o Ca si CaCl₂ o K si KCl se utiliza seguido de un anión débil tal como FPA51 para ajustar el pH de nuevo al punto neutro y si KCl o CaCl₂ se utiliza entonces para eliminar cloruros en exceso. Alternativamente, el material puede ser nanofiltrado y/o diafiltrado para lograr las especificaciones objetivo deseadas en el producto.

[0065] Un experto en la técnica también puede emplear la técnica de tomar secciones de las fracciones de elución que contienen la 3'-sialil lactosa para obtener de ese modo 100% de pureza del producto deseado, aunque con un rendimiento comprometido.

[0066] Aunque los ejemplos que ilustran el proceso se ha restringido a 3'-SL, hay varios componentes

ES 2 428 852 T3

de interés tales como proteínas, aminoácidos y otros oligosacáridos en el permeado, que pueden ser aislados con éxito utilizando el mismo principio operativo descrito en esta especificación. Además, al variar de la concentración de las soluciones de elución cualquier experto en la técnica de tecnología de resina puede aumentar la pureza al fraccionar de forma selectiva el material adsorbido a partir de la resina.

5

10

15

20

25

30

35

Reivindicaciones

1. Un proceso para el aislamiento y/o purificación de un componente deseado de suero de leche a partir de suero de leche comprendiendo las etapas siguientes:

5 poner en contacto el suero de leche con al menos una serie de resinas de intercambio iónico, dicha serie comprendiendo una primera resina catiónica, una primera resina aniónica, una segunda resina catiónica y una segunda resina aniónica para desmineralizar el suero de leche;

10 poner en contacto este suero de leche desmineralizado con dos resinas de intercambio iónico adicionales o finales comprendiendo una resina catiónica de ácido fuerte seguida de una resina aniónica de base débil donde el componente deseado se recoge en la resina aniónica;

y

eluir el componente deseado de la resina aniónica.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 también comprendiendo el sometimiento del suero de leche a un paso de ultrafiltración antes del contacto con las resinas de intercambio iónico para proporcionar un concentrado de proteína y un permeado de suero de leche en el cual el permeado de suero de leche entra en contacto con las resinas de intercambio iónico.

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el cual el componente deseado es 3'sialil lactosa.

4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, la reivindicación 2 o la reivindicación 3 en el cual la primera resina catiónica es una resina catiónica de ácido débil y la segunda resina catiónica es una resina catiónica de ácido fuerte.

5. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el cual las primera y segunda resinas catiónicas son resinas catiónicas de ácido débil.

6. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual el suero de leche se mantiene en un pH de al menos 5,5.

7. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual una o ambas de las primera y segunda resinas aniónicas comprenden una resina aniónica de base débil.

8. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, también comprendiendo la concentración del suero de leche o permeado de suero de leche mediante nanofiltración antes del contacto del material concentrado con la al menos una serie de resinas.

9. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 también comprendiendo el aumento de la concentración relativa del componente deseado en el suero de leche o permeado de suero de leche no concentrado o concentrado por medio de cromatografía por permeación iónica para proporcionar una primera fracción que contiene moléculas cargadas incluyendo el componente deseado seguida de una segunda fracción, en la cual la primera fracción se pone en contacto con la al menos una serie de resinas para obtener una fracción enriquecida desmineralizada.

10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9 en el cual la fracción enriquecida se pone en contacto con al menos una serie de resinas para adsorber el componente deseado sobre una resina aniónica adicional.

11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 también comprendiendo la realización de la cromatografía por permeación iónica a una temperatura elevada de al menos 50°C.

12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual las resinas se seleccionan de una o una combinación de las siguientes resinas:

- 5 la primera resina catión es un catión de ácido débil poliacrílico;
 la primera resina aniónica es un anión de base débil acrílico;
 la segunda resina catiónica es un catión de ácido fuerte estireno-DVB;
 la segunda resina aniónica es un anión de base débil estireno-DVB o acrílico;
 la tercera resina catiónica es un catión de ácido fuerte estireno-DVB; y
- 10 la tercera resina aniónica es un anión de base débil estireno-DVB.

13. Un proceso para preparar un producto lácteo, cuyo proceso comprende la preparación de un componente deseado de suero de leche de acuerdo con el proceso reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13, también comprendiendo el paso de poner en
15 contacto el componente deseado del paso de eluir con un flujo de producto lácteo.

FIG. 1

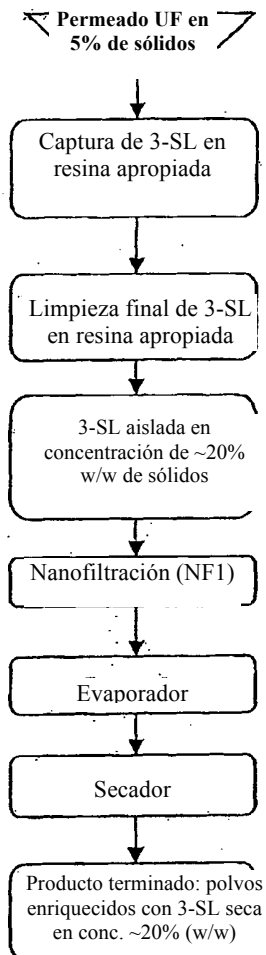


FIG. 2

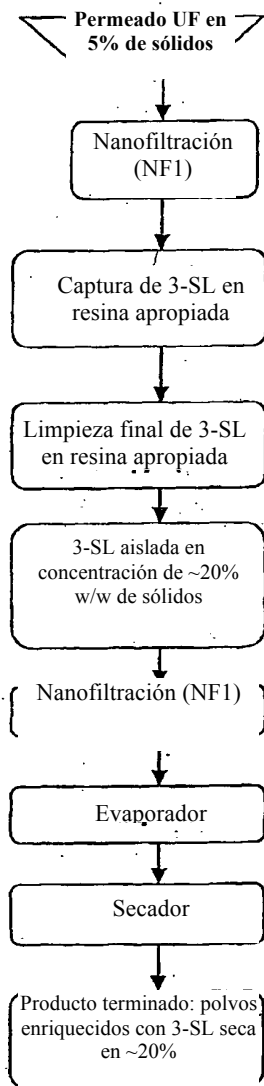


FIG. 3

