(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 026 362**

(51) Int. Cl.:

A23L 33/00 (2006.01)
C07H 1/08 (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01)
A23L 29/30 (2006.01)
A23L 33/21 (2006.01)
C07H 3/02 (2006.01)
C07H 13/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2018 E 18155669 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2025 EP 3524067**

(54) Título: **Mezcla secada por atomización de oligosacáridos de la leche humana**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2025

(73) Titular/es:

CHR. HANSEN HMO GMBH (100.00%)
Maarweg 32
53619 Rheinbreitbach, DE

(72) Inventor/es:

JENNEWEIN, STEFAN

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

Mezcla secada por atomización de oligosacáridos de la leche humana

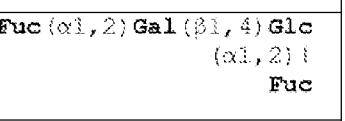
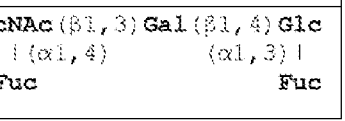
La presente invención se refiere a polvos secados por atomización que contienen una mezcla de oligosacáridos de la leche humana estructuralmente distintos y al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico, y a su uso para la fabricación de composiciones nutricionales.

Antecedentes

La leche materna humana contiene cantidades importantes de carbohidratos. Los carbohidratos presentes en la leche materna humana incluyen monosacáridos como la L-fucosa y el ácido N-acetilneuramínico, el disacárido lactosa y hasta 20 g/l de oligosacáridos, los denominados "oligosacáridos de la leche humana (HMO)". Los HMO representan el tercer componente más abundante de la leche materna humana. Se supone que en la leche humana hay más de 150 oligosacáridos con estructuras distintas. En la tabla 1 se muestran algunos HMO seleccionados. Cada uno de estos HMO, entre 10 y 13, está presente en la leche humana en una concentración de entre varios cientos de miligramos y gramos por litro (Thurl et al., (2017), Nutrition Reviews 75(11) 920-933). Entre los HMO, se conocen los HMO neutros y los HMO ácidos, que contienen al menos un resto de ácido N-acetilneuramínico (NeuAc). La complejidad estructural y la abundancia de estos oligosacáridos son únicas de la leche humana y no se han encontrado en la leche de otros mamíferos, como por ejemplo los animales lecheros domésticos.

Dado que los HMO no son digeridos por los seres humanos, la función fisiológica de estos sacáridos se ha investigado durante varias décadas. El efecto prebiótico de los HMO se descubrió hace más de 100 años. Tras su consumo, los HMO son capaces de modular la composición de la microbiota intestinal humana al favorecer el crecimiento de bacterias beneficiosas.

Tabla 1: Estructuras de oligosacáridos destacados en la leche materna humana.

Nombre	Estructura química
2'-FL	Fuc(α1,2)Gal(β1,4)Glc
3-FL	Gal(β1,4)(Fuc(α1,3))Glc
DFL	
LNT	Gal(β1,3)GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc
LNnT	Gal(β1,4)GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc
LNFP-I	Fuc(α1,2)Gal(β1,3)GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc
LNFP-II	Gal(β1,3)(Fuc(α1,4))GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc
LNFP-III	Gal(β1,4)(Fuc(α1,3))GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc
LNFP-V	Gal(β1,3)GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)(Fuc(α1,3))Glc
3'-SL	NeuAc(α2,3)Gal(β1,4)Glc
6'-SL	NeuAc(α2,6)Gal(β1,4)Glc
LSTa	NeuAc(α2,3)Gal(β1,3)GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc
LSTb	NeuAc |(α2,6) Gal(β1,3)GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc
LSTc	NeuAc(α2,6)Gal(β1,4)GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc
LNDFH-I	Fuc(α1,2)Gal(β1,3)GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc |(α1,4) Fuc
LNDFH-II	

LNDFH-III	**Gal**(β1,3)**GlcNAc**(β1,3)**Gal**(β1,4)**Glc** |(α1,3) (α1,3)| **Fuc** **Fuc**
F-LSTa	**NeuAc**(α2,3)**Gal**(β1,3)**GlcNAc**(β1,3)**Gal**(β1,4)**Glc** |(α1,4) **Fuc**
F-LSTb	**NeuAc** |(α2,6) **Fuc**(α1,2)**Gal**(β1,3)**GlcNAc**(β1,3)**Gal**(β1,4)**Glc**
F-LSTc	**NeuAc**(α2,6)**Gal**(β1,4)**GlcNAc**(β1,3)**Gal**(β1,4)**Glc** (α1,3)| **Fuc**
FSL	NeuAc(α2,3)Gal(β1,4)Glc (α1, 3) | Fuc
DS-LNT	**NeuAc** |(α2,6) **NeuAc**(α2,3)**Gal**(β1,3)**GlcNAc**(β1,3)**Gal**(β1,4)**Glc**
FDS-LNT-I	**NeuAc** |(α2,6) **NeuAc**(α2,3)**Gal**(β1,4)**GlcNAc**(β1,3)**Gal**(β1,4)**Glc**
FDS-LNT-II	**NeuAc** |(α2,6) **NeuAc**(α2,3)**Gal**(β1,4)**GlcNAc**(β1,3)**Gal**(β1,4)**Glc** (α1,3)| **Fuc**

En los últimos años se han descubierto otros efectos funcionales de los HMO, especialmente su efecto sobre el desarrollo de los recién nacidos. Se sabe que los HMO actúan como señuelos para reducir el riesgo de infecciones por patógenos bacterianos y virales que se adhieren a las células humanas al unirse a las glicoproteínas de la superficie de estas células. Además, diversos HMO poseen un efecto antiinflamatorio y actúan como inmunomoduladores. Por lo tanto, se ha propuesto que los HMO reducen el riesgo de desarrollar alergias alimentarias. También se está debatiendo intensamente el efecto positivo de los HMO sialilados en el desarrollo del sistema nervioso central de los recién nacidos (revisado en "Prebiotics and Probiotics in Human Milk, Origins and functions of milk-borne oligosaccharides and bacteria", Academic Press (2017), editores: McGuire M., McGuire M. y Bode L.).

Para aprovechar los efectos beneficiosos de los HMO, se están realizando esfuerzos para añadir HMO individuales a la composición nutricional, en particular a la fórmula infantil. Sin embargo, sería mejor suplementar las composiciones nutricionales con una combinación de diferentes HMO, ya que estas composiciones se asemejan más a la fuente natural de los HMO, es decir, la leche materna, y es más probable que tengan mejores efectos sobre la salud y el desarrollo de las personas que las composiciones que contienen una sola especie de HMO.

El suministro limitado de HMO para suplementar las composiciones nutricionales llevó al desarrollo de procedimientos para la síntesis química de HMO. Los inconvenientes de estas síntesis químicas dieron lugar a enfoques biocatalíticos en los que los HMO se sintetizan *in vitro* utilizando enzimas purificadas, como las glicosiltransferasas. En la actualidad, los HMO individuales se producen a escala industrial mediante la fermentación de células microbianas modificadas genéticamente (documentos WO 2015/150328 A1, WO 2017/043382 A1, WO 2010/070104 A1, WO 2012/097950 A1). Los HMO se sintetizan mediante células microbianas modificadas genéticamente y pueden recuperarse del medio de fermentación y/o del lisado celular para obtener una preparación sustancialmente pura del HMO.

Durante su recuperación de un caldo de fermentación, los HMO suelen presentarse en forma de una corriente de proceso líquida, por ejemplo, una solución acuosa que contiene el HMO de interés y que también puede contener HMO no deseados que sean subproductos generados durante la producción fermentativa del HMO deseado. Junto con la recuperación de los HMO deseados, es decir, los HMO de interés, aumenta su concentración en la corriente de proceso y su pureza. Sin embargo, una solución acuosa que contiene HMO es vulnerable a la contaminación bacteriana o fúngica. Por lo tanto, es preferible proporcionar los HMO

deseados como un producto seco o sólido que contenga una baja cantidad de agua. El crecimiento de organismos microbianos es prácticamente imposible sobre/en un producto sólido de este tipo.

Normalmente, un sacárido se obtiene en forma sólida por cristalización. La cristalización de HMO individuales a partir de una solución acuosa se ha descrito para la 3-fucosil-lactosa (documento WO 2014/075680 A), para la 2'-fucosil-lactosa (documento WO 2011/150939 A), difucosil-lactosa (documento WO 2016/086947 A), lacto-N-tetraosa (documento WO 2017/101953 A) y lacto-N-neotetraosa (documento WO 2014/094783 A). La cristalización de los HMO implica el uso de disolventes orgánicos como alcoholes, principalmente etanol o metanol, o ácidos orgánicos como el ácido acético glacial. Sin embargo, el uso de alcoholes, especialmente metanol, para cristalizar los HMO al final del procedimiento de recuperación es inadecuado si los HMO se van a utilizar para el consumo humano. Además, los disolventes orgánicos son caros de adquirir y eliminar. Asimismo, los disolventes orgánicos son perjudiciales para el medio ambiente y para el personal que los manipula. Por lo tanto, la cristalización de los HMO es un inconveniente en la producción de HMO a escala industrial y debe evitarse, especialmente al final del procedimiento de recuperación del HMO deseado.

El documento EP 2 896 628 A1 se refiere a un procedimiento para la purificación eficiente de oligosacáridos neutros de la leche humana a partir de caldos de fermentación. El procedimiento implica una combinación de un tratamiento con un intercambiador catiónico, un tratamiento con un intercambiador aniónico y una etapa de nanofiltración y/o electrodiálisis. Los HMO pueden obtenerse en forma sólida mediante secado por atomización, como material cristalino o como concentrado filtrado estéril.

La publicación abierta WO 2015/049331 A1 divulga un procedimiento para purificar un HMO neutro utilizando cromatografía de lecho móvil simulado. Este procedimiento permite la purificación continua de un HMO neutro a partir de una solución cruda para obtener el HMO en forma sólida de alta pureza mediante secado por atomización o como jarabe concentrado.

El documento US 2015/183814 A1 divulga un procedimiento para mejorar la estabilidad de un oligosacárido de leche humana de una mezcla de HMO cuando se almacena durante períodos prolongados a temperaturas superiores a 25 °C. El procedimiento consiste en secar por atomización una solución acuosa del HMO o de la mezcla de HMO para eliminar al menos el 90 % del agua. Este documento también divulga un procedimiento para eliminar los residuos de disolventes orgánicos de un HMO o una mezcla de HMO mediante secado por atomización, y un procedimiento para mejorar la biodisponibilidad de un HMO de una mezcla de HMO mediante secado por atomización.

Los documentos EP 3 486 326 A1, EP 3 494 804 A1, EP 3 494 805 A1, EP 3 494 806 A1 y EP 3 494 807 A1 se publicaron después de la fecha de presentación de la presente patente, y cada documento divulga una composición nutricional que comprende una mezcla que consiste en

Sacárido	[% en peso]
2'-fucosil-lactosa (2'-FL)	34
3-fucosil-lactosa (3-FL)	11
lacto-*N*-tetraosa (LNT)	20
lacto-*N*-neotetraosa (LNnT)	2
lacto-N-fucopentosa I (LNFPI)	13
3'-sialil-lactosa (3'-SL)	3
6'-sialil-lactosa (6'-SL)	4
Ácido N-acetilneuramínico (NeuAc)	8
L-fucosa	5
Total	100

Röhrig y sus colegas (Röhrig, C. et al. (2004) Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57 (5) 1017-1038) resumen la bioquímica, el metabolismo, la biodisponibilidad y los datos sobre los niveles de ácido N-acetilneuramínico y ácido N-glicolil-D-neuramínico que se encuentran en diversos alimentos. Se revela que el cuerpo humano es capaz de sintetizar ácido siálico de forma endógena y que el ácido siálico se encuentra en la leche materna en forma libre, aunque predominantemente presente en forma unida como azúcar más externo de oligosacáridos y glicoconjugados. También se menciona que la leche materna contiene L-fucosa y N-acetil-D-glucosamina como monosacáridos. Además de la utilización del ácido siálico producido de forma endógena,

el cuerpo humano es capaz de utilizar el ácido siálico procedente de fuentes alimenticias, como la leche materna o de origen animal. Este último contiene niveles significativos del indeseable ácido N-glicolil-D-neuramínico, que ha sido identificado como un factor de riesgo para efectos adversos a largo plazo para la salud. Röhrig et al. revelan que solo se puede obtener NeuAc de pureza extremadamente alta a partir de procedimientos de fabricación alternativos si se aplican procedimientos de cristalización robustos que proporcionen un ingrediente cristalino.

Por lo tanto, se necesitan procedimientos que proporcionen una mezcla de HMO, preferiblemente en combinación con al menos un monosacárido, en forma sólida, en los que el procedimiento sea aplicable a la producción a escala industrial y no implique el uso de un disolvente orgánico al final de la purificación de uno o más de los HMO para proporcionar una preparación sólida de dichos HMO.

El objetivo se ha logrado mediante un procedimiento para la fabricación de un polvo secado por atomización que comprende una mezcla de HMO estructuralmente distintos.

Resumen

En un primer aspecto, se proporciona un polvo secado por atomización que contiene una mezcla de HMO estructuralmente distintos y al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico, tal y como se define en la reivindicación 1.

En un segundo aspecto, se proporciona el uso del polvo secado por atomización que contiene una mezcla de HMO estructuralmente distintos y al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico para la fabricación de una composición nutricional, tal y como se define en la reivindicación 6.

La invención se describe en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra un gráfico que ilustra los resultados de una difracción de rayos X en polvo de 3-fucosil-lactosa secada por atomización.

La figura 2 muestra un gráfico que ilustra los resultados de una difracción de rayos X en polvo de lacto-N-tetraosa secada por atomización.

La figura 3 muestra un gráfico que ilustra los resultados de una difracción de rayos X en polvo de 6'-sialil-lactosa secada por atomización.

La figura 4 muestra un gráfico que ilustra los resultados de una difracción de rayos X en polvo de 3'-sialil-lactosa secada por atomización.

La figura 5 muestra un gráfico que ilustra los resultados de una difracción de rayos X en polvo de una mezcla secada por atomización de 2'-fucosil-lactosa y lacto-N-tetraosa.

La figura 6 muestra un gráfico que ilustra los resultados de una difracción de rayos X en polvo de una mezcla secada por atomización de 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, lacto-N-tetraosa, 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa.

Descripción detallada

Según el primer aspecto, se proporciona un polvo secado por atomización que contiene una mezcla de HMO estructuralmente distintos, tal y como se define en la reivindicación 1.

El polvo secado por atomización contiene preferiblemente al menos un 80 % en peso, al menos un 85 % en peso, al menos un 90 % en peso, al menos un 93 % en peso, al menos un 95 % en peso o al menos un 98 % en peso de HMO.

El polvo secado por atomización contiene una mezcla de HMO estructuralmente distintos y al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico (NeuAc). En una realización adicional y/o alternativa, el polvo secado por atomización contiene, además de la mezcla de HMO estructuralmente distintos, los monosacáridos L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico.

El polvo secado por atomización comprende la composición proporcionada en la Tabla 2, con la excepción de una composición que comprende

Tabla 2: Composición del polvo secado por atomización

Sacárido	[% en peso]

2'-fucosil-lactosa (2'-FL)	34
3-fucosil-lactosa (3-FL)	11
lacto-N-tetraosa (LNT)	20
lacto-N-neotetraosa (LNnT)	2
lacto-N-fucopentosa I (LNFPI)	13
3'-sialil-lactosa (3'-SL)	3
6'-sialil-lactosa (6'-SL)	4
Ácido N-acetilneuramínico (NeuAc)	8
L-fucosa	5
Total	100
2'-FL	30.0 - 55.0
3-FL	10.0 - 15.0
LNT	20.0 - 30.0
LNnT	0.0 - 5.0
LNFPI	0.0 - 20.0
3'-SL	2.0 - 4.0
6'-SL	4.0 - 6.0
NeuAc	0.0 - 10.0
L-fucosa	0.0 - 6.0
Total	100.0

En una realización adicional y/o alternativa, al menos uno de los HMO de la mezcla de HMO estructuralmente distintos y/o del polvo secado por atomización se ha producido mediante fermentación microbiana. En una realización particular, todos los HMO de la mezcla de HMO estructuralmente distintos y/o del polvo secado por atomización se han producido mediante fermentación microbiana.

En una realización adicional y/o alternativa, dicho al menos un monosacárido se ha producido mediante fermentación microbiana. En otra realización en la que el polvo secado por atomización contiene L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico, ambos monosacáridos se han producido mediante fermentación microbiana.

Por lo tanto, en una realización particular, todos los sacáridos que están presentes en el polvo secado por atomización, es decir, los HMO y los monosacáridos, se han producido mediante fermentación microbiana.

En una realización adicional y/o alternativa, al menos uno de los HMO del polvo secado por atomización, preferiblemente todos los HMO en el polvo secado por atomización, están presentes en forma amorfa. En determinadas realizaciones, el monosacárido, al menos uno de los monosacáridos, o ambos monosacáridos están presentes en forma amorfa.

En una realización adicional y/o alternativa, el polvo secado por atomización contiene una baja cantidad de agua. El término "baja cantidad de agua" se refiere a una cantidad ≤ 15 % en peso de agua, preferiblemente ≤ 10 % en peso de agua, más preferiblemente ≤ 7 % en peso de agua, y más preferiblemente ≤ 5 % en peso de agua.

En una realización adicional y/o alternativa, el polvo secado por atomización está libre de microorganismos modificados genéticamente y libre de moléculas de ácido nucleico derivadas de microorganismos modificados genéticamente.

Un polvo secado por atomización que contiene una mezcla de HMO estructuralmente distintos en combinación con al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico, es ventajoso con respecto a las composiciones líquidas en que dicho polvo secado por atomización es menos

vulnerable a la contaminación microbiana. Dicho polvo secado por atomización también es ventajoso con respecto a los polvos que tienen la misma composición de ingredientes que se obtuvieron mediante liofilización o congelación-secado, en que el polvo secado por atomización es menos higroscópico y permanece fluido durante mucho más tiempo.

También se proporciona, aunque no entra en el ámbito de la presente invención, un procedimiento para la fabricación del polvo secado por atomización que comprende una mezcla de HMO estructuralmente distintos y al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico, en el que al menos uno de los HMO estructuralmente distintos, preferiblemente todos los HMO estructuralmente distintos, se han producido mediante fermentación microbiana. El procedimiento comprende las etapas de:

a) recuperar al menos uno de los HMO estructuralmente distintos de un caldo de fermentación;

b) proporcionar una solución acuosa del al menos un HMO de la etapa a); y

c) someter la solución de la etapa b) a secado por atomización.

En una realización adicional y/o alternativa, la purificación del al menos un HMO del caldo de fermentación (etapa a) incluye una o más de las etapas de

i) eliminar las células microbianas del caldo de fermentación para obtener una corriente de proceso;

ii) someter la corriente de proceso a al menos una ultrafiltración;

iii) tratar la corriente de proceso al menos una vez con una resina de intercambio catiónico y/o al menos una vez con una resina de intercambio aniónico;

iv) someter la corriente de proceso a al menos una nanofiltración;

v) someter la corriente de proceso a al menos una electrodiálisis;

vi) tratar la corriente de proceso al menos una vez con carbón activado; y/o

vii) someter la corriente de proceso al menos una vez a una etapa de cristalización y/o precipitación.

El al menos un HMO o cualquiera de los HMO estructuralmente distintos de la mezcla pueden producirse mediante fermentación microbiana, en la que se cultiva un microorganismo modificado genéticamente capaz de sintetizar un HMO en un medio de cultivo (caldo de fermentación) y en condiciones que permiten la síntesis de dicho HMO por dicho microorganismo modificado genéticamente. La purificación del HMO sintetizado por las células del microorganismo modificado genéticamente comprende la etapa de separar las células microbianas del caldo de fermentación para obtener una corriente de proceso. La corriente de proceso está esencialmente libre de células y contiene dicho HMO o dichos HMO. Esta etapa es la primera etapa del procedimiento de purificación del HMO deseado.

Los procedimientos adecuados para separar las células microbianas del caldo de fermentación incluyen la centrifugación, en la que las células microbianas se obtienen en forma de pella y el caldo de fermentación como sobrenadante. En una realización adicional y/o alternativa, las células microbianas se separan del caldo de fermentación por medio de filtración. Los procedimientos de filtración adecuados para separar las células del caldo de fermentación incluyen la microfiltración y la ultrafiltración.

La microfiltración como tal es un procedimiento de filtración física en el que un fluido que contiene partículas se hace pasar a través de una membrana especial con poros de un tamaño determinado para separar las partículas del fluido. El término "microfiltración", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un procedimiento de filtración física en el que las células se separan del caldo de fermentación.

La ultrafiltración es una variedad de filtración por membrana y no es fundamentalmente diferente. En la ultrafiltración, fuerzas como la presión o los gradientes de concentración provocan una separación a través de una membrana semipermeable. Las células, los sólidos en suspensión y los solutos de alto peso molecular se retienen en el denominado retentado, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular, como el oligosacárido sialilado deseado, pasan a través de la membrana en el permeado (filtrado).

Las membranas de ultrafiltración se definen por el umbral del peso molecular (MWCO) de la membrana utilizada. La ultrafiltración se aplica en modo de flujo cruzado o de callejón sin salida.

Normalmente, las células microbianas sintetizan los HMO intracelularmente. Dependiendo de la estructura del HMO, el HMO se libera al caldo de fermentación o permanece dentro de la célula microbiana. En el primer caso, el HMO así producido está presente en el caldo de fermentación al final de la fermentación y puede recuperarse del caldo de fermentación, que se convierte así en la corriente de proceso. En el último caso, las células microbianas que contienen los HMO se separan del caldo de fermentación y se lisan para liberar los

HMO. Así, el lisado celular contiene el HMO y se convierte en la corriente de proceso para la purificación del HMO, como se describe a continuación.

A pesar de que el procedimiento se utiliza para la purificación de HMO que han sido producidos por fermentación microbiana, dicho procedimiento también puede emplearse para purificar HMO que fueron producidos por catálisis enzimática *in vitro*. El HMO puede entonces purificarse de la mezcla de reacción al final de la reacción biocatalítica. Dicha mezcla de reacción se somete al procedimiento de purificación como corriente de proceso.

La corriente de proceso contiene el o los HMO deseados, así como subproductos e impurezas no deseadas, tales como, por ejemplo, monosacáridos, disacáridos, subproductos de oligosacáridos no deseados, iones, aminoácidos, polipéptidos, proteínas y/o moléculas de ácido nucleico.

En una realización adicional y/o alternativa, el procedimiento de purificación de los HMO comprende la etapa de al menos un tratamiento de intercambio catiónico para eliminar los compuestos con carga positiva de la corriente de proceso depurada.

Las resinas de intercambio catiónico adecuadas para eliminar compuestos con carga positiva de la corriente de proceso incluyen Lewatit® S 6368 A (Lanxess AG, Colonia, Alemania) en forma de H^+; Lewatit® S 2568 (H^+) (Lanxess AG, Colonia, Alemania).

En una realización adicional y/o alternativa, el procedimiento para la purificación del HMO comprende la etapa de un tratamiento de intercambio aniónico para eliminar compuestos con carga negativa no deseados de la corriente de proceso depurada.

Entre las resinas de intercambio aniónico adecuadas se incluyen Lewatit® S 2568 (Cl^-) (Lanxess AG, Colonia, Alemania), Lewatit® S 6368 A (Lanxess AG, Colonia, Alemania), Lewatit® S 4268 (Lanxess AG, Colonia, Alemania) y Lewatit® S 5528 (Lanxess AG, Colonia, Alemania), Dowex® AG 1x2 (Malla 200-400), Dowex® 1x8 (Malla 100-200), Purolite® Chromalite® CGA100x4 (Purolite GmbH, Ratingen, Alemania), Dow® Amberlite™ FPA51 (Dow Chemicals, Míchigan, EE. UU.).

En una realización adicional o alternativa, el procedimiento para la purificación del HMO comprende una etapa de nanofiltración y/o diafiltración para eliminar las impurezas que tienen un peso molecular más bajo y concentrar el HMO deseado.

La diafiltración implica la adición de agua fresca a una solución con el fin de eliminar (lavar) los componentes permeables a la membrana. La diafiltración puede utilizarse para separar componentes en función de su tamaño molecular y su carga mediante el uso de membranas adecuadas, en las que una o más especies se retienen de manera eficiente y otras especies son permeables a la membrana. En particular, la diafiltración mediante una membrana de nanofiltración es eficaz para la separación de compuestos de bajo peso molecular, como moléculas pequeñas y sales. Las membranas de nanofiltración suelen tener un umbral de peso molecular comprendido entre 150 y 1000 daltones. La nanofiltración se utiliza ampliamente en la industria láctea para la concentración y desmineralización del suero.

Las membranas adecuadas para la nanofiltración y/o diafiltración incluyen Dow® Filmtec™ NF270-4040, Trisep® 4040-XN45-TSF (Microdyn-Nadir GmbH, Wiesbaden, Alemania), GE4040F30 y GH4040F50 (GE Water & Process Technologies, Ratingen, Alemania).

Se ha descubierto que la diafiltración con membranas de nanofiltración es eficaz como pretratamiento para eliminar cantidades significativas de contaminantes antes del tratamiento por electrodiálisis de la solución que contiene el oligosacárido. El uso de membranas de nanofiltración para la concentración y la diafiltración durante la purificación de los HMO da como resultado menores costes energéticos y de procesamiento, y una mejor calidad del producto debido a la reducción de la exposición térmica, lo que conduce a una reducción de las reacciones de Maillard y las reacciones aldólicas.

En una realización adicional y/o alternativa, el procedimiento de purificación de los HMO comprende al menos una etapa de electrodiálisis.

La electrodiálisis (ED) combina la diálisis y la electrólisis y puede utilizarse para la separación o concentración de iones en soluciones basándose en su electromigración selectiva a través de membranas semipermeables.

El principio básico de la electrodialisis consiste en una célula electrolítica que comprende un par de electrodos sumergidos en un electrolito para la conducción de iones, conectados a un generador de corriente continua. El electrodo conectado al polo positivo del generador de corriente continua es el ánodo, y el electrodo conectado al polo negativo es el cátodo. La solución electrolítica soporta entonces el flujo de corriente, que resulta del movimiento de iones negativos y positivos hacia el ánodo y el cátodo, respectivamente. Las membranas utilizadas para la electrodialisis son esencialmente láminas de resinas de intercambio iónico porosas con grupos de carga negativa o positiva, por lo que se describen como membranas catiónicas o aniónicas,

respectivamente. Las membranas de intercambio iónico suelen estar fabricadas con poliestireno que lleva un grupo funcional adecuado (como ácido sulfónico para las membranas catiónicas o un grupo de amonio cuaternario para las membranas aniónicas) reticulado con divinilbenceno. El electrolito puede ser, por ejemplo, cloruro de sodio, acetato de sodio, propionato de sodio o ácido sulfámico. A continuación, la pila de electrodialisis se ensambla de tal manera que las membranas aniónicas y catiónicas quedan paralelas, como en un filtro prensa, entre dos bloques de electrodos, de modo que la corriente que se somete a la disminución de iones queda bien separada de la corriente que se somete al enriquecimiento de iones (las dos soluciones también se denominan diluido (sometido a depuración de iones) y concentrado (sometido a enriquecimiento de iones). El corazón del procedimiento de electrodiálisis es la pila de membranas, que consta de varias membranas de intercambio aniónico y membranas de intercambio catiónico separadas por espaciadores, instaladas entre dos electrodos. Al aplicar una corriente eléctrica directa, los aniones y los cationes migran a través de las membranas hacia los electrodos.

En una realización adicional y/o alternativa, el procedimiento para la purificación del HMO comprende además una etapa de cromatografía continua similar a la cromatografía de lecho móvil simulado (SMB).

La cromatografía de lecho móvil simulado (SMB) se originó en las industrias petroquímica y mineral. Hoy en día, la cromatografía SMB se utiliza en la industria farmacéutica para aislar enantiómeros de mezclas racémicas. La cromatografía SMB a gran escala ya se ha utilizado para la separación del monosacárido fructosa de soluciones de fructosa-glucosa y para la separación del disacárido sacarosa de jarabes de remolacha azucarera o caña de azúcar.

Los procedimientos de cromatografía SMB utilizados para separar sacáridos utilizan, por ejemplo resinas de poliestireno reticulado cargadas con calcio, resinas aniónicas en forma de bisulfito (Bechthold M., et al., Chemie Ingenieur Technik, 2010, 82, 65-75) o resinas catiónicas de ácido fuerte en forma de gel de poliestireno en la forma hidrógeno (Purolite® PCR833H) (Purolite, Bala Cynwyd, EE. UU.).

Dado el modo de funcionamiento continuo, el reciclaje de la fase móvil y también el potencial de utilizar columnas de gran tamaño, los sistemas de cromatografía SMB pueden, en principio, escalarse para alcanzar volúmenes de producción de cientos de toneladas.

La etapa del procedimiento de cromatografía de lecho móvil simulado es ventajosa porque esta etapa de procedimiento permite eliminar aún más los oligosacáridos que están estructuralmente relacionados de modo estrecho con el oligosacárido deseado.

En una realización adicional y/o alternativa, el procedimiento para la purificación de al menos un HMO comprende un tratamiento de la corriente de proceso con carbón activado para eliminar sustancias contaminantes, como colorantes, de la corriente de proceso.

En una realización adicional y/o alternativa, el procedimiento para la purificación del al menos un HMO comprende al menos una etapa de cristalización o precipitación del HMO a partir de la corriente de proceso. La cristalización o precipitación del al menos un HMO a partir de la corriente de proceso puede realizarse añadiendo una cantidad adecuada de un disolvente orgánico que sea miscible con agua a la corriente de proceso que contiene el al menos un HMO. El disolvente orgánico puede seleccionarse del grupo que consiste en alcoholes de C_1 a C_6 y ácidos carboxílicos de C_1 a C_4. La etapa de cristalización o precipitación del al menos un HMO no se lleva a cabo al final del procedimiento de recuperación, de modo que las cantidades residuales del disolvente orgánico o del ácido carboxílico puedan eliminarse en etapas posteriores del procedimiento.

En una realización adicional y/o alternativa del procedimiento para la purificación del al menos un HMO, se comprende una etapa de filtración estéril y/o eliminación de endotoxinas, preferiblemente mediante filtración de la corriente de proceso a través de un filtro de 3 kDa o un filtro de 6 kDa.

En una realización adicional y/o alternativa, el procedimiento para la purificación del al menos un HMO comprende una etapa de aumento de la concentración del al menos un HMO en la corriente de proceso. La concentración del al menos un HMO en la corriente de proceso puede aumentarse sometiendo la corriente de proceso a evaporación al vacío, ósmosis inversa o nanofiltración (por ejemplo, nanofiltración con una membrana de nanofiltración que tenga un límite de exclusión por tamaño ≤ 20 Å). Alternativamente, los HMO cristalizados o precipitados se disuelven en agua para obtener una solución acuosa del al menos un HMO, en la que la solución acuosa posee la concentración deseada de dicho al menos un HMO.

En una realización adicional y/o alternativa, la corriente de proceso resultante es una solución acuosa que contiene el al menos un HMO en una concentración de ≥ 20 g/l, ≥ 25 g/l, ≥ 30 g/l, ≥ 40 g/l, ≥ 60 g/l, ≥ 100 g/l, ≥ 200 g/l o incluso ≥ 300 g/l.

En una realización adicional y/o alternativa, la solución acuosa contiene al menos un HMO en una pureza de al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 93 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % con respecto al peso de la materia seca/solutos dentro de la solución.

El término "pureza", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a la pureza química, es decir, al grado en que una sustancia no está diluida ni mezclada con material extraño. Por lo tanto, la pureza química es un indicador de la relación entre el al menos un HMO y los subproductos/impurezas. La pureza química se expresa en porcentaje (%) y se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de pureza} = 100 \times \frac{\text{Masa de compuesto deseado en la prueba}}{\text{Masa total de muestra}}$$

La pureza de un HMO en una preparación puede determinarse por cualquier procedimiento adecuado conocido por el experto en la materia, por ejemplo, utilizando HPLC y calculando la relación entre el área debajo del pico o picos que representan la cantidad de HMO y la suma de las áreas debajo de los picos que representan el o los HMO y todos los demás compuestos distintos de dicho(s) HMO en el mismo cromatograma.

La solución acuosa que contiene al menos un HMO puede almacenarse en condiciones apropiadas, por ejemplo, dicha solución acuosa puede congelarse.

El procedimiento de purificación de al menos un HMO es rentable y fácil de ampliar, lo que lo hace adecuado como base para un procedimiento de fabricación a escala de varias toneladas.

El procedimiento para la purificación del al menos un HMO también es ventajoso porque la solución acuosa está libre de microorganismos modificados genéticamente y de moléculas de ácido nucleico derivadas de microorganismos modificados genéticamente. Además, la solución acuosa está libre de proteínas. La eliminación total de las proteínas elimina el riesgo de causar alergias a un consumidor potencial.

El procedimiento para la fabricación del polvo secado por atomización comprende la etapa de proporcionar una solución acuosa que contiene al menos un HMO o la mezcla de HMO estructuralmente distintos y, opcionalmente, al menos un monosacárido.

En una realización adicional y/o alternativa, el al menos un HMO se selecciona del grupo que consiste en 2'-FL, 3-FL, LNT, LNnT, LNFPI, 3'-SL, 6'-SL.

En una realización adicional y/o alternativa, la mezcla de HMO estructuralmente distintos consiste en cinco HMO estructuralmente distintos, preferiblemente 2'-FL, 3-FL, LNT, 3'-SL y 6'-SL. En otra realización, la mezcla de HMO estructuralmente distintos consiste en siete HMO estructuralmente distintos, preferiblemente 2'-FL, 3-FL, LNT, LNnT, LNFPI, 3'-SL y 6'-SL.

En una realización adicional y/o alternativa, la solución acuosa contiene además al menos un monosacárido, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico. En otra realización, la solución acuosa contiene además L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico.

En una realización adicional y/o alternativa, la solución acuosa contiene al menos un HMO o la mezcla de HMO, y/o el al menos un monosacárido, en una cantidad que totaliza una cantidad de sacáridos de al menos un 20 % (p/v), un 30 % (p/v), un 35 % (p/v) y hasta un 45 % (p/v), un 50 % (p/v) y un 60 % (p/v).

En una realización adicional y/o alternativa, la solución acuosa contiene al menos un HMO o la mezcla de HMO en una pureza de al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 93 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % con respecto al peso de la materia seca/solutos dentro de la solución.

En una realización adicional y/o alternativa, la solución acuosa no contiene microorganismos modificados genéticamente, moléculas de ácido nucleico derivadas de microorganismos modificados genéticamente ni proteínas.

En el procedimiento para la fabricación del polvo secado por atomización, la solución acuosa que contiene al menos un HMO o la mezcla de HMO estructuralmente distintos se somete a secado por atomización.

El secado por atomización es un procedimiento para obtener polvos secos, en el que la solución que contiene la sustancia de interés se atomiza primero en gotitas que se secan rápidamente con aire caliente. El secado por atomización es muy rápido y la exposición de la sustancia a secar a altas temperaturas es bastante breve.

En una realización adicional y/o alternativa, la solución acuosa que contiene al menos un HMO o la mezcla de HMO estructuralmente distintos se seca por atomización a una temperatura de boquilla de al menos 110 °C, preferiblemente al menos 120 °C, más preferiblemente al menos 125 °C, y menos de 150 °C, preferiblemente menos de 140 °C y más preferiblemente menos de 135 °C.

En una realización adicional y/o alternativa, la solución acuosa que contiene al menos un HMO o la mezcla de HMO estructuralmente distintos se seca por atomización a una temperatura de salida de al menos 60 °C, preferiblemente al menos 65 °C, y menos de 80 °C, preferiblemente menos de 70 °C. En una realización

particularmente preferida, la solución acuosa que contiene el HMO o los HMO se seca por atomización a una temperatura de boquilla de entre aproximadamente 68 °C y aproximadamente 70 °C.

Se entiende que cada especie de los HMO estructuralmente distintos, opcionalmente en combinación con al menos un monosacárido, puede purificarse y secarse por atomización individualmente, y que los polvos secados por atomización resultantes pueden mezclarse en cualquier proporción deseada. En una realización alternativa, las soluciones acuosas contienen todos los HMO estructuralmente distintos, y la solución acuosa resultante que contiene la mezcla de HMO estructuralmente distintos en la proporción deseada se somete a secado por atomización.

En una realización adicional y/o alternativa, la solución acuosa que contiene al menos un HMO o una mezcla de HMO estructuralmente distintos contiene además al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico. A continuación, la solución acuosa que contiene al menos un HMO o la mezcla de HMO estructuralmente distintos y al menos un monosacárido se somete a secado por atomización para obtener un polvo secado por atomización que consiste esencialmente en al menos un HMO y al menos un monosacárido o la mezcla de HMO estructuralmente distintos y al menos un monosacárido.

La proporción de sacáridos (HMO y monosacárido(s)) en el polvo secado por atomización resultante corresponde a la proporción de estos sacáridos en la solución acuosa.

Este último procedimiento es ventajoso porque los monosacáridos que no se pueden secar por atomización individualmente se pueden secar por atomización en presencia de uno o más HMO.

El secado por atomización de la solución acuosa que contiene al menos un HMO o la mezcla de HMO estructuralmente distintos proporciona un polvo de baja higroscopicidad, en el que el HMO está presente en forma amorfa y en el que el tamaño de las partículas es homogéneo. El polvo secado por atomización que contiene la mezcla de HMO estructuralmente distintos es menos higroscópico que un polvo de composición idéntica que se obtuvo por liofilización. Por lo tanto, los polvos secados por atomización descritos en el presente documento son ventajosos con respecto a su uso y procesamiento posteriores.

Según el segundo aspecto, se proporciona el uso del polvo secado por atomización que contiene una mezcla de HMO estructuralmente distintos y al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico, para la fabricación de una composición nutricional. El polvo secado por atomización es apto para el consumo humano y, por lo tanto, puede incluirse en preparaciones para el consumo humano, tales como formulaciones medicinales, fórmulas infantiles, bebidas lácteas o suplementos dietéticos.

La composición nutricional contiene uno o más ingredientes adicionales. Dicho ingrediente o dichos ingredientes adicionales se seleccionan del grupo que consiste en aceite, grasa y ácidos grasos (como aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de coco, aceite de nueces, aceite de colza, aceite de palma, aceite de linaza, aceite de pescado, ácido linolénico, aceite de soja, etc.), carbohidratos (como glucosa, fructosa, lactosa, maltodextrina, almidón, sacarosa, inositol, etc.), proteínas (de leche desnatada, suero, caseína (derivada de cualquier animal lechero domesticado) o soja), vitaminas (A, B1, B2, B5, B6, B12, C, D, E, K, biotina, ácido fólico, niacina, colina), minerales y oligoelementos (sodio, potasio, cloruro, calcio, fósforo, magnesio, hierro, zinc, manganeso, flúor, selenio, yodo, cobre).

La composición nutricional que contiene el polvo secado por atomización que contiene la mezcla de oligosacáridos de leche humana y al menos un monosacárido puede ser una fórmula infantil que cumple los requisitos de composición establecidos en el Reglamento (UE) 2016/127 y/o en el Código de Regulaciones Federales (EE. UU.) Título 21 107.100 (especificaciones nutricionales). Las composiciones representativas de las fórmulas infantiles se especifican en la tabla 3.

Tabla 3: Composición de una fórmula infantil representativa. La concentración final se basa en una preparación de 13.5 g del polvo en 90 ml de agua.

		por 100 g de polvo	por 100 ml de fórmula infantil
Energía	kJ	2094-2145	283
	kcal	500-512	67-68
Grasas, de las cuales:	g	24.2-26.2	3.3-3.5
ácidos grasos saturados	g	8.7-9.4	1.2-1.3
ácidos grasos monoinsaturados	g	10.4	1.4
ácidos grasos poliinsaturados	g	5.5-5.9	0.7-0.8

Carbohidratos, de los cuales:	g	56-58	7.4-7.9
Azúcares	g	44-56	6-7.4
de los cuales:			
Lactosa	g	44-56	6-7.4
Neu5Ac	mg	440	60
L-fucosa	mg	300	40
HMO de los cuales	g	4.22-4.81	0.57-0.65
2'-FL	g	1.85-2.22	0.25-0.30
3-FL	mg	555.56-592.6	75-80
LNT	g	1.11	0.15
LNnT	mg	0-111,11	0-15
LNPF-I	mg	0-740,74	0-100
3'-SL	mg	148,15-170,37	20-23
6'-SL	mg	207,4-222,22	28-30
Proteína	g	11,11-11,85	1,5-1,6
Sal	g	0.47-0.59	0.06-0.08
Vitaminas			
Vitamina A	µg	357-358	47.3-48.2
Vitamina D	µg	7.8	1.05
Vitamina E	mg	8.15	1.1
Vitamina K	µg	43.7-44.4	5.9-6.0
Vitamina C	mg	115-118	15-16
Vitamina B1	mg	0.51-0.60	0.068-0.079
Vitamina B2	mg	1.3-1.7	0.18-0.23
Niacina	mg	3.63	0.49
Vitamina B6	µg	526-600	71-81
Ácido fólico	µg	160-164	21.6-21.7
Vitamina B12	µg	1.7-1.9	0.23-0.25
Biotina	µg	22-30	3.0-3.9
Ácido pantoténico	mg	4.6-5.4	0.62-0.72
Minerales			
Sodio	mg	187-236	25.3-31.2
Potasio	mg	673-675	88.8-91.2
Cloruro	mg	327-333	43.1-44.9

Calcio	mg	460-504	62.1-66.5
Fósforo	mg	335-352	45.2-46.5
Magnesio	mg	49.3-56.3	6.66-7.43
Hierro	mg	4.15	0.56
Zinc	mg	3.7-3.8	0.49-0.51
Cobre	µg	274	37
Manganeso	µg	96.3	13
Fluoruro	µg	30.4-32.6	4.1-4.4
Selenio	µg	11.1-12.3	1.5-1.6
Yodo	µg	101.5-103.7	13.7-14

En una realización adicional y/o alternativa, la composición nutricional también contiene microorganismos, preferiblemente microorganismos probióticos. Para aplicaciones en alimentos infantiles, los microorganismos preferidos se derivan o se pueden encontrar en el microbioma de un ser humano sano. Preferiblemente, pero sin limitaciones, los microorganismos se seleccionan de los géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Leuconostoc*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Veilonella*, *Fusobacterium*, *Bacterioides*, *Prevotella*, *Escherichia*, *Propionibacterium* y *Saccharomyces*. En una realización adicional y/o alternativa, el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. lactis, B. longum; Enterococcus faecium; Escherichia coli; Klyveromyces marxianus; Lactobacillus acidophilus, L. bulgaricus, L. casei, L. crispatus, L. fermentum, L. gasseri, L. helveticus, L. johnsonii, L. paracasei, L. plantarum, L. reuteri, L. rhamnosus, L. salivarius, L. sakei; Lactococcus lactis* (incluyendo, entre otros, las subespecies *lactis, cremoris* y *diacetylactis*); *Leuconostoc mesenteroides* (incluidas, entre otras, la subespecie *mesenteroides*); *Pedicoccus acidilactici, P. pentosaceus; Propionibacterium acidipropionici, P. freudenreichii ssp. shermanii; Staphylococcus carnosus; y Streptococcus thermophilus*.

Además de la combinación de organismos vivos, la composición nutricional también puede incluir cultivos de células muertas. En el campo de los probióticos, a veces se utilizan cultivos de células muertas (por ejemplo, bacterias tyndalizadas). Estos cultivos muertos pueden proporcionar proteínas, péptidos, oligosacáridos, fragmentos de la pared celular externa y productos naturales, lo que conduce a la estimulación a corto plazo del sistema inmunitario.

La inclusión de microorganismos probióticos en la composición nutricional, especialmente en presencia de HMO, es particularmente ventajosa, ya que también promueve el establecimiento de una microbiota intestinal saludable.

En una realización adicional y/o alternativa, la composición nutricional también incluye prebióticos tales como galacto-oligosacáridos (GOS), fructo-oligosacáridos (FOS), inulina o combinaciones de los mismos.

La composición nutricional puede presentarse en forma líquida o sólida, incluyendo, entre otros, polvos, gránulos, copos y pellas.

En una realización adicional, la composición nutricional se selecciona del grupo que consiste en formulaciones medicinales, fórmulas infantiles y suplementos dietéticos.

La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a dibujos, pero la invención no está limitada a ellos, sino únicamente por las reivindicaciones.

Cabe señalar que el término "que comprende", tal y como se utiliza en las reivindicaciones, no debe interpretarse como restringido a los medios listados a continuación; no excluye otros elementos o etapas. Por lo tanto, debe interpretarse como que especifica la presencia de las características, números enteros, etapas o componentes mencionados, pero no excluye la presencia o la adición de una o más características, números enteros, etapas o componentes, o grupos de los mismos. Por lo tanto, el alcance de la expresión "un dispositivo que comprende los medios A y B" no debe limitarse a los dispositivos que consisten únicamente en los componentes A y B. Significa que, con respecto a la presente invención, los únicos componentes relevantes del dispositivo son A y B.

Las referencias a "una realización" a lo largo de esta especificación significan que una característica, estructura o rasgo particular descrito en relación con la realización está incluido en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de la frase "en una realización" en diversos lugares a lo largo de esta especificación no se refieren necesariamente siempre a la misma realización. Además, las características, estructuras o rasgos particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada, como resultaría evidente para un experto en la materia a partir de esta divulgación, en una o más realizaciones.

De manera similar, debe apreciarse que, en la descripción de las realizaciones representativas de la invención, diversas características de la invención se agrupan a veces en una sola realización, figura o descripción de la misma con el fin de simplificar la divulgación y facilitar la comprensión de uno o más de los diversos aspectos inventivos. Este procedimiento de divulgación no debe interpretarse como una intención de que la invención reivindicada requiera más características que las expresamente listadas en cada reivindicación. Más bien, como reflejan las siguientes reivindicaciones, los aspectos inventivos pueden requerir menos que todas las características de cualquier realización descrita anteriormente. Por lo tanto, las reivindicaciones que siguen a la descripción detallada se incorporan expresamente a esta descripción detallada, y cada reivindicación se considera por sí misma una realización independiente de la presente invención.

En la descripción y los dibujos proporcionados en el presente documento se exponen numerosos detalles específicos. Sin embargo, se entiende que las realizaciones de la invención pueden ponerse en práctica sin estos detalles específicos. En otros casos, no se han mostrado en detalle procedimientos, estructuras y técnicas bien conocidos con el fin de facilitar la comprensión de la descripción y los dibujos.

Los ejemplos 1 a 7 que se exponen a continuación no forman parte de la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Purificación de 2'-fucosil-lactosa a partir de caldo de fermentación

La producción de 2'-fucosil-lactosa mediante fermentación utilizando una cepa de *E. coli* modificada genéticamente se llevó a cabo tal y como se describe en la solicitud de patente europea No. 16 196 486.1. La 2'-fucosil-lactosa se purificó a partir del caldo de fermentación mediante filtración, cromatografía de intercambio iónico, nanofiltración, diafiltración o electrodiálisis y tratamiento con carbón vegetal, tal y como se describe en el documento WO 2015/106943 A1. La solución resultante que contenía 2'-fucosil-lactosa se sometió a secado por atomización para obtener un producto sólido estable.

Ejemplo 2: Purificación de 3-fucosil-lactosa a partir del caldo de fermentación

La 3-fucosil-lactosa se produjo por fermentación utilizando una cepa de *E. coli* modificada genéticamente, tal y como se describe en la solicitud de patente europea No. 16 196 486.1.

Las células se separaron del medio de cultivo mediante ultrafiltración (umbral de 0,05 µm) (tecnología de membrana CUT, Erkrath, Alemania) seguida de un filtro de flujo cruzado con un MWCO de 150 kDa (Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Alemania). El medio de fermentación libre de células, que contenía aproximadamente 30 g/l de 3-fucosil-lactosa, se hizo pasar por un intercambiador de iones catiónicos fuertes (Lewatit S 2568 (Lanxess, Colonia, Alemania) en forma H^+ para eliminar los contaminantes con carga positiva. A continuación, se ajustó el pH de la solución a pH 7.0 con hidróxido de sodio y se aplicó a un intercambiador de iones aniónicos (Lewatit S6368 A, Lanxess) en forma de cloruro. Ambos intercambiadores de iones se utilizaron en un volumen de 200 L. Tras una segunda filtración (150 kDa; Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Alemania), la solución libre de partículas se concentró 5 veces mediante nanofiltración utilizando una membrana Filmtech NF270 (Dow, Midland, EE. UU.) y 2.5 veces mediante evaporación al vacío. La solución concentrada y una conductividad de aproximadamente 15 mS cm^{-1} se filtraron (10 kDa; Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Alemania), se clarificaron con carbón activado (CAS:7440-44-0, Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) y se desionizaron por electrodiálisis. Para ello se utilizó un aparato de electrodiálisis PC-Cell BED 1-3 (PC-Cell, Heusweiler, Alemania) con una pila de membranas PC-Cell E200 que contenía las siguientes membranas: membrana de intercambio catiónico CEM:PC SK y membrana aniónica AEM:PCAcid60. Se utilizó ácido sulfámico de 0.25 M como electrolito en el procedimiento. Para reducir la coloración marrón causada por las reacciones de Maillard y los productos aldólicos originados en el procedimiento de fermentación, se realizó una segunda ronda de cromatografía de intercambio iónico utilizando el mismo material de intercambio iónico mencionado anteriormente en forma de Na^+ y Cl^-, pero en un volumen de 50 L. Tras concentrar la solución de azúcar por evaporación, se redujo de nuevo la conductividad de 4 mS cm^{-1} a 0,4 mS cm^{-1} o menos mediante electrodiálisis utilizando la PC-Cell BED 1-3 mencionada anteriormente. Para una mayor decoloración, la solución se mezcló con carbón activado (CAS:7440-44-0, Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) y se obtuvo una solución casi incolora por filtración.

Ejemplo 3: Purificación de lacto-N-tetraosa a partir de caldo de fermentación

La producción fermentativa de lacto-N-tetraosa se llevó a cabo utilizando una cepa de *E. coli* BL21 (DE3) *ΔlacZ* modificada genéticamente, con genes integrados genómicamente esenciales para la síntesis *in vivo* de lacto-N-tetraosa, a saber, una N-acetilglucosamina glicosiltransferasa (IgtA de *Neisseria meningitidis* MC58), una β-1,3-galactosiltransferasa (wbdO de *Salmonella enterica subsp. salamae serovar Greenside*), lacY de *E. coli* K12, la UDP-glucosa-4-epimerasa galE y la UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa galU, ambas de *E. coli* K12.

Para la producción fermentativa de lacto-N-tetraosa, la cepa se cultivó en un medio definido de sales minerales, compuesto por 7 g l^{-1} de $NH_4H_2PO_4$, 7 g l^{-1} de K_2HPO_4, 2 g l^{-1} de KOH, 0.3 g l^{-1} de ácido cítrico, 5 g l^{-1} de NH_4Cl, 0.1 mM de $CaCl_2$, 8 mM de $MgSO_4$, oligoelementos (0.101 g l^{-1} de ácido nitrilotriacético, pH 6.5, 0.056 g l^{-1} de citrato férrico de amonio, 0.01 g l^{-1} de $MnCl_2 \times 4\ H_2O$, 0.002 g l^{-1} de $CoCl_2 \times 6\ H_2O$, 0.001 g l^{-1} de $CuCl_2 \times 2\ H_2O$, 0.002 g l^{-1} de ácido bórico, 0.009 g l^{-1} de $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$, 0.001 g l^{-1} de $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$, 0.002 g l^{-1} de Na_2SeO_3, 0.002 g l^{-1} de $NiSO_4 \times 6\ H_2O$) y glucosa al 2 % como fuente de carbono. Se añadió antiespumante (Struktol J673, Schill + Seilacher) cuando fue necesario. El pH se controló con una solución de amoniaco al 25 %. Se añadió lactosa gradualmente hasta alcanzar una concentración final de 15 mM a partir de una solución madre de 216 g l^{-1} de lactosa, y la concentración de lactosa en el medio de cultivo se mantuvo constante durante todo el procedimiento de fermentación. La lactosa residual y la Lacto-N-triosa II, que se acumularon durante el procedimiento como subproductos, se hidrolizaron mediante una segunda cepa de *E. coli* que se añadió al fermentador. Esta cepa expresaba una beta-lactamasa funcional, una beta-N-acetilhexosaminidasa (bbhI de *Bifidobacterium bifidum* JCM1254) y un gal-operón funcional para la degradación de monosacáridos (documento EP 2 845 905 A).

Las células se separaron del caldo de fermentación y el líquido que contenía lacto-N-tetraosa se purificó hasta alcanzar una pureza del 75-80 %, determinada por balance de masa, según el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Los subproductos de carbohidratos contaminantes resultantes de una degradación enzimática y metabolización ineficaces se eliminaron mediante cromatografía utilizando una cromatografía de lecho móvil simulado (SMB), según el documento WO 2015/049331. Alternativamente, la lacto-N-tetraosa se purificó por cristalización con isopropanol. Para la cristalización, la solución que contenía lacto-N-tetraosa se concentró por evaporación hasta una concentración del 20 % y se secó por atomización. Utilizando un secador por atomización NUBILOSA LTC-GMP (NUBILOSA, Constanza, Alemania), la solución se hizo pasar bajo un flujo de nitrógeno a través de las boquillas del secador por atomización con una temperatura de entrada de 130 °C, mientras que el flujo del producto se controló para mantener una temperatura de salida de 67 °C a 68 °C.

El material sólido se añadió a una mezcla de isopropanol y agua (3:1 (vol/vol)) en una proporción de 1 kg de polvo en 12 L de isopropanol/agua. La suspensión se agitó vigorosamente, luego se filtró la lacto-N-tetraosa insoluble y se secó a 40 °C. Partiendo de un material con una pureza del 73-89 %, la lacto-N-tetraosa cristalizada se purificó hasta alcanzar aproximadamente el 95 %, con una recuperación del 85 %. El azúcar se disolvió en agua hasta una concentración del 25 % y se pasó secuencialmente a través de un filtro de 6 kDa (módulo de ultrafiltración Pall Microza SIP-2013, Pall Corporation, Dreieich, Alemania) y un filtro estéril de 0.2 µm. Se obtuvo material sólido mediante secado por atomización del material estéril en las condiciones descritas anteriormente.

Ejemplo 4: Purificación de 3'- y 6'-sialil-lactosa a partir de caldo de fermentación

Para la producción de 3'- y 6'-sialil-lactosa se utilizaron cepas recombinantes de *E. coli* BL21 (DE3) *ΔlacZ*. Las cepas tenían modificaciones genéticas comunes: expresión cromosómica y constitutiva de la glucosamina-6-fosfato sintasa GlmS de *E. coli*, la N-acetilglucosamina 2-epimerasa Slr1975 de *Synechocystis sp.*, la glucosamina 6-fosfato N-acetiltransferasa Gna1 de *Saccharomyces cerevisiae*, la fosfoenolpiruvato sintasa PpsA de *E. coli*, la N-acetilneuraminato sintasa NeuB y la CMP-ácido siálico sintetasa NeuA, estas dos últimas de *Campylo-bacterjejuni*. Además, los genes que codifican la permeasa de lactosa LacY de *E. coli*, cscB (permeasa de sacarosa), cscK (fructocinasa), cscA (hidrolasa de sacarosa) y cscR (regulador transcripcional) de *E. coli* W, y un gal-operón funcional, compuesto por los genes galE (UDP-glucosa-4-epimerasa), galT (galactosa-1-fosfato uridililtransferasa), galK (galactocinasa) y galM (galactosa-1-epimerasa) de *E. coli* K12, se integraron en el genoma de la cepa BL21 y se expresaron de forma constitutiva.

La cepa que sintetiza 3'-sialil-lactosa alberga el gen 3'-sialiltransferasa de *Vibrio sp.* JT-FAJ-16, mientras que la cepa productora de 6'-sialil-lactosa contiene la alfa-2,6-sialiltransferasa plsT6 de *Photobacterium leiognathi* JT-SHIZ-119.

Las cepas productoras de sialil-lactosa se cultivaron en un medio definido de sales minerales, que comprendía 7 g l^{-1} de $NH_4H_2PO_4$, 7 g l^{-1} de K_2HPO_4, 2 g l^{-1} de KOH, 0.3 g l^{-1} de ácido cítrico, 5 g l^{-1} de NH_4Cl, 1 ml l^{-1} de antiespumante (Struktol J673, Schill + Seilacher), 0.1 mM de $CaCl_2$, 8 mM de $MgSO_4$, oligoelementos y 2 % de sacarosa como fuente de carbono. La alimentación con sacarosa (500 g l^{-1}), administrada en la fase de alimentación por lotes, se complementó con 8 mM de $MgSO_4$, 0.1 mM de $CaCl_2$, oligoelementos y 5 g l^{-1} de NH_4Cl.

Los oligoelementos consistían en 0.101 g l^{-1} de ácido nitrilotriacético, pH 6.5, 0.056 g l^{-1} de citrato férrico de amonio, 0.01 g l^{-1} de $MnCl_2 \times 4\ H_2O$, 0.002 g l^{-1} de $CoCl_2 \times 6\ H_2O$, 0,001 g l^{-1} de $CuCl_2 \times 2\ H_2O$, 0.002 g l^{-1} de ácido bórico, 0.009 g l^{-1} de $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$, 0.001 g l^{-1} de $Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$, 0.002 g l^{-1} de Na_2SeO_3, 0.002 g l^{-1} de $NiSO_4 \times 6\ H_2O$.

Para la formación de sialil-lactosa se empleó una alimentación de lactosa de 216 g l^{-1}. El pH se controló utilizando una solución de amoniaco (25 % v/v). La fermentación por lotes alimentados se llevó a cabo a 30 °C bajo aireación y agitación constantes. Para eliminar la lactosa residual al final de la fermentación, se añadió β-galactosidasa al recipiente de fermentación. Los monosacáridos resultantes fueron metabolizados por la cepa productora.

A continuación, el líquido libre de células se desionizó mediante cromatografía de intercambio iónico. En primer lugar, se eliminaron los contaminantes catiónicos en un intercambiador catiónico fuerte en un volumen de 200 L (Lewatit® S 2568 (Lanxess, Colonia, Alemania) en forma H^+. Se ajustó el pH de la solución obtenida a 7.0 con NaOH. En una segunda etapa se eliminaron los iones aniónicos y los colorantes no deseados de la solución utilizando el intercambiador aniónico fuerte Lewatit® S 6368 S (Lanxess, Colonia, Alemania) en forma de cloruro.

El intercambiador iónico tenía un volumen de lecho de 200 L. Mediante una segunda etapa de filtración en el filtro de flujo cruzado (umbral de 150 kDa) (Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Alemania), se eliminaron los precipitados procedentes de la acidificación de la solución. Para concentrar el azúcar, la solución se nanofiltró en un Dow FILMTECH NF270-4040 (Inaqua, Mönchengladbach, Alemania) o, alternativamente, en una membrana Trisep 4040-XN45-TSF (umbral de 0.5 kDa) (Microdyn-Nadir, Wiesbaden, Alemania). Con este último, del producto se separó el monosacárido N-acetilglucosamina, procedente del procedimiento de fermentación y que contaminaba la solución de sialil-lactosa. A continuación, la solución concentrada de sialil-lactosa se trató con carbón activado (CAS:7440-44-0, Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) para eliminar colorantes como los productos de la reacción de Maillard y los productos de la reacción aldólica. Para separar la sialil-lactosa de los subproductos procedentes del procedimiento de fermentación, como el ácido siálico y la N-acetilglucosamina, la solución se filtró con una membrana de umbral de 1 kDa GE4040F30 (GE water & process technologies, Ratingen, Alemania) y se diafiltró hasta alcanzar una conductividad de 0,6 a 0,8 mS cm^{-1}. La solución diluida se concentró en un evaporador rotatorio hasta una concentración de aproximadamente 300 g L^{-1}. En una separación cromatográfica final se eliminaron otros azúcares contaminantes, como la disialil-lactosa. Para ello, la solución concentrada se aplicó a una resina de intercambio iónico débil en forma de acetato (Amberlite FPA51, Dow Chemical, Michigan, EE. UU.). Mientras que la sialil-lactosa rara vez se une a la resina, la disialil-lactosa se adsorbe. Así, la sialil-lactosa se eluye con acetato de amonio de 10 mM, mientras que la disialil-lactosa se eluye con acetato de amonio de 1 M. Para eliminar el acetato de amonio, la sialil-lactosa se precipitó con un exceso de etanol 10 veces superior. La fracción sólida se filtró y se secó.

El producto se finalizó pasando una solución de sialil-lactosa al 20 % secuencialmente a través de un filtro de 6 kDa (módulo de ultrafiltración Pall Microza SIP-2013, Pall Corporation, Dreieich, Alemania) y un filtro estéril de 0.2 µm.

Se secó por atomización una parte de la solución utilizando un secador por atomización Büchi (Büchi Mini Spray Dryer B-290) (Büchi, Essen, Alemania), aplicando los siguientes parámetros: temperatura de entrada: 130 °C, temperatura de salida 67 °C-71 °C, flujo de gas 670 L/h, aspirador 100 %.

La 6'-sialil-lactosa secada por atomización tenía una pureza del 91 %, mientras que el material de 3'-sialil-lactosa tenía una pureza del 93 %.

Ejemplo 5: Preparación de mezclas de HMO

Se prepararon mezclas de diferentes HMO a partir de productos sólidos. Para ello, se secaron por atomización los HMO individuales y se mezclaron los polvos obtenidos. La mezcla HMO I contenía 2'-fucosil-lactosa y lacto-N-tetraosa en una proporción del 70 % en peso al 30 % en peso; la mezcla HMO II contenía 2'-fucosil-lactosa (52 % en peso), 3-fucosil-lactosa (13 % en peso), lacto-N-tetraosa (26 % en peso), 3'-sialil-lactosa (4 % en peso) y 6'-sialil-lactosa (5 % en peso). Los polvos mezclados se disolvieron en agua hasta obtener una solución que contenía un 20 % en peso de HMO, y la solución resultante se secó por atomización de nuevo utilizando el secador por atomización Büchi, tal y como se describe en el ejemplo 4.

El análisis del polvo secado por atomización resultante reveló que tenía la misma composición con respecto a la proporción de los diferentes HMO que la solución sometida a secado por atomización.

Ejemplo 6: Preparación de mezclas de sacáridos

Se disolvieron 8 g de 2'-FL y 1 g de L-fucosa en 50 ml de agua destilada. La solución resultante se secó por atomización utilizando el secador por atomización Büchi, tal y como se describe en el ejemplo 4. Se obtuvo un polvo secado por atomización que consistía esencialmente en 2'-FL y L-fucosa, en el que la proporción de 2'-FL y L-fucosa en el polvo secado por atomización era idéntica a la proporción de 2'-FL y L-fucosa en la solución sometida al secado por atomización. Por lo tanto, la L-fucosa se puede secar por atomización en presencia de un HMO.

Ejemplo 7: Caracterización de oligosacáridos de leche humana secados por atomización

1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un Mettler Toledo 821e (Mettler Toledo, Giessen, Alemania) se determinaron los eventos térmicos de oligosacáridos de leche humana secados por atomización, concretamente 3-fucosil-lactosa, 6'-sialil-lactosa, 3'-sialil-lactosa, lacto-N-tetraosa y mezclas secadas por atomización de oligosacáridos de leche humana, una mezcla (HMO-Mix I) de 2'-fucosil-lactosa/lacto-N-tetraosa y una mezcla (HMO Mix II) de 2'-fucosil-lactosa, 3-fucosil-lactosa, lacto-N-tetraosa, 6'-sialil-lactosa y 3'-sialil-lactosa, respectivamente.

Se utilizó un Mettler Toledo 821e (Mettler Toledo, Giessen, Alemania) para determinar los eventos térmicos de los productos secados por atomización (temperatura de transición vítrea (Tg), otros eventos exotérmicos y endotérmicos).

Se analizaron aproximadamente 25 mg de oligosacáridos de leche humana secados por atomización en crisoles de aluminio ondulado (Mettler Toledo, Giessen, Alemania). Las muestras se enfriaron a 0 °C a 10 K/min y se recalentaron a 100 °C con una velocidad de barrido de 10 K/min. Después de enfriar las muestras a 0 °C en un segundo ciclo de calentamiento, se volvieron a calentar a 150 °C. El punto medio del cambio endotérmico de la línea de base durante el escaneo de calentamiento se tomó como temperatura de transición vítrea (Tg). Los picos exotérmicos y endotérmicos se registran mediante la temperatura máxima y la energía normalizada del evento.

El primer escaneo de calentamiento en todas las muestras mostró un evento principal de transición vítrea en el flujo de calor total, como lo demuestra una transición de paso principal en el rango de aproximadamente 48-58 °C; en la mayoría de las muestras, el evento principal de transición vítrea observado en el primer escaneo de calentamiento se repitió en el segundo escaneo de calentamiento. Los resultados de los análisis DSC se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Eventos térmicos de los HMO determinados por calorimetría diferencial de barrido

Muestra	Primer escaneo de calentamiento	Segundo escaneo de calentamiento
	Tg [°C]	Tg [°C]
3-fucosil-lactosa	57,6	59,9
Lacto-N-tetraosa	49,9	79,4
6'-sialil-lactosa	47,6	49,6
3'-sialil-lactosa	48,8	54,3
2'-fucosil-lactosa/lacto-*N*-tetraosa	56,3	59
Mezcla de HMO	54,2	55,6

Para la 3-fucosil-lactosa se detectó un pico de relajación endotérmica después de la Tg en el primer escaneo de calentamiento. Para la lacto-N-tetraosa se detectó una Tg mucho más alta, de aproximadamente 79 °C, en el segundo escaneo de calentamiento en comparación con la de las otras muestras. Esto podría deberse a un evento endotérmico durante el primer escaneo de calentamiento a aproximadamente 89 °C (-6.04 J/g). Al igual que en el caso de la 3-fucosil-lactosa, también se detectó un pico de relajación endotérmica después de la Tg para la 6'-sialil-lactosa, aunque en esta muestra se produjo además un evento endotérmico a 77 °C (-0.22 J/g). No se detectaron eventos endotérmicos para la 3'-sialil-lactosa y la mezcla HMO I; para la mezcla HMO II, el evento endotérmico durante el primer escaneo de calentamiento se produjo a 79 °C (0.34 J/g).

2. Difracción de rayos X en polvo (XRD)

Se utilizó la difracción de rayos X en polvo de ángulo amplio (XRD) para estudiar la morfología de los productos liofilizados. Se utilizó el difractómetro de rayos X Empyrean (Panalytical, Almelo, Países Bajos) equipado con un ánodo de cobre (45 kV, 40 mA, emisión Kα1 a una longitud de onda de 0.154 nm) y un detector PIXcel3D. Se analizaron aproximadamente 100 mg de las muestras secadas por atomización en modo de reflexión en el rango angular de 5-45° 2θ, con un tamaño de paso de 0.04° 2θ y un tiempo de recuento de 100 segundos por paso.

Todos los oligosacáridos singulares, así como las mezclas de HMO I y II, mostraron un estado totalmente amorfo (figuras 1 a 6). En el caso de la lacto-N-tetraosa, se detectó una segunda señal (amorfa) en torno a 9-10°.

3 Difracción láser

El tamaño de las partículas de polvo se evaluó mediante difracción láser. El sistema detecta la luz dispersa y difractada mediante una matriz de elementos sensores dispuestos concéntricamente. A continuación, el algoritmo del software aproxima el recuento de partículas calculando los valores z de los valores de intensidad de la luz que llegan a los diferentes elementos sensores. El análisis se realizó utilizando un sistema de difracción láser cuantitativo (qLD) SALD-7500 Aggregate Sizer (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón).

Se dispersó una pequeña cantidad (punta de espátula) de cada muestra en 2 ml de isooctano y se homogeneizó mediante ultrasonidos durante cinco minutos. La dispersión se transfirió a una celda de lotes llena de isooctano y se analizó en modo manual.

Los ajustes de adquisición de datos fueron los siguientes: recuento medio de señales por medición: 128, recuento de acumulación de señales: 3 e intervalo: 2 segundos.

Antes de la medición, el sistema se puso a cero con isooctano. Cada dispersión de muestra se midió 3 veces y se registraron los valores medios y la desviación estándar. Los datos se evaluaron con el software WING SALD II versión V3.1. Dado que se desconocía el índice de refracción de la muestra, se utilizó el índice de refracción de las partículas de azúcar (disacárido) (1.530) para determinar los perfiles de distribución del tamaño. Se indican los valores de tamaño para el diámetro medio y mediano.

Los tamaños medios de las partículas de todas las muestras fueron muy similares, aunque se midieron valores ligeramente inferiores para HMO-Mix II. Las características del tamaño de las partículas se resumen en la tabla 5. Además, la distribución del tamaño de las partículas mostró la presencia de una población de tamaño principal para todas las muestras.

Tabla 5: Tamaño de las partículas de HMO determinado por difracción láser

Tamaño	3-FL	LNT	6'-SL	3'-SL	Mezcla HMO I	Mezcla HMO II
Media [nm]	119.2 ± 0.5	117.3 ± 0.7	113.8 ± 1.5	115.4 ± 0.6	113.1 ± 0.3	97.3 ± 5.3
Mediana [nm]	141.3 ± 0.0	141.3 ± 0.0	141.3 ± 0.0	121.9 ± 16.7	141.3 ± 0.0	112.2 ± 0.0

REIVINDICACIONES

1. Polvo secado por atomización que contiene una mezcla de oligosacáridos de leche humana estructuralmente distintos y al menos un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico, en el que el polvo secado por atomización comprende

Sacárido	[% en peso]
2'-fucosil-lactosa (2'-FL)	30.0 - 55.0
3-fucosil-lactosa (3-FL)	10.0 - 15.0
lacto-*N*-tetraosa (L*N*T)	20.0 - 30.0
lacto-*N*-neotetraosa (L*N*nT)	0.0 - 5.0
lacto-N-fucopentosa I (L*N*FPI)	0.0 - 20.0
3'-sialil-lactosa (3'-SL)	2.0 - 4.0
6'-sialil-lactosa (6'-SL)	4.0 - 6.0
Ácido N-acetilneuramínico (NeuAc)	0.0 - 10.0
L-fucosa	0.0 - 6.0
Total	100.0

con la excepción de una composición que comprende

Sacárido	[% en peso]
2'-fucosil-lactosa (2'-FL)	34
3-fucosil-lactosa (3-FL)	11
lacto-*N*-tetraose (L*N*T)	20
lacto-*N*-neotetraosa (L*N*nT)	2
lacto-N-fucopentosa I (L*N*FPI)	13
3'-sialil-lactosa (3'-SL)	3
6'-sialil-lactosa (6'-SL)	4
Ácido N-acetilneuramínico (NeuAc)	8
L-fucosa	5
Total	100

2. El polvo secado por atomización según la reivindicación 1, en el que el polvo secado por atomización contiene al menos un 80 % en peso, al menos un 85 % en peso, al menos un 90 % en peso, al menos un 93 % en peso, al menos un 95 % en peso o al menos un 98 % en peso de oligosacáridos de leche humana.

3. El polvo secado por atomización según la reivindicación 1 o 2, en el que al menos un HMO de la mezcla, preferiblemente todos los HMO de la mezcla, están presentes en forma amorfa.

4. El polvo secado por atomización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos un monosacárido, preferiblemente todos los monosacáridos, están presentes en forma amorfa.

5. El polvo secado por atomización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polvo secado por atomización contiene ≤ 15 % en peso de agua, preferiblemente ≤ 10 % en peso de agua, más preferiblemente ≤ 7 % en peso de agua, del modo más preferible ≤ 5 % en peso de agua.

6. Uso del polvo secado por atomización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de una composición nutricional, preferiblemente de una fórmula infantil.

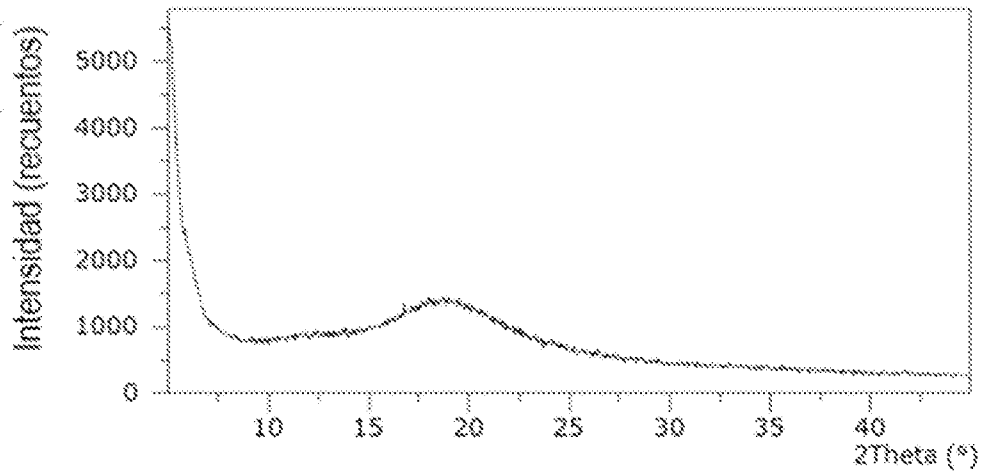

Intensidad (recuentos)
5000
4000
3000
2000
1000
0
10
15
20
25
30
35
40
2Theta (°)

FIG. 1

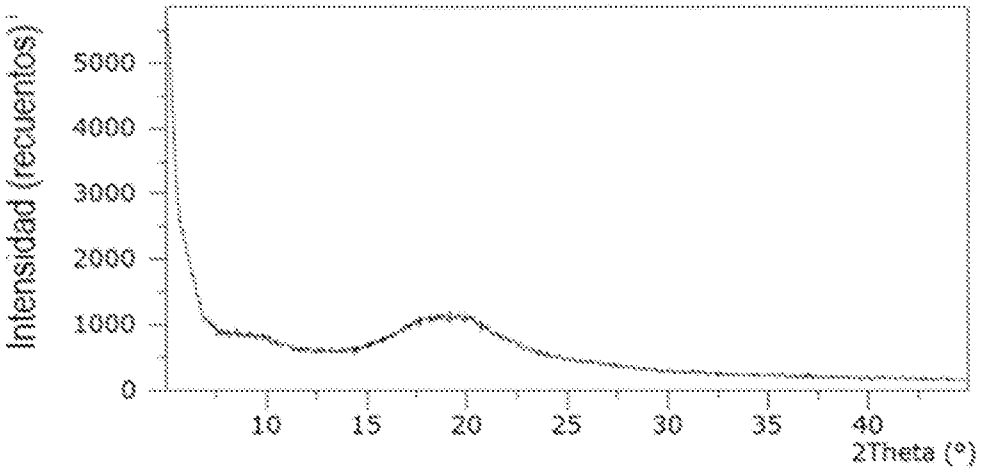

Intensidad (recuentos)
5000
4000
3000
2000
1000
0
10
15
20
25
30
35
40
2Theta (°)

FIG. 2

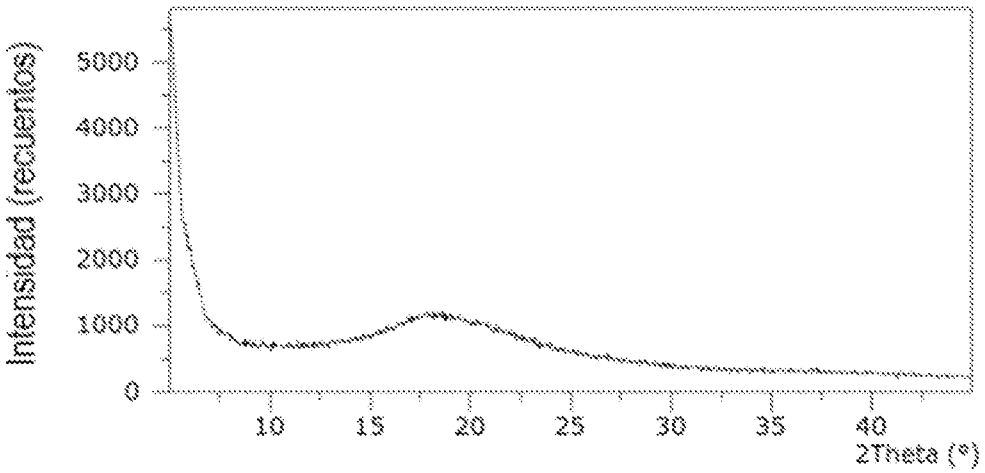

Intensidad (recuentos)
5000
4000
3000
2000
1000
0
10
15
20
25
30
35
40
2Theta (°)

FIG. 3

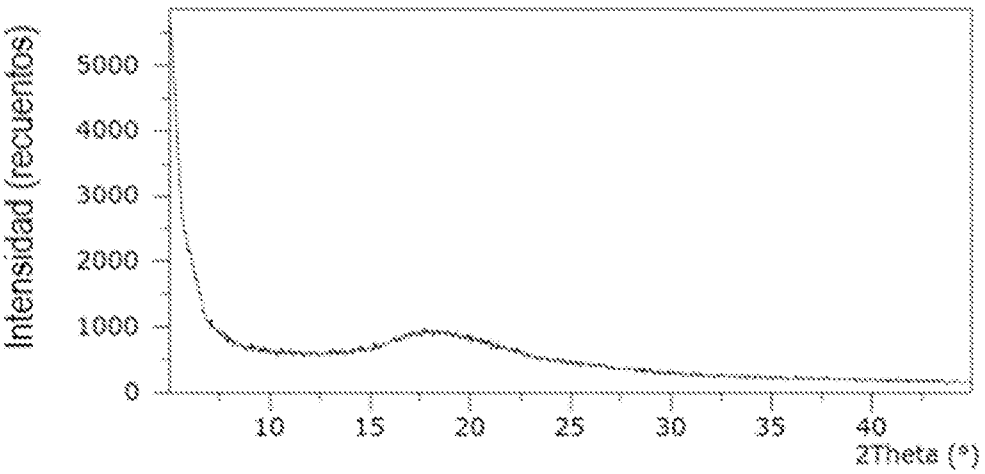

Intensidad (recuentos)
5000
4000
3000
2000
1000
0
10
15
20
25
30
35
40
2Theta (°)

FIG. 4

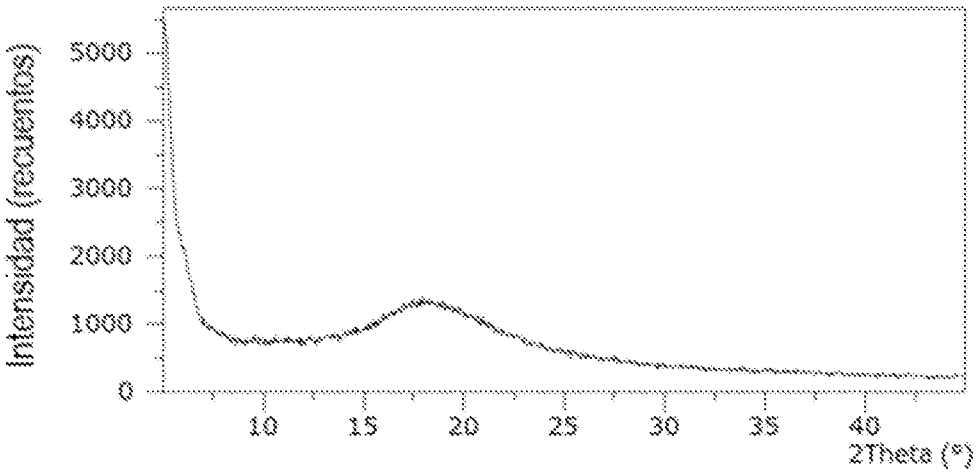

Intensidad (recuentos)
5000
4000
3000
2000
1000
0
10
15
20
25
30
35
40
2Theta (°)

FIG. 5

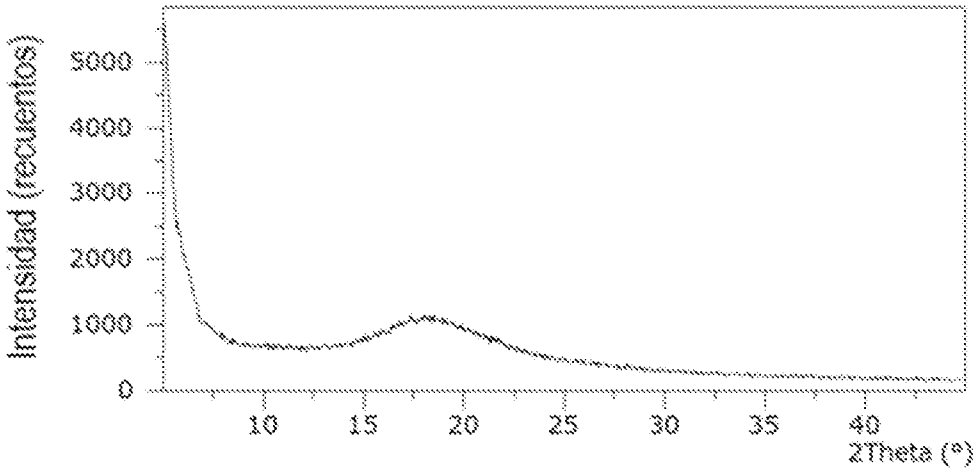

Intensidad (recuentos)
5000
4000
3000
2000
1000
0
10
15
20
25
30
35
40
2Theta (°)

FIG. 6