

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 414**

51 Int. Cl.:

C07H 1/08	(2006.01)
C07H 3/06	(2006.01)
A23L 33/21	(2006.01)
A23L 5/00	(2006.01)
A23L 33/00	(2006.01)
A23L 29/30	(2006.01)
A61K 31/702	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2014 PCT/EP2014/079212**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15106943**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2014 E 14827224 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 3131912**

54 Título: **Procedimiento para la purificación eficiente de oligosacáridos de la leche humana (HMO) neutros provenientes de fermentación microbiana**

30 Prioridad:

20.01.2014 EP 14151737

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2020

73 Titular/es:

**JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH (100.0%)
Maarweg 32
53619 Rheinbreitbach, DE**

72 Inventor/es:

JENNEWEIN, STEFAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 779 414 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

Procedimiento para la purificación eficiente de oligosacáridos de la leche humana (HMO) neutros provenientes de fermentación microbiana.

5 La presente solicitud describe un procedimiento simple para la purificación de oligosacáridos de la leche humana (HMO) neutros producidos por fermentación microbiana. El procedimiento utiliza una combinación de un tratamiento con intercambiador de iones catiónico, un tratamiento con intercambiador de iones aniónico y una etapa de nanofiltración y/o electrodiálisis, que permite la purificación eficiente de grandes cantidades de HMO neutros de gran pureza. Contrariamente a la purificación actualmente utilizada en la producción fermentativa de HMO neutros, el procedimiento presentado permite proporcionar HMO sin la necesidad de una separación cromatográfica. Los HMO así purificados se pueden obtener en forma sólida secando por atomización, como material cristalino o como concentrado filtrado estéril. Los HMO proporcionados están libres de proteínas y material recombinante que se origina de las cepas microbianas recombinantes utilizadas y por lo tanto se adapta muy bien para uso en aplicaciones de alimentos, alimentos médicos y pienso (p. ej., alimento para mascotas).

15 La leche humana representa una mezcla compleja de carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas, minerales y oligoelementos. La fracción más predominante por mucho está representada por carbohidratos, que pueden además dividirse en lactosa y oligosacáridos más complejos. Mientras que la lactosa se usa como fuente de energía, los oligosacáridos complejos no son metabolizados por el bebé. La fracción de oligosacáridos complejos representa hasta 1/10 de la fracción de carbohidratos totales y probablemente consiste en más de 150 oligosacáridos diferentes. La aparición y concentración de estos oligosacáridos complejos son específicas de seres humanos y por lo tanto no se pueden hallar en grandes cantidades en la leche de otros mamíferos, como por ejemplo animales de granja domesticados.

20 Se conoce desde hace mucho tiempo la existencia de estos oligosacáridos complejos en la leche humana y las funciones fisiológicas de estos oligosacáridos se sometieron a investigaciones medicinales durante muchas décadas (Gura, T. (2014) Nature's first functional food. *Science* 345(6198) 747-749). Para algunos de los oligosacáridos de la leche humana más abundantes, ya se han identificado funciones específicas (Bode, L. (2012) Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22(9), 1147-1162.; Bode L, Jantscher-Krenn E (2012) Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv Nutr* 3(3) 383S-391S; Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero ML, Meinen-Derr JK, Farkas T, Chaturvedi P, Pickering LK, Newburg DS (2004) Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr* 145(3) 297-303).

25 El suministro limitado y las dificultades de obtener fracciones puras de oligosacáridos de la leche humana individuales conducen al desarrollo de rutas químicas a estas moléculas complejas. No obstante, se comprobó que la síntesis de oligosacáridos de la leche humana por síntesis química, síntesis enzimática o fermentación es complicada. Por lo menos hasta hoy no se han podido proveer cantidades a gran escala, ni calidades suficientes para aplicaciones alimentarias. En este sentido, particularmente las rutas sintéticas químicas hacia los oligosacáridos de la leche humana (p. ej., 2'-fucosil-lactosa; ver el documento WO 2010/115935 A1) implican varias sustancias químicas nocivas, que representan riesgo de contaminar el producto final.

30 Debido a los problemas implicados en la síntesis química de los oligosacáridos de la leche humana, se desarrollaron varios planteamientos fermentativos (Miyazaki et al., (2010) *Methods in Enzymol.* 480, 511-524; Murata et al., (1999) *Glycoconj. J.* 16, 189-195; Baumgartner, F. et al., (2013) *Microb. Cell Fact.* 12, 40; Lee et al., (2012) *Microb. Cell Fact.* 11, 48; US 7,521,212 B1 o Albermann et al., (2001) *Carbohydr. Res.* 334(2) p 97-103). No obstante, estos métodos producen mezclas complejas de oligosacáridos, es decir, el producto deseado se contamina con material de partida como lactosa, intermedios biosintéticos y sustratos tales como monosacáridos y polipéptidos individuales.

35 Los procedimientos actuales de la técnica para purificar productos de oligosacáridos individuales de estas mezclas complejas son técnicamente complejos y también costosos para aplicaciones alimentarias. Para la purificación de lactosa o sacarosa de disacáridos de mezclas complejas como suero o melazas, se han desarrollado procesos a escala industrial que implican múltiples cristalizaciones. La desventaja de dichos métodos es que se elaboran y solamente conducen a bajas producciones.

40 Para la purificación de oligosacáridos complejos de fermentación microbiana, como ciertos oligosacáridos de la leche humana, la cromatografía de filtración en gel es el método de elección hasta el momento. La desventaja de la cromatografía de filtración en gel es que no puede ampliarse eficientemente a escala y es inadecuada para operación continua. Por lo tanto, la cromatografía de filtración en gel no es económica y hace que sea imposible proporcionar ciertos oligosacáridos de la leche humana – como 2'-fucosil-lactosa o lacto-*N*-tetraosa – en cantidades razonables y de calidad para usarlos en aplicaciones para alimento humano u otras aplicaciones tales como pienso para animales (p. ej., alimento para mascotas). La aplicación como pienso animal o alimento para mascotas es interesante en el sentido que otros mamíferos contienen los mismos oligosacáridos complejos neutros o similares en su leche que los humanos (p. ej., 2'-fucosil-lactosa también se encuentra en la leche de perros, cerdos, chimpancés) (Castanys-Munzo,

E., Martin, J.M & Prieto, P.A. (2013) 2'-fucosyllactose: an abundant, genetically determined soluble glycan present in human milk. *Nutr. Rev.* 71(12) 773-789).

5 Otros problemas se presentan con el uso de cepas recombinantes (cepas bacterianas o de levadura recombinantes) en la fermentación microbiana, que resulta en la contaminación del producto de fermentación con material recombinante. No obstante, la contaminación con ADN recombinante o proteínas no es aceptable para los reguladores y consumidores hoy en día. Los límites de detección, en particular para moléculas de ADN recombinantes, son muy bajos. En caso de que se use detección basada en qPCR, que actualmente se considera la regla de oro para detección, se puede detectar incluso una sola molécula de ADN. Las proteínas, a su vez, conllevan riesgo de reacciones alérgicas y por ende deben retirarse en forma eficiente del producto de oligosacárido deseado.

10 La electrodiálisis (ED) representa una técnica que combina diálisis y electrólisis y se puede utilizar para la separación o concentración de iones en disoluciones basadas en su electromigración selectiva a través de membranas semipermeables. Las primeras aplicaciones industriales de electrodiálisis datan de principios de los años sesenta con la desmineralización del suero del queso para uso en fórmula para bebés. Otras aplicaciones desarrolladas de electrodiálisis incluyen el ajuste del pH de bebidas tales como vinos, mosto de uva, jugo de manzana y jugo de naranja.

15 La desalinación de aguas salobres para la producción de agua bebible y la desmineralización del suero de la leche para producción de alimentos para bebés representan el área de aplicación más grande en la actualidad.

El principio básico de la electrodiálisis consiste en una celda electrolítica compuesta por un par de electrodos sumergidos en un electrolito para conducción de iones conectados a un generador de corriente directa. El electrodo conectado al polo positivo del generador de la corriente directa es el ánodo, y el electrodo conectado al polo negativo se denomina cátodo. La disolución de electrolitos luego soporta el flujo de corriente, que resulta del movimiento de los iones de carga negativos y positivos hacia el ánodo y el cátodo respectivamente. Las membranas empleadas en la electrodiálisis son esencialmente láminas de resinas de intercambio iónico porosas, que aedeudan grupos de carga negativa o positiva y por lo tanto se denominan membrana catiónica o aniónica, respectivamente. Las membranas del intercambiador iónico usualmente están hechas de poliestireno que porta un grupo funcional adecuado (como ácido sulfónico o un grupo amonio cuaternario para membranas catiónicas o aniónicas, respectivamente) reticulado con divinilbenceno. Como electrolito, se pueden emplear cloruro de sodio o acetato de sodio, propionato de sodio, etc. La pila de electrodiálisis se ensambla luego en forma tal que las membranas aniónicas y catiónicas son paralelas como en una prensa de filtro entre dos bloques de electrodos y la corriente que se somete a reducción de iones se separa bien de la corriente que se somete a enriquecimiento iónico (las dos disoluciones también se denominan diluido (que se somete a reducción iónica) y concentrado (que se somete a enriquecimiento iónico). El núcleo del proceso de electrodiálisis es la pila de membranas, que consiste en varias membranas de intercambio aniónico y catiónico separadas por espaciadores, e instalada entre dos electrodos. Aplicando una corriente eléctrica directa, los aniones y los cationes migrarán por las membranas hacia los electrodos, generando una corriente de diluido (desalado) y de concentrado.

35 En general, el tamaño del poro de las membranas empleadas es bastante pequeño con el fin de prevenir la difusión del producto del diluido en la corriente de concentrado, impulsada a menudo por las grandes diferencias de concentración entre las dos corrientes. Después de la separación de la biomasa, las proteínas, y en particular las moléculas de ADN recombinantes (en el tamaño de genomas enteros), deben quitarse cuantitativamente del producto deseado. Si es posible, la electrodiálisis de dichas moléculas grandes (en comparación con el tamaño molecular de los HMO) sería bastante extensa y definitivamente acompañada con pérdidas importantes del producto deseado del diluido hacia el concentrado.

45 La diafiltración es un proceso que implica la adición de agua fresca a una disolución con el fin de "enjuagar" o quitar los componentes permeables de membrana. Por consiguiente, la diafiltración se puede usar para separar componentes en base a su tamaño molecular usando membranas apropiadas, en donde una o más especies son retenidas en forma eficiente y otras especies son permeables a las membranas. En particular, la diafiltración que usa una membrana de nanofiltración es eficaz para la separación de compuestos de bajo peso molecular de las sales. En general, las membranas de nanofiltración poseen un valor de corte de peso molecular en el intervalo de 150 a 300 Daltons. Hoy, la nanofiltración (NF) se utiliza ampliamente en la industria láctea para la concentración y desmineralización del suero. La nanofiltración ya se ha empleado para el enriquecimiento de una fracción de oligosacáridos de la leche humana. En este planteamiento, la nanofiltración se ha utilizado en combinación con la degradación enzimática de lactosa para separar la fracción de HMO de la lactosa de la leche (Sarney D.B, Hale, C., Frankel, G & Vulfson, E.N. (2000) A novel approach to the recovery of biological active oligosaccharides from milk using a combination of enzymatic treatment and nanofiltration. *Biotechnol. Bioeng* 69, 461-467.

55 En el procedimiento desarrollado para la purificación eficiente de oligosacáridos de grado alimentario de fermentación microbiana, se emplea la nanofiltración con el fin de concentrar el producto deseado y también de eliminar las sales permeables a la membrana.

El documento WO 2012/112777 A2 describe composiciones y métodos para modificar bacterias a fin de producir oligosacáridos fucosilados, y su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones.

El documento EP 2 479 263 A1 describe usos y métodos para usar la alfa-1,2-fucosiltransferasa a fin de generar productos fucosilados, como 2'-fucosil-lactosa.

Comenzando por esta técnica anterior, el problema técnico es la provisión de un nuevo procedimiento para proporcionar HMO neutros en grandes cantidades, alta pureza y excelentes rendimientos.

- 5 El problema técnico se resuelve mediante el procedimiento según la reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes describen realizaciones ventajosas.

La presente invención da a conocer un procedimiento para purificación de oligosacáridos de la leche humana (HMO) neutros en un modo en partidas o en un modo continuo de un caldo de fermentación obtenido por fermentación microbiana, en donde se da a conocer una disolución purificada que comprende un HMO neutro con una pureza de \geq 80 %. El caldo de fermentación contiene HMO neutro, componentes del medio y contaminantes. La pureza del HMO neutro en un caldo de fermentación es <80 %.

Durante el procedimiento, el caldo de fermentación se aplica a las siguientes etapas de purificación:

- i) Separación de la biomasa del caldo de fermentación,
ii) Tratamiento con el intercambiador de iones catiónico para la eliminación de material positivamente cargado,
15 iii) Tratamiento con el intercambiador de iones aniónico para la eliminación de material negativamente cargado,
iv) Etapa de nanofiltración (que comprende o que consiste en concentración y/o diafiltración del HMO neutro) y/o etapa de electrodiálisis (especialmente para la eliminación de sales y otros compuestos de bajo peso molecular).

Los contaminantes presentes en el caldo de fermentación libre de células son por ejemplo otros oligosacáridos que los HMO neutros deseados, como sales monovalentes y divalentes, aminoácidos, polipéptidos, proteínas, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, etc. El HMO neutro deseado se puede obtener con una pureza de ≥ 80 % en la disolución purificada.

El solicitante ha descubierto que con el procedimiento de purificación inventivo se puede obtener una purificación eficiente de los HMO neutros de la fermentación microbiana, que suministra el HMO con una pureza adecuada para aplicaciones de alimento y pienso. Asimismo, el procedimiento es muy rentable porque no se necesita una etapa de separación cromatográfica. Además, se ha descubierto que la pureza de ≥ 80 % se alcanza si se realiza una etapa de electrodiálisis o una etapa de nanofiltración en la etapa iv) o si se realizan ambas etapas sucesivamente.

Una ventaja del procedimiento de acuerdo con la presente invención es que los HMO neutros deseados se obtienen libres de ADN y proteínas de la cepa de fermentación recombinante utilizada. Especialmente, la implementación de un tratamiento con el intercambiador de iones catiónicos (etapa ii) permite la eliminación de material positivamente cargado como p. ej., proteínas positivamente cargadas. En consecuencia, el método inventivo proporciona un HMO que comprende menos contaminante positivamente cargado en comparación con los esquemas de purificación convencionales conocidos en la técnica anterior que no implementan un tratamiento con el intercambiador catiónico. Se descubrió también que después de pasar el caldo de fermentación separado de la biomasa (preferiblemente por ultrafiltración) sobre un intercambiador de iones catiónicos (en forma de protones), la disolución obtenida fue estable y se pudo almacenar a temperatura ambiente o bajo refrigeración durante varias semanas. A su vez, el HMO neutro obtenido está libre de material recombinante, según lo juzgado por PCR cuantitativa con hasta 50 ciclos de ampliación. Además, el producto obtenido del procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza por pocas cantidades o ausencia de proteínas.

Asimismo, la purificación de HMO neutros de acuerdo con la invención es altamente eficaz incluso con rendimientos desconocidos de >70 % (opcionalmente $> 75\%$) del HMO purificado (determinados a partir del medio de fermentación libre de células al concentrado de HMO).

Por lo tanto, se da a conocer un procedimiento híbrido que comprende las etapas de separación de biomasa, intercambiador iónico y una etapa de nanofiltración y/o electrodiálisis, y preferiblemente que comprende un tratamiento de carbono activado, para la provisión eficiente de HMO neutros de alta pureza libres de material genético recombinante, endotoxinas y proteínas de los procesos de fermentación, que usan cepas de fermentación recombinantes. Con el procedimiento de acuerdo con la invención, se pueden proporcionar grandes cantidades de oligosacáridos de la leche humana de alta calidad en un modo muy conveniente y económico.

El HMO neutro se puede purificar a partir de un caldo de fermentación obtenido por fermentación microbiana usando un microorganismo recombinante, preferiblemente una bacteria o levadura, más preferiblemente un microorganismo recombinante desarrollado en un medio químicamente definido. Opcionalmente, la biomasa separada en la etapa i) se recicla a la fermentación microbiana.

En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la pureza del HMO neutro en el caldo de fermentación es $\leq 70\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 40\%$ y/o la disolución purificada contiene el HMO neutro con una pureza de $\geq 85\%$, preferiblemente de $\geq 90\%$.

5 En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el rendimiento del HMO neutro es $> 70\%$ (opcionalmente $> 75\%$) y/o la disolución purificada está libre de ADN, proteínas y/o material genético recombinante.

10 De acuerdo con la invención, el HMO neutro se selecciona del grupo que consiste en 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, 2',3-difucosil-lactosa, lacto-*N*-triosa II, lacto-*N*-tetraosa, lacto-*N*-neotetraosa, lacto-*N*-fucopentaosa I, lacto-*N*-neofucopentaosa, lacto-*N*-fucopentaosa II, lacto-*N*-fucopentaosa III, lacto-*N*-fucopentaosa V, lacto-*N*-neofucopentaosa V, lacto-*N*-difucohexaosa I, lacto-*N*-difucohexaosa II, 6'-galactosil-lactosa, 3'-galactosil-lactosa, lacto-*N*-hexaosa y lacto-*N*-neohexaosa.

En una realización particularmente preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el HMO neutro es 2'-fucosil-lactosa.

En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la separación de la biomasa del caldo de fermentación se logra mediante

15 a) ultrafiltración, preferiblemente separando la biomasa y los materiales > 500 kDa, más preferiblemente > 150 kDa; y/o

b) filtración a través de un filtro de flujo cruzado, preferiblemente con un valor de corte ≤ 100 kDa, más preferiblemente con un valor de corte ≤ 10 kDa, incluso más preferiblemente un valor de corte ≤ 5 kDa;

en donde la etapa a) preferiblemente se implementa antes de la etapa b).

20 En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, por lo menos una de las etapas de purificación ii) a v) del procedimiento inventivo se repite por lo menos durante el procedimiento.

25 En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el caldo de fermentación se aplica por lo menos una vez a un tratamiento de carbono activado después de por lo menos una de las etapas de purificación i) a iv) para la adsorción de material que aporta color y oligosacáridos más grandes al carbono activado. Al aplicar el caldo de fermentación a esta etapa de purificación adicional, el material que aporta color y oligosacáridos más grandes se puede eliminar del caldo de fermentación.

El procedimiento inventivo se puede caracterizar porque

a) después de por lo menos una de las etapas de purificación i) a iv); o

30 b) después de por lo menos un tratamiento de carbono activado para la adsorción de material que aporta color y oligosacáridos más grandes a carbono activado; o

c) antes de una etapa de concentración que se implementa después de por lo menos una de las etapas de purificación i) a iv);

35 la disolución que comprende el oligosacárido de la leche humana neutro se diafiltra y/o concentra. Preferiblemente, dicha disolución se diafiltra y/o concentra con una membrana de nanofiltración, más preferiblemente con una membrana de nanofiltración que tiene un límite de exclusión de tamaño de ≤ 20 Å. Lo más preferiblemente, la disolución se diafiltra hasta alcanzar una conductividad de ≤ 15 mS/cm, preferiblemente ≤ 10 mS/cm, más preferiblemente ≤ 5 mS/cm.

40 Se descubrió que la diafiltración que usa nanofiltración es eficiente como pretratamiento para eliminar cantidades significativas de contaminantes antes de un tratamiento de electrodiálisis de la disolución que contiene HMO. Además, se descubrió que la nanofiltración es eficiente en la eliminación de contaminantes de bajo peso molecular después de una etapa de ultrafiltración, en donde dicha eliminación es beneficiosa para concentrar y desmineralizar la disolución de HMO antes del tratamiento con el intercambiador iónico. El uso de membranas de nanofiltración para concentración y diafiltración en la purificación de oligosacáridos de la leche humana resulta en menor energía y coste de procesamiento, además de una mejor calidad del producto, debido a exposición térmica reducida, lo que lleva a reacciones Maillard y reacciones aldol.

45 En una etapa antes de la etapa i), un tratamiento de glucosidasa, preferiblemente un tratamiento de β -glucosidasa, se puede realizar con el caldo de fermentación, en donde dicho tratamiento preferiblemente se realiza

a) añadiendo una cepa de un microorganismo capaz de expresar una o más enzimas de glucosidasa adecuadas para la degradación de intermedios indeseados, sustratos y/o productos secundarios de oligosacáridos; y/o

ES 2 779 414 T3

- b) usando una cepa de fermentación que expresa una o más enzimas glucosidasas, preferiblemente añadiendo un inductor al caldo de fermentación y/o cambiando la temperatura del caldo de fermentación; y/o
- c) añadiendo una o más glucosidasas, preferiblemente por lo menos una β -glucosidasa, al caldo de fermentación, como una enzima bruta o como una enzima purificada.
- 5 En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, el caldo de fermentación se concentra después de por lo menos una de las etapas de purificación i) a iv), preferiblemente después de la etapa de purificación iv), usando evaporación al vacío u ósmosis inversa o nanofiltración (p. ej., nanofiltración con una membrana de nanofiltración que tienen un límite de exclusión de tamaño de ≤ 20 Å)
- a) hasta una concentración de ≥ 100 g/l, preferiblemente ≥ 200 g/l, más preferiblemente ≥ 300 g/l; y/o
- 10 b) a una temperatura de $< 80^\circ\text{C}$, preferiblemente $< 50^\circ\text{C}$, más preferiblemente 20°C a 50°C , incluso más preferiblemente 30°C a 45°C , lo más preferiblemente 35°C a 45°C (concretamente relevante para evaporación al vacío u ósmosis inversa); y/o
- c) a una temperatura de $< 80^\circ\text{C}$, preferiblemente $< 50^\circ\text{C}$, más preferiblemente 4°C a 40°C (concretamente relevante para nanofiltración).
- 15 En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la disolución purificada se filtra en forma estéril y/o se somete a eliminación de endotoxinas, preferiblemente por filtración de la disolución purificada a través de un filtro de 3 kDa.
- En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la disolución que contiene HMO neutro se somete a electrodiálisis con el fin de eliminar mejor los materiales cargados tales como sales mono y divalentes.
- 20 En otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la disolución purificada se concentra hasta una concentración de $> 1,5$ M y se enfría hasta una temperatura $< 25^\circ$, más preferiblemente $< 8^\circ\text{C}$, para obtener material cristalino del HMO neutro.
- De acuerdo con la invención, la disolución purificada se seca por atomización, particularmente se seca por atomización a una concentración del HMO neutro de 20-60 (p/v), preferiblemente 30-50 (p/v), más preferiblemente 35-45 (p/v), una temperatura de la boquilla de 110 - 150°C , preferiblemente 120 - 140°C , más preferiblemente 125 - 135°C y/o una temperatura de salida de 60 - 80°C , preferiblemente 65 - 70°C .
- 25 Asimismo, la presente invención incluye un oligosacárido de la leche humana (HMO) neutro que se puede producir con el procedimiento de acuerdo con la invención.
- 30 En una realización preferida de la invención, el HMO está presente en un concentrado filtrado estéril, p. e., concentrado estéril que contienen el producto de HMO neutro con una concentración de $\geq 30\%$ (p/v), más preferiblemente $\geq 40\%$ (p/v).
- En otra realización preferida de la invención, el HMO se seca por atomización o cristaliza.
- En otra realización preferida de la invención, el HMO se selecciona del grupo que consiste en 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, 2',3-difucosil-lactosa, lacto-N-triosa II, lacto-N-tetraosa, lacto-N-neotetraosa, lacto-N-fucopentaosa I, lacto-N-neofucopentaosa, lacto-N-fucopentaosa II, lacto-N-fucopentaosa III, lacto-N-fucopentaosa V, lacto-N-neofucopentaosa V, lacto-N-difucohexaosa I, lacto-N-difucohexaosa II, 6'-galactosil-lactosa, 3'-galactosil-lactosa, lacto-N-hexaosa y lacto-N-neohexaosa.
- 35 En una realización particularmente preferida de la invención, el HMO es 2'-fucosil-lactosa.
- En otra realización preferida de la invención, el HMO
- 40 a) tiene una conductividad de menos de 1 mSi/cm en una disolución de 300 g/l;
- b) está libre de material de ADN recombinante, opcionalmente libre de todo ADN; y/o
- c) está libre de proteínas derivadas del microorganismo recombinante, opcionalmente libre de cualquier proteína.
- Otra realización preferida de la invención se refiere a un HMO para uso en medicina, preferiblemente para uso en la profilaxis o la terapia de un trastorno gastrointestinal.
- 45 Asimismo, la presente invención incluye el uso de un HMO de acuerdo con la invención como aditivo en alimento, preferiblemente como aditivo en alimento humano y/o alimento para mascotas, más preferiblemente como aditivo en alimento para bebés humanos.

El sujeto de acuerdo con la solicitud se explicará en más detalle con referencia a las figuras y ejemplos subsiguientes sin desear restringir a dicho sujeto a las realizaciones especiales.

La Fig. 1 muestra un esquema de una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención para la purificación de 2'-fucosil-lactosa proveniente de un caldo de fermentación que comprende las etapas de: ultrafiltración, tratamiento con intercambiador de iones catiónico y aniónico, tratamiento con carbono activado, nanofiltración, electrodiálisis y concentración.

La Fig. 2 muestra un esquema de otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención para la purificación de 2'-fucosil-lactosa de un caldo de fermentación que comprende las etapas de: ultrafiltración, nanofiltración, tratamiento con intercambiador iónico catiónico y aniónico, tratamiento con carbono activado, electrodiálisis y concentración.

La Fig. 3 muestra un esquema de otra realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención para la purificación de 2'-fucosil-lactosa de un caldo de fermentación que comprende las etapas de: ultrafiltración, tratamiento con intercambiador de iones catiónico y aniónico, nanofiltración, tratamiento con carbono activado, electrodiálisis y concentración.

Ejemplo 1: Purificación de 2'-fucosil-lactosa proveniente de fermentación que usa una cepa de producción microbiana recombinante I.

Se desarrolló una fermentación de un lote de alimentación de 2'-fucosil-lactosa que emplea una cepa de E coli que sintetiza 2'-fucosil-lactosa recombinante (*E. coli* BL21(DE3) $\Delta lacZ$), que contiene una 2'-fucosiltransferasa de integración genómica, codificada por el gen *wbgL* (ver EP 111151 571.4), y que tiene una copia adicional del *E. coli lacY*, *monB*, *manC*, *gmd* y *fcl*, todo bajo control de un promotor de tetraciclina constitutivo fuerte, que contiene un operón gal funcional que comprende los genes *galM*, *galK*, *galT* y *galE*, en un medio de sal definido. El medio de sal definido comprendía 7 g l⁻¹ NH₄H₃PO₄, 7 g l⁻¹ K₂HPO₄, 2 g l⁻¹ KOH, 0,37g l⁻¹ ácido cítrico, 1 ml l⁻¹ antiespuma (Struktol J673, Schill + Seilacher), 1 mM CaCl₂, 4 mM MgSO₄, oligoelementos y 2% glicerol como fuente de carbono.

Los oligoelementos consistieron en 0,101 g l⁻¹ ácido nitriltriacético, pH 6,5, 0,056 g l⁻¹ citrato de amonio y hierro, 0,01 g l⁻¹ MnCl₂ x 4 H₂O, 0,002 g l⁻¹ CoCl₂ x 6 H₂O, 0,001g l⁻¹ CuCl₂ x 2 H₂O, 0,002 g l⁻¹ ácido bórico, 0,009 g l⁻¹ ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,001 g l⁻¹ Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,002 g l⁻¹ Na₂SeO₃, 0,002 g l⁻¹ NiSO₄ x 6 H₂O.

La alimentación de glicerol consistió en glicerol 800 g l⁻¹, MgSO₄ 2,64 g l⁻¹ y disolución de oligoelementos 4 ml l⁻¹. Para la formación de 2'-fucosil-lactosa, se empleó una alimentación de lactosa de 216 g l⁻¹. El pH se controló usando una disolución de amoníaco (25% v/v). La fermentación de la partida de alimentación se cultivó a 30°C bajo aireación y agitación constantes durante 90 horas. 90 horas después del comienzo de la fermentación, la mayor parte de la lactosa añadida se convirtió en 2'-fucosil-lactosa. Con el fin de eliminar la lactosa todavía presente en el sobrenadante de alimentación, se añadió una segunda cepa bacteriana al recipiente de fermentación 90 horas después del comienzo de la fermentación.

La segunda cepa bacteriana añadida fue genéticamente idéntica a la primera cepa bacteriana empleada, difiriendo, no obstante, solamente en la expresión de una beta-galactosidasa de genoma integrado. La incubación de la cepa bacteriana secundaria añadida resultó en la desaparición de la lactosa residual al cabo de 5 horas. Se añadieron aproximadamente 10 ml de cultivo iniciador de la segunda cepa bacteriana que expresa beta-galactosidasa por 1l de caldo de fermentación.

La biomasa luego se separó del medio de fermentación por ultrafiltración, usando un filtro de flujo cruzado con un valor de corte de 10 kDa (Microdyn Nardir).

Se obtuvo aproximadamente 1 m³ de medio de fermentación libre de células que contenía 42 g/l 2'-fucosil-lactosa. El medio de fermentación libre de células se pasó luego por un intercambiador iónico catiónico fuerte (Lewatit S 6368 A (Lanxess) en forma de H⁺, el tamaño del lecho del intercambiador iónico fue 100 l), con el fin de eliminar contaminantes cargados positivos. La disolución obtenida se fijó luego a pH 7 por adición de disolución de hidróxido sódico 2 M.

La disolución se pasó luego (sin demora) por una columna de un intercambiador de iones aniónico (el volumen del lecho del intercambiador iónico fue 100 l). El intercambiador de iones aniónico fuerte Lewatit S 2568 (Lanxess) estuvo en forma de cloruro (Cl⁻). La disolución obtenida se neutralizó nuevamente hasta pH 7. La disolución así obtenida se diafiltró luego usando una membrana de nanofiltración Alfa-Laval NF99HF y seis volúmenes de agua desionizada estéril. La disolución se concentró usando la membrana de nanofiltración en donde se obtuvo una disolución de 2'-fucosil-lactosa de 200 g/l y una conductividad de 7 mS/cm.

La disolución de 2'-fucosil-lactosa concentrada se trató entonces con carbono activado con el fin de eliminar el material que aporta color, tal como los productos de reacción Maillard y los productos de reacción de aldol. Como carbono activado, se usaron 20 g Norit GAC EN por l de disolución concentrada de 2'-fucosil-lactosa, produciendo una disolución significativamente decolorada.

ES 2 779 414 T3

- La disolución obtenida de 2'-fucosil-lactosa concentrada luego se electrodiálizó hasta 0,3 mS/cm usando un aparato de electrodiálisis PC-Cell BED 1-3 (PC-Cell, Heusweiler, Alemania) equipado con una pila de membranas PC-Cell E200. Dicha pila contenía las siguientes membranas: membrana de intercambio catiónico CEM: PC SK y la membrana de intercambio aniónico AEM:PcAcid60 que tienen un límite de exclusión de tamaño de 60 Da. Se usó una disolución de ácido sulfámico 0,025 M (ácido amidosulfónico) como un electrolito en el procedimiento de ED.
- Luego la disolución obtenida se concentró al vacío a 40°C para obtener una disolución al 45% de 2'-fucosil-lactosa. La disolución concentrada se trató luego nuevamente con los intercambiadores iónicos, Lewatit S 6368 A (Lanxess) en forma de Na⁺ (el volumen del lecho del intercambiador iónico utilizado fue 10 l) y después de la neutralización con el intercambiador de iones aniónico Lewatit S 2568 (Lanxess) en forma de Cl⁻ (el volumen del lecho del intercambiador de iones empleado fue 10 l).
- La disolución de 2'-fucosil-lactosa obtenida se trató luego con carbono activado (Norit DX1 Ultra). Para 1 l de una disolución al 45% de 2'-fucosil-lactosa, se emplearon 30 g de carbono activado.
- La disolución se sometió luego nuevamente a electrodiálisis hasta que se obtuvo una conductividad de menos de 0,3 mSi/cm.
- Posteriormente, la disolución se sometió a filtración estéril pasando la disolución por un filtro de 3 kDa (módulo de la fibra hueca de ultrafiltración Pall Microza SEP-2013, Pall Corporation, Dreieich).
- Parte de la disolución de 2'-fucosil-lactosa obtenida se secó por atomización luego para análisis.
- Para los registros de espectros de RMN, se disolvió el producto secado por atomización en sulfóxido de hexadeuterodimetilo (DMSO-d₆). Para los análisis de protones y ¹³C se observaron los siguientes desplazamientos químicos característicos:
- ¹H NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ 6,63 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H), 6,28 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 5,21 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 5,19 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 5,01 (d, *J* = 2,2, 2H), 4,92 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 4,89 (dd, *J* = 4,6, 1,3 Hz, 2H), 4,78 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 4,74 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 4,63 (m, 6H), 4,53 (t, d, *J* = 5,5, 1H), 4,46 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 4,44 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 4,38 - 4,26 (m, 5H), 4,23 (d, *J* = 0,9, 1H), 4,05 (d, *J* = 0,9, 1H), 4,00 (quin, *J* = 3,3, 1H), 3,68 - 3,60 (m, 7H), 3,59 - 3,50 (m, 13H), 3,50 - 3,37 (m, 6H), 3,24 (dt, *J* = 8,8, 2,2 Hz, 1H), 3,14 (m, 2H), 2,96 (td, *J* = 8,4, 4,7 Hz, 1H), 1,04 (d, *J* = 6,1 Hz, 3H), 1,03 (d, *J* = 6,1 Hz, 3H).
- ¹³C NMR** (126 MHz, DMSO-d₆) δ 100,99, 100,85, 100,35, 100,25, 96,59, 92,02, 78,13, 77,78, 77,16, 77,01, 75,27, 75,05, 74,67, 73,70, 72,33, 71,62, 71,56, 70,91, 69,90, 69,64, 68,75, 68,16, 66,33, 60,17, 59,82, 59,67, 16,37, 16,36.
- Se halló que los desplazamientos químicos fueron concordantes con la estructura de 2'-fucosil-lactosa.
- Usando este protocolo se pudo obtener un concentrado de a 45% 2'-fucosil-lactosa con una pureza de 94,5 % (determinada por análisis de HPLC). Los contaminantes principales fueron 3'-fucosil-lactosa (1,8%), difucosil-lactosa (2,9%), y lactosa (0,3%).
- El rendimiento de la purificación fue de aproximadamente 70%.
- Cabe destacar que no se pudo determinar material recombinante en 10 g de material congelado usando 50 ciclos de qPCR. La cantidad de proteína del material obtenido se determinó como < 50 µg/g de material liofilizado utilizando un ensayo nano-Bradford (Roth, Karlsruhe, Alemania). La cantidad total de ceniza se determinó con 0,19%. La concentración de metales pesados (arsénico cadmio, plomo y mercurio) estuvo debajo de 0,1 µg/g material. Los niveles de endotoxina se determinaron como < 0,005 EU/ml concentrado de 2'-fucosil-lactosa.
- Ejemplo 2: Purificación de 2'-fucosil-lactosa proveniente de fermentación usando una cepa de producción microbiana recombinante II.
- Se filtró una fermentación microbiana de 1m³ que comprendía 2'-fucosil-lactosa en una concentración de 47 g/l a través de un filtro de flujo cruzado con un valor de corte de 100 kDa (Microdyn Nadir) para obtener un medio de fermentación libre de células.
- Como medio de fermentación, se empleó el siguiente medio: componentes del medio principales: glicerol 30 g/l, NH₄H₂PO₄ 7 g/l, K₂HPO₄ 7 g/l, citrato 0,3 g/l, KOH 2 g/l, MgSO₄·7H₂O 2 g/l; oligoelementos: CaCl₂·6H₂O 20 mg/l, ácido nitriltriácético 101 mg/l, citrato de amonio y hierro 56 mg/l, MnCl₂·4H₂O 9,8 mg/l, CoCl₂·6H₂O 1,6 mg/l, CuCl₂·2H₂O 1 mg/l, H₃BO₃ 1,6 mg/l, ZnSO₄·7H₂O 9 mg/l, Na₂MoO₄·2H₂O 1,2 mg/l, Na₂SeO₃ 1,2 mg/l; sustancias de alimentación: glicerol y lactosa.
- El medio de fermentación libre de células se pasó luego por un intercambiador de iones catiónico (Lewatit S 6368 A (Lanxess) en forma de H⁺ (el volumen del lecho del intercambiador de iones fue 100 l) con el fin de eliminar contaminantes cargados positivos. La disolución obtenida se fijó a pH 7 por adición de una disolución de hidróxido

ES 2 779 414 T3

5 sódico 2 M. La disolución se pasó entonces, sin demoras, por una columna de un intercambiador de iones aniónico (el volumen del lecho del intercambiador de iones fue 100 l) que comprendía el intercambiador de iones aniónico fuerte Lewatit S 2568 (Lanxess) en forma de cloruro (Cl^-). La disolución obtenida se neutralizó nuevamente hasta pH 7. La disolución así obtenida se diafiltró luego (usando 10 volúmenes de agua desionizada estéril) y se concentró usando una membrana de nanofiltración (Alfa-Laval NF99HF) para obtener una disolución de 2'-fucosil-lactosa de 200 g/l y una conductividad de aprox. 7 mSi/cm.

10 La disolución de 2'-fucosil-lactosa concentrada se trató luego con carbono activado, usando 20 g Norit GAC EN por l de disolución concentrada de 2'-fucosil-lactosa. A la disolución de 2'-fucosil-lactosa filtrada se le añadieron 40 g/l de carbono activado Norit DX1 Ultra. La disolución se expuso entonces al carbono activado a 4°C durante aproximadamente 18 h. Después de 18 h, el carbono activado se eliminó de la disolución de 2'-fucosil-lactosa por filtración.

15 La disolución después se electrodializó hasta una conductividad de < 0,3 mS/cm usando un aparato de electrodiálisis PC-Cell BED 1-3 (PC-Cell, Heusweiler, Alemania) equipado con una pila de membranas PC-Cell E200. Dicha pila contenía las siguientes membranas: membrana de intercambio catiónico CEM: PC SK y membrana de intercambio iónico AEM:PcAcid60 que tienen un límite de exclusión de tamaño de 60 Da. Se usó una disolución de ácido sulfámico 0,025 M (ácido amidosulfónico) como un electrolito en el procedimiento de ED.

20 La disolución obtenida se concentró luego hasta obtener una disolución al 40% de 2'-fucosil-lactosa. La disolución de 2'-fucosil-lactosa obtenida se pasó luego por Lewatit S 2568 (Lanxess) en la forma de Cl^- (volumen del lecho 10 l) y se trató con carbono activado (Norit DX1 Ultra) a 8°C durante 18h. La disolución se sometió después a filtración estéril pasándola por un filtro de 3 kDa (módulo de la fibra hueca de ultrafiltración Pall Microza SEP-2013, Pall Corporation, Dreieich) y se secó por atomización usando un secador por atomización NUBILOSA LTC-GMP (NUBILOSA, Konstanz, Alemania).

25 Usando este protocolo, se pudo obtener 2'-fucosil-lactosa con una pureza de 94 % (determinada por análisis HPLC). Los contaminantes principales fueron 3'-fucosil-lactosa (1,8 %), difucosil-lactosa (3,2 %) y lactosa (0,2 %). El rendimiento de la purificación fue aproximadamente 70 %.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de oligosacáridos de la leche humana (HMO) neutros o en un modo continuo provenientes de un caldo de fermentación obtenido por fermentación microbiana, en donde el caldo de fermentación comprende un HMO neutro, biomasa, componentes y contaminantes del medio, en donde el HMO neutro se selecciona del grupo que consiste en 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, 2',3-difucosil-lactosa, lacto-*N*-triosa II, lacto-*N*-tetraosa, lacto-*N*-neotetraosa, lacto-*N*-fucopentaosa I, lacto-*N*-neofucopentaosa, lacto-*N*-fucopentaosa II, lacto-*N*-fucopentaosa III, lacto-*N*-fucopentaosa V, lacto-*N*-neofucopentaosa V, lacto-*N*-difucohexaosa I, lacto-*N*-difucohexaosa II, 6'-galactosil-lactosa, 3'-galactosil-lactosa, lacto-*N*-hexaosa y lacto-*N*-neohexaosa, y en donde la pureza del HMO neutro en el caldo de fermentación es < 80 %,
- 5
- 10 caracterizado porque el caldo de fermentación se aplica a las siguientes etapas de purificación:
- i) Separación de la biomasa del caldo de fermentación,
 - ii) Tratamiento con un intercambiador de iones catiónico para la eliminación de material positivamente cargado,
 - iii) Tratamiento con un intercambiador de iones aniónico para la eliminación de material positivamente cargado,
 - iv) Etapa de nanofiltración y/o etapa de electrodiálisis,
- 15 en donde se provee una disolución purificada que comprende el HMO neutro con una pureza de $\geq 80\%$ y en donde la disolución purificada se seca por atomización.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el HMO neutro se purifica de un caldo de fermentación obtenido por fermentación microbiana usando un microorganismo recombinante, preferiblemente bacteria o levadura, más preferiblemente un microorganismo recombinante desarrollado en un medio químicamente definido, en donde la biomasa separada en la etapa i) se recicla opcionalmente a la fermentación microbiana.
- 20
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la pureza del HMO neutro en el caldo de fermentación es $\leq 70\%$, $\leq 60\%$, $\leq 50\%$, $\leq 40\%$ y/o la disolución purificada contiene el HMO neutro con una pureza de $\geq 85\%$, preferiblemente de $\geq 90\%$.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el rendimiento del HMO neutro es $> 75\%$ y/o la disolución purificada está libre de ADN, proteínas y/o material genético recombinante.
- 25
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la separación de la biomasa del caldo de fermentación se obtiene por
- a) ultrafiltración, preferiblemente separando la biomasa y los materiales > 500 kDa, más preferiblemente > 150 kDa; y/o
 - 30 b) filtración a través de un filtro de flujo cruzado, preferiblemente con un valor de corte ≤ 100 kDa, más preferiblemente con un valor de corte ≤ 10 kDa, incluso más preferiblemente un valor de corte ≤ 5 kDa;
- en donde la etapa a) preferiblemente se implementa antes de la etapa b).
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque por lo menos una de las etapas de purificación ii) a iv) se repite por lo menos una vez durante el procedimiento.
- 35
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el caldo de fermentación se aplica por lo menos una vez a un tratamiento de carbono activado después de por lo menos una de las etapas de purificación i) a iv) para la adsorción de material que aporta color y oligosacáridos más grandes a carbono activado.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque
- a) después de por lo menos una de las etapas de purificación i) a iv); o
 - 40 b) después de por lo menos un tratamiento con carbono activado para la adsorción de material que otorga color y oligosacáridos más grandes a carbono activado; o
 - c) antes de una etapa de concentración que se implementa después de por lo menos una de las etapas de purificación i) a iv);
- 45 la disolución que comprende el oligosacárido de la leche humana neutro se diafiltra y/o concentra, preferiblemente con una membrana de nanofiltración, más preferiblemente con una membrana de nanofiltración que tiene un límite de exclusión de tamaño de < 20 Å, en donde lo más preferiblemente la disolución se diafiltra hasta alcanzar una conductividad de ≤ 15 mS/cm, preferiblemente ≤ 10 mS/cm, más preferiblemente ≤ 5 mS/cm.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque en una etapa antes de la etapa i), se realiza un tratamiento de glucosidasa, preferiblemente un tratamiento de β -glucosidasa, con el caldo de fermentación, en donde dicho tratamiento se realiza
- 5 a) añadiendo la cepa de un microorganismo capaz de expresar una o más enzimas glucosidasa adecuadas para la degradación de intermedios indeseados, sustratos y/o productos secundarios de oligosacáridos; y/o
- b) usando una cepa de fermentación que expresa una o más enzimas glucosidasa, preferiblemente añadiendo un inductor al caldo de fermentación y/o cambiando la temperatura del caldo de fermentación; y/o
- c) añadiendo una o más glucosidasas, preferiblemente por lo menos β -glucosidasa, al caldo de fermentación como una enzima bruta o como una enzima purificada.
- 10 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el caldo de fermentación se concentra después de por lo menos una de las etapas de purificación i) a iv), preferiblemente después de la etapa de purificación iv), usando evaporación al vacío u ósmosis inversa o nanofiltración
- a) hasta una concentración de ≥ 100 g/l, preferiblemente ≥ 200 g/l, más preferiblemente ≥ 300 g/l; y/o
- 15 b) a una temperatura de $< 80^\circ\text{C}$, preferiblemente $< 50^\circ\text{C}$, más preferiblemente 20°C a 50°C , incluso más preferiblemente 30°C a 45°C , durante la evaporación al vacío o la ósmosis inversa; y/o
- c) a una temperatura de $< 80^\circ\text{C}$, preferiblemente $< 50^\circ\text{C}$, más preferiblemente 20°C a 50°C .
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la disolución purificada se filtra en forma estéril y/o se somete a eliminación de endotoxinas, preferiblemente por filtración de la disolución purificada a través de un filtro de 3 kDa.
- 20 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la disolución purificada se concentra hasta una concentración de $> 1,5$ M y se enfría hasta una temperatura $< 25^\circ$, más preferiblemente $< 8^\circ\text{C}$, para obtener material cristalino del HMO neutro.
- 25 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la disolución purificada se seca por atomización a una concentración del HMO neutro de 20-60 (p/v), preferiblemente 30-50 (p/v), más preferiblemente 35-45 (p/v), una temperatura de la boquilla de 110 - 150°C , preferiblemente 120 - 140°C , más preferiblemente 125 - 135°C y/o una temperatura de salida de 60 - 80°C , preferiblemente 65 - 70°C .

Figura 1

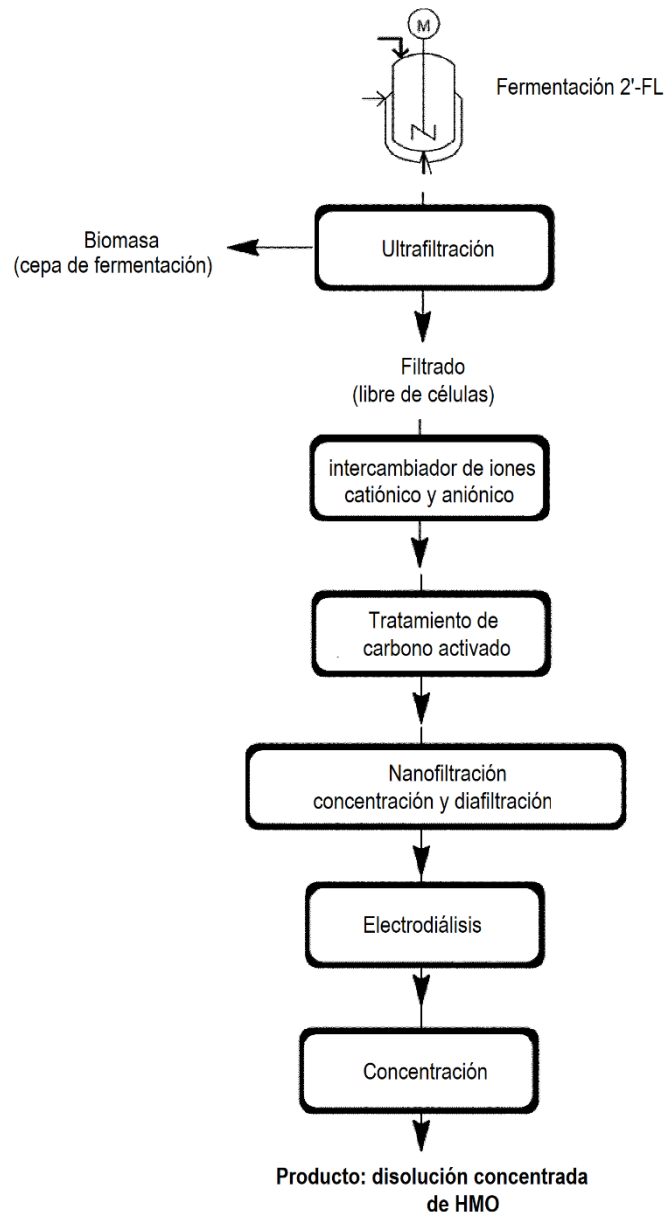


Figura 2

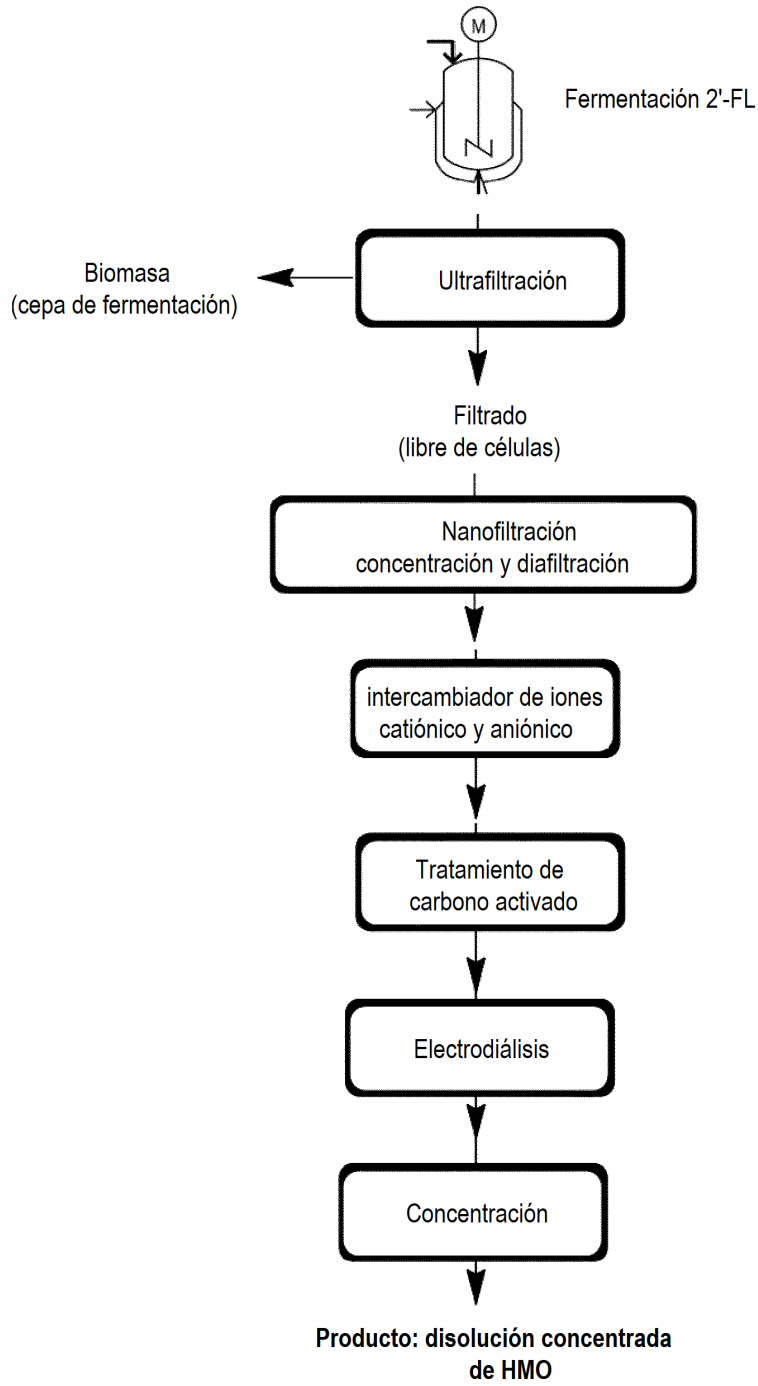


Figura 3

