

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE DE  
DIFERENTES ESPECIES POR TECNOLOGÍA DE  
MEMBRANAS**

**TESIS DOCTORAL**

**Antonio Martínez Férez**

**2004**





**OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE DE DIFERENTES ESPECIES POR  
TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS**

Memoria que presenta el Ingeniero Químico Antonio Martínez Férrez para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Granada, 27 de noviembre 2003

Fdo: Antonio Martínez Férrez

ENCARNACIÓN JURADO ALAMEDA, Catedrática de Ingeniería Química y Directora del Departamento del mismo nombre,

CERTIFICA: Que el presente trabajo sobre "Obtención de oligosacáridos de leche de diferentes especies por tecnología de membranas" ha sido realizado en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada en colaboración con el Departamento de Biomedicina de Puleva Biotech S.A. bajo la dirección de la Dra. Emilia M<sup>a</sup> Guadix Escobar y del Dr. Julio J. Boza Puerta por el Ingeniero Químico Antonio Martínez Férrez para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.



Fdo: Encarnación Jurado Alameda

Los directores de la Tesis

Fdo: Emilia M. Guadix Escobar  
Prof. Titular Ingeniería Química

Fdo: Julio J. Boza Puerta  
Subdirector General Puleva Biotech S.A.

## **SUMMARY OF THE RESEARCH WORK**

## **OBTENTION OF OLIGOSACCHARIDES FROM MILK OF DIFFERENT SPECIES BY MEMBRANE TECHNOLOGY**

Breast milk is the ideal nourishment for newborn children, providing all the necessary nutrients for their adequate growth and development, such as proteins, fats, carbohydrates, minerals and vitamins. In addition, breast milk is the origin of a range of compounds with critical biochemical and physiological properties for the development and growth of some newborn child's organs and tissues, as well as providing defence mechanisms against antigens and pathogenic agents. Namely, breast milk contains hormones, growth factors, enzymes, proteins, bioactive peptides, nucleotides, polyamines, oligosaccharides and long-chain polyunsaturated fatty acids. As a whole, these compounds are called "milk trophic factors". In particular, oligosaccharides are the third largest component of human milk, that contains around 8-10 g/L and more than 130 different structures, which implies a complexity and variability of structures not found in milk from other species.

The interest for oligosaccharides started about a hundred years ago after observing that these components were most likely the factors responsible for the development of a bifidogenic flora in breastfed children. Nowadays, milk oligosaccharides are thought to be beneficial for the human milk fed infant with regard to their prebiotic and anti-infective properties. Indeed, there is currently a great interest in the role of these oligosaccharides as pathogen receptors. Since they are synthesized by the same glycosyltransferases that join in the synthesis of glycoproteins and glycolipids from the endothelium cells surface, it is possible the appearance of similarities among these glyco-compounds and milk oligosaccharides. This fact stands up the hypothesis that asserts oligosaccharides may mimic cellular receptors for pathogenic microorganisms, thus producing specific interactions between these oligosaccharides and pathogens and acting as intestinal mucosa cell protectors.

Another important research topic is the influence of oligosaccharides on leukocyte-endothelial cell interactions. Presently, there are therapeutic agents that block these interactions having dramatic effects on the progression of inflammatory responses in numerous animal models. This effect could be obtained by applying the appropriate antibody or using specific ligands (enzymatic synthesized carbohydrates) for selectins, a family of cell adhesion molecules, which are directly implied on cell adhesion phenomena during inflammatory processes. It has been demonstrated that many sialylated and fucosylated oligosaccharides from human milk have similar effects.

Besides all these properties previously raised, human milk oligosaccharides would be able to develop an important function as suppliers of sialic acid, essential for the infant brain development, and galactose, the main component of galactocerebrosides, the predominating glycolipid in myelin and cell membranes of neurones. Thus a possible role of milk oligosaccharides is that they may ensure that the levels of these monosaccharides do not become

limiting in the young mammal when its organism is not capable of providing all the amount needed, for example, during the period of myelination and brain development.

On the basis of all these biological functions previously described for human milk oligosaccharides, which reveal its important action in the development and growth of the newborn, the addition of these compounds to infant formula would contribute a new step in the difficult challenge of imitate the human milk composition. On the other hand, besides of the potential application in infant nutrition, milk oligosaccharides would find a market for supplementation of specific functional foods for the elderly destined to the prevention of infections, and even in clinical and hospital nutrition, for the treatment of patients with certain pathologies, contributing to a better and fast recovery, and definitely, to improve their quality of life.

Unfortunately, in spite of the relevance of oligosaccharides for infant nutrition, most companies do not supplement their formulas with them, since of the extreme difficulty of synthesis or isolation, in the case of finding a natural source enriched in these biomolecules. In fact, no company supplements their infant formulas with oligosaccharides similar to those found in human milk, and the ones doing so, just enrich with fructo- and/or galacto-oligosaccharides, very simple structures which possess a prebiotic effect stimulating *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* in the gut, but where the other important functions described for human milk oligosaccharides are lacking. Other components that currently are added with similar limitations are isomalto-oligosaccharides and oligosaccharides isolated from soy.

In this sense, the research work described in this Thesis, belongs to the research activities that the Bioreactor Group from the Department of Chemical Engineering of the University of Granada in collaboration with the Department of Biomedicine from Puleva Biotech S.A. are carrying out for the development of new techniques to produce and purify bioactive compounds. In summary, the objectives of this work are the following:

- Find a natural source of oligosaccharides similar to those found in breast milk for infant nutrition, among the milk from the main farm mammals: cow, goat and sheep milk.
- Evaluation of its functional activity at a gastrointestinal level studying the influence of oligosaccharides on the differentiation (alkaline-phosphatase, leucin-aminopeptidase and disacaridases activity), proliferation (taking the PCNA as biomarker) and expression of mucins (MUC2, MUC4 y MUC5B) and “trefoil-factors” (TFF1 and TFF3) of cultured intestinal cells (Caco-2 and HT29/MTX).
- Evaluation of its functional activity at an immunological level by means of the determination of the influence of oligosaccharides on the monocytes adhesion to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) stimulated with TNF- $\alpha$  under flow conditions.

- Recovery of the oligosaccharide fraction by membrane technology. The aim pursued is to design and implement an ultrafiltration process for the separation of the 90-95% of the oligosaccharide fraction from the major proteins, caseins and whey proteins, without altering its biological properties neither its bioavailability.
- Dynamic modelling of the ultrafiltration process.
- Optimisation of the separation process to minimise the filtration area, which would determine the most economic way of operation and would provide essential information for the scale up of the process.

The results obtained are exposed subsequently:

#### **Selection of the natural source of oligosaccharides.**

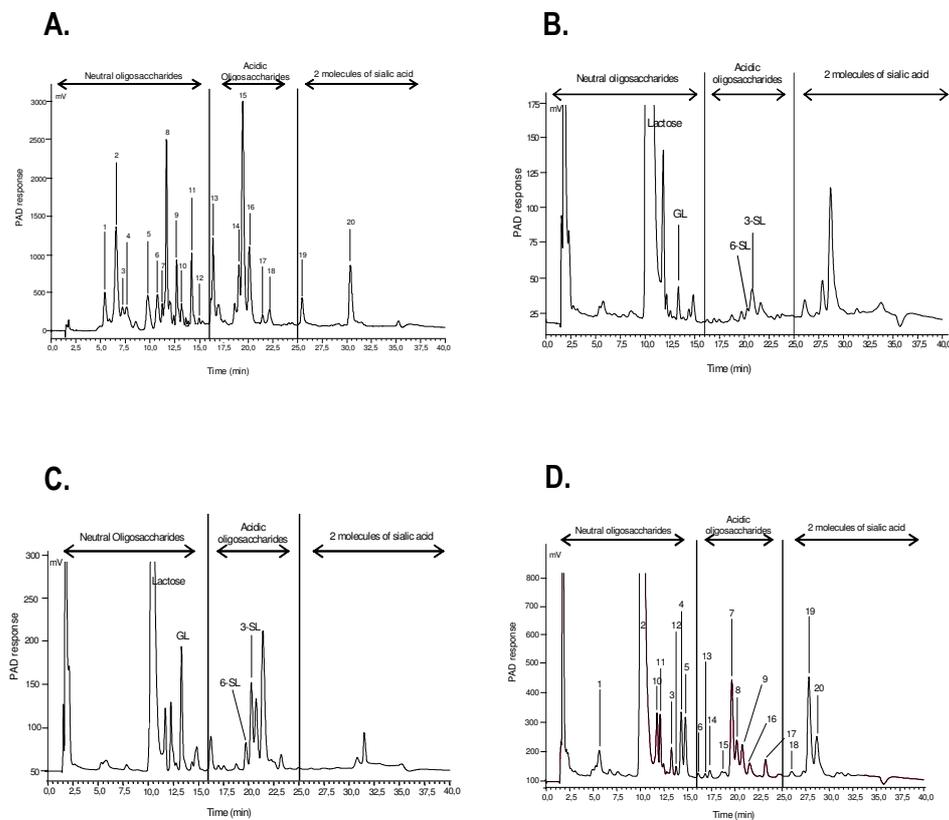
Goat milk is a good natural source of oligosaccharides regarding to both composition and concentration, and the best among the commercially available milks examined (cow and sheep), containing a large array of acidic oligosaccharides and N-acetyl-glucosaminyl-lactose together with galactosyl-lactose as major neutral structures. These qualities have been proved by the following analytical techniques: gel filtration chromatography and high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) for the quantification and high-performance thin layer chromatography (HP-TLC) and fast atom bombardment-mass spectrometry (FAB-MS) for the characterization.

Although the content of oligosaccharides detected in goat milk is significantly lower compared to mature human breast milk, however, structurally goat milk oligosaccharides and glycoconjugates are similar to those found in human milk. Thus, it is reasonable to assume that the bioactivity of such molecules would also be similar and therefore can be used in products for human nutrition.

The values of concentration of oligosaccharides and lactose detected in goat, cow, sheep and human milk are shown in the following table:

<b>Animal milk</b>	<b>Oligosaccharides (g/L)</b>	<b>Lactose (g/L)</b>
Goat milk	0.25 – 0.30	45
Bovine milk	0.03 – 0.06	46
Ovine milk	0.02 – 0.04	48
Human milk	5 – 8	68

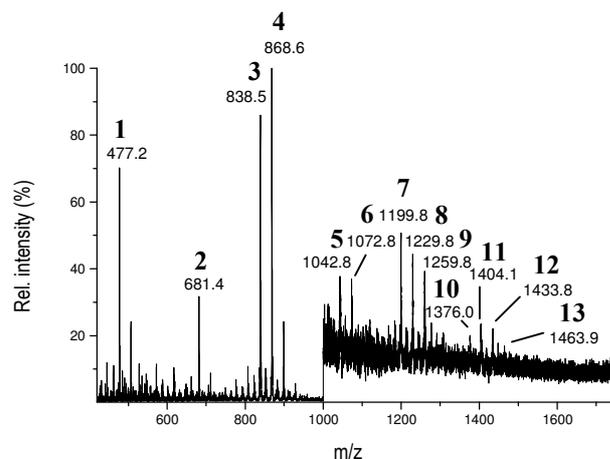
The analysis by HPAEC-PAD of each sample is shown subsequently:



Oligosaccharides profile by HPAEC-PAD of human (A), ovine (B), bovine (C) and caprine milk (D).

As can be seen in the previous figures, the chromatographic profile of goat milk is the most similar to human milk, showing a greater number of peaks as compared to the chromatograms of sheep or cow's milk, which show a limited number of structures. Besides, the figures show that the sialylated fraction of goat milk is rich in structures containing both one and two molecules of sialic acid, like human milk, while the sheep milk acidic fraction contains mainly structures with two molecules of sialic acid and the cow's milk acidic fraction shows molecules with just one molecule of sialic acid.

The next figure shows the FAB-MS spectra from the goat milk oligosaccharide fraction, including some acidic and neutral permethylated oligosaccharides. By this technique, we found 15 new oligosaccharide structures that have never been reported so far to be present in goat milk: 4 are neutral and 11 are acidic oligosaccharides.



FAB-MS spectra of the goat milk oligosaccharide fraction.

In summary, the major oligosaccharides detected in goat milk by HPAEC-PAD and FAB-MS, their abbreviations and concentrations are collected in the following table.

Abbreviation	Name	Concentration (g/L)
<b>Acidic oligosaccharides</b>		
6-SL	6-Sialyl-lactose	0.07 – 0.08
3-SL	3-Sialyl-lactose	0.05 – 0.06
NGL	N-glycolyl-neuraminyllactose	0.03 – 0.04
SLNH	Sialyl-lacto-N-hexaose	0.001 – 0.005
DSL	Di-sialyl-lactose	0.001 – 0.005
SNGL	Sialyl-N-glycolyl-neuraminyllactose	0.001 – 0.005
SHL	Sialyl-hexosyl-lactose	Trace
NGHL	N-glycolyl-neuraminyllactose	Trace
SNGHL	Sialyl-N-glycolyl-neuraminyllactose	Trace
DSHL	Di-sialyl-hexosyl-lactose	Trace
DNGL	Di-N-glycolyl-neuraminyllactose	Trace
SDHL	Sialyl-di-hexosyl-lactose	Trace
DNGHL	Di-N-glycolyl-neuraminyllactose	Trace
NGLNH	N-glycolyl-neuraminyllactose	Trace
<b>Neutral oligosaccharides</b>		
GL	Galactosyl-lactose	0.05 – 0.06
NAL	N-acetyl-glucosaminyllactose	0.03 – 0.04

LNH	Lacto-N-hexaose	0.001 – 0.005
NALNH	N-acetyl-glucosaminyllacto-N-hexaose	0.001 – 0.005
DNAL	Di-N-acetyl-glucosaminyllactose	0.001 – 0.005
NAHL	N-acetyl-glucosaminyll-hexosyll-lactose	Trace
NADHL	N-acetyl-glucosaminyll-di-hexosyll-lactose	Trace
<b>Total oligosaccharides</b>		0.25 – 0.30

***Evaluation of the functional activity of goat milk oligosaccharides at a gastrointestinal level.***

Goat milk oligosaccharides induce the intestinal epithelium maturation, which involves a major resistance to the adhesion of pathogens on the epithelial surface, and stimulate the cellular differentiation, but not the cellular proliferation, since:

- the addition of purified goat milk oligosaccharides to the culture media of Caco-2 cells increases the majority of the enzymatic activities assayed, like alkaline-phosphatase, lactase, maltase and saccharase, generating at the same time a tendency of increase of the leucin-aminopeptidase activity.
- the supplementation of the culture media of Caco-2 and HT29/MTX cells with goat milk oligosaccharides, does not produce any significant alteration in the levels of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a biomarker of proliferation widely used to study the effects of different nutrients present in the intestinal lumen on the maintenance and proliferation of the colon epithelium.

Up to now, the interest for oligosaccharides has been focused on its role as pathogen receptors, protecting the intestinal mucosa against the attack of pathogenic bacteria or as growth factors for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, but its implication on epithelial cells differentiation phenomena has never been addressed. In this sense, it has been suggested that the glycosylation of the intestinal epithelium is a process regulated by the development, in which probiotic bacteria and trophic factors present in the diet could have an important effect. This immaturity of the small intestine could be a determinant factor in the colonization by microorganisms, being directly related to intestinal infections in children. Therefore, the oligosaccharide fraction from human milk or any other ruminant, like goat milk oligosaccharides, enriched in sialic acid, N-acetyl-glucosamine, glucose, galactose and N-glycolyl-neuraminic acid could have an influence in the glycosylation patterns of epithelial cells toward a major level of differentiation.

On the other hand, the addition of purified goat milk oligosaccharides to the culture media has influence on the genetic expression of mucoproteins and “trefoil-factors” synthesis in Caco-2 and HT29/MTX cells, producing a significant and specific decrease in the expression of MUC2, MUC4 and MUC5B. Moreover, this supplementation

decreases significantly the expression of TFF1 and TFF3 in Caco-2 cells, but does not produce any effect in HT29/MTX cells.

***Evaluation of the functional activity of goat milk oligosaccharides at an immunological level.***

The supplementation of the culture media with goat milk oligosaccharides inhibits *in vitro* the adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) stimulated with TNF- $\alpha$  under flow conditions in 21.1%, which suggests the existence of similar epitopes of selectins ligands, developing an important action on the cellular adhesion cascade, which lead to the extravasation of blood cells to tissues during inflammatory processes.

This result has been obtained by means of an hydrodynamic *in vitro* assay where the circulation of monocytes into the blood, the endothelium and the interaction between both has been simulated.

The selectins are classified in three different types, namely E-, L-, and P-selectins, depending on the molecule where they have the capability to be expressed: endothelium cells upon stimulation with cytokines, leukocytes or activated platelets. They play a very important role in the cellular adhesion cascade, since they are capable to withdraw leukocytes from the blood circulation. These cells start a tethering or rolling on the endothelium wall, receiving signals that produce the signal transduction cascade which activate integrins, another family of cell adhesion molecules responsible for the firm adhesion. The existence of similar epitopes among the human milk oligosaccharide fraction to selectins ligands, and the fact that they are minimally digested in the gastrointestinal tract of the infant and are partially absorbed in breastfed children, reinforces the hypothesis that asserts human milk oligosaccharides could have not only functions in the gut, but also to systemic level, as for example, in inflammatory processes.

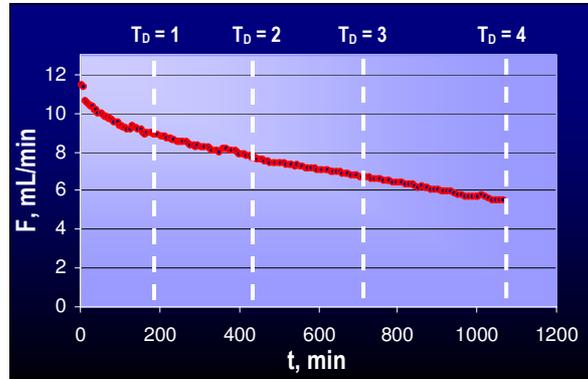
In this sense, since the main structures found in goat milk are also present in human milk and they are also capable of inhibit the cellular adhesion of monocytes, we could postulate that goat milk oligosaccharides could have the same protective action than human milk oligosaccharides. In any case, in order to confirm these results, we are carrying out different studies to discern if these oligosaccharide structures could be immunomodulators *in vivo*.

***Recovery of the oligosaccharide fraction by membrane technology.***

The skimmed goat milk tangential ultrafiltration process with tubular ceramic membrane modules of molecular weight cut-off (MWCO) of 50 KDa has been carried out in the following operating conditions: T = 30°C, velocity of recirculation  $v = 3.30$  m/s and transmembrane pressure  $P_{TM} = 0.90$  bar. This process permits the separation of the 90-95% of the oligosaccharide fraction from the major proteins, caseins and whey proteins, without altering its biological properties neither its bioavailability.

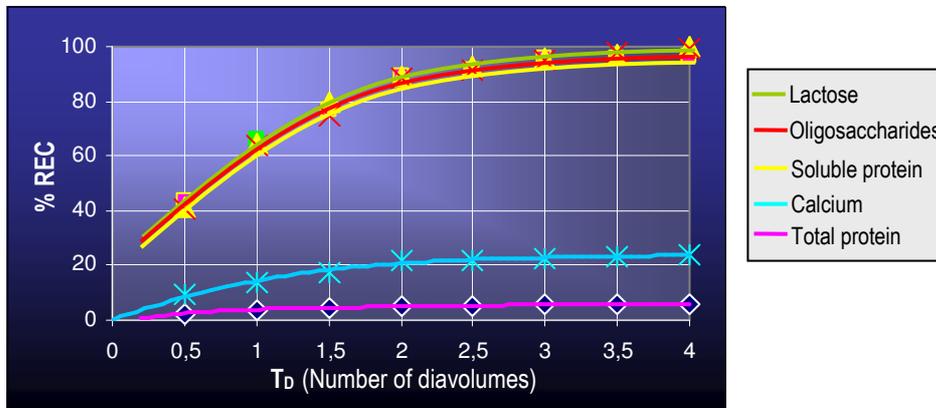
To this end, a number of experiments in the diafiltration mode have been carried out, which have been monitored by measuring the volume of permeate with time and the concentrations in the feed, retentate and accumulated permeate of oligosaccharides, lactose, calcium, casein, soluble protein and total protein each half

diafiltration cycle. Subsequently, the evolution of the permeate flow,  $F$ , and the recovered percentage (REC) of each component during the process are shown.



Evolution of the permeate flow vs. time.

In this figure, a progressive decrease of the permeate flow during the process can be seen. This fall, is due to the decrease of the pore size as a result of the membrane fouling caused by the levels of calcium in the retentate, which has been identified as one of the most important factors responsible of fouling in dairy products, because of its precipitation as tricalcium phosphate and its capability to link the membrane and the protein fraction when it is in soluble form.



Recovered percentage of each component vs. number of diavolumes ( $T_D$ ).

Concerning to the composition of the permeate, this figure shows that after the third diafiltration cycle, more than 95% of the lactose, oligosaccharides and soluble protein content, has crossed the membrane. These three fractions have a similar behaviour because their molecular weights are significantly lower than the pore size of the membrane, which means a rejection coefficient close to 0. However, in the 4 diafiltration cycles performed, only 24.79% of the total calcium content passed through the membrane, resulting a rejection coefficient of 0.26. It is important to know that just the 34% of the total calcium concentration is soluble, since the remainder is associated to the casein

fraction. Related to the protein fraction, the 5.73% of the total protein which crossed the membrane corresponded with the soluble protein fraction filtered. This result confirms that neither the casein fraction nor the major whey proteins,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin, pass through the membrane.

### Dynamic modelling of the ultrafiltration process.

The dynamic model developed for the ultrafiltration process of goat milk is comprised of 10 independent equations, 4 differential and 6 algebraic equations, that are the following:

$$\begin{aligned} \frac{dV_F}{dt} &= F & [1] & & J &= \frac{F}{A} & [2] \\ J &= \alpha R^4 & [3] & & \frac{dR}{dt} &= -\beta \frac{C_R^{Ca} \cdot J}{R} & [4] \\ \frac{dC_R^{OS}}{dt} &= -\frac{F \cdot S_{OS} \cdot C_R^{OS}}{V_R} & [5] & & \frac{dC_R^{Ca}}{dt} &= -\frac{F \cdot S_{Ca} \cdot C_R^{Ca}}{V_R} & [6] \\ S_{OS} &= \frac{C_F^{OS}}{C_R^{OS}} & [7] & & S_{Ca} &= \frac{C_F^{Ca}}{C_R^{Ca}} & [8] \\ \lambda_{OS} &= \frac{R_{OS}}{R} & [9] & & \lambda_{Ca} &= \frac{R_{Ca}}{R} & [10] \end{aligned}$$

*Dynamic model for the process of ultrafiltration of goat milk.*

Therefore, setting the values of the retentate volume ( $V_R$ ) and the membrane area ( $A$ ), and determining experimentally the variation of the permeate volume ( $V_F$ ) and the concentrations of oligosaccharides and calcium in the retentate with time, the parameters of the model can be estimated as follows:

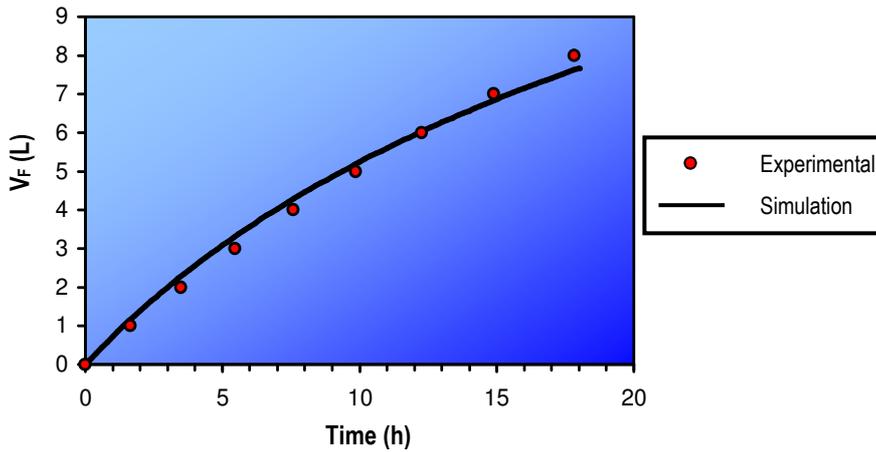
- Flow coefficient,  $\alpha = 4.98 \times 10^{-2} \text{ L}/(\text{h m}^2 \text{ nm}^4)$
- Fouling coefficient,  $\beta = 2.15 \times 10^{-5} (\text{nm}^2 \text{ m}^2) / \text{mg Ca}$
- Effective radius for the oligosaccharides molecules,  $R_{OS} = 0.562 \text{ nm}$
- Effective radius for calcium,  $R_{Ca} = 2.884 \text{ nm}$
- Initial pore radius,  $R = 4.299 \text{ nm}$ .

To estimate these parameters, the deviation between the model's output and the set of experimental data is minimised. To this purpose, the software Berkeley Madonna for Modelling and Analysis of Dynamic Systems (version 8.0.1) has been employed. The deviation is the root mean square (rms) of the differences between individual data points and the corresponding points in the run:

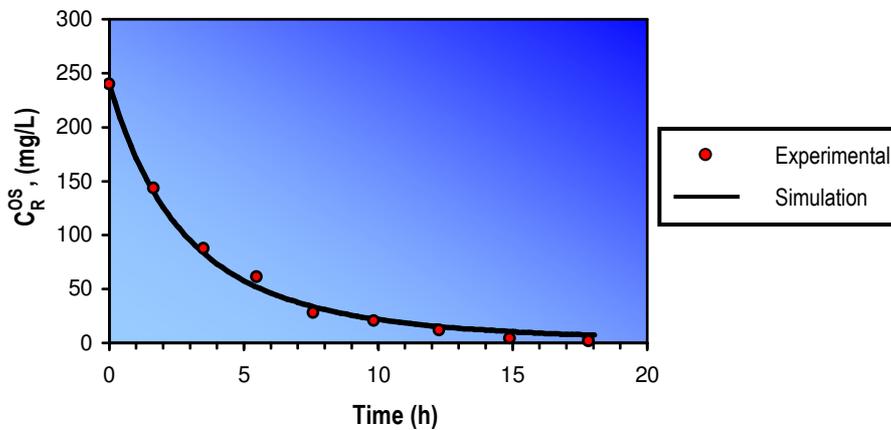
$$rms = \sqrt{\frac{\sum_j \sum_i P_j (x_{\text{exp}_i} - x_{\text{cal}_i})^2}{n}}$$

where  $j$  represents the experimental variables,  $i$  the pairs of data and  $p_j$  the weight of each sequence.

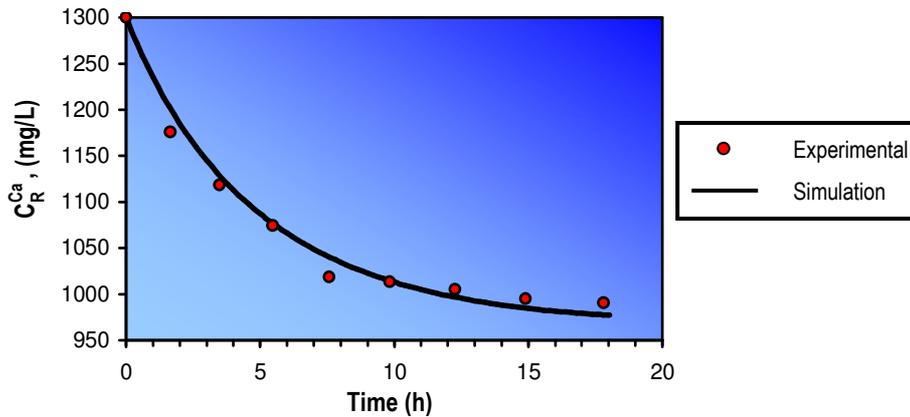
It is verified that the model reproduces faithfully the experimental data, as it can be seen in the following figures where the evolution of permeate volume ( $V_F$ ) and concentration of oligosaccharides and calcium in the retentate ( $C_R^{\text{OS}}$  y  $C_R^{\text{Ca}}$ ) with time are represented.



Experimental and simulated values of  $V_F$  vs. time.



Experimental and simulated values of  $C_R^{\text{OS}}$  vs. time.



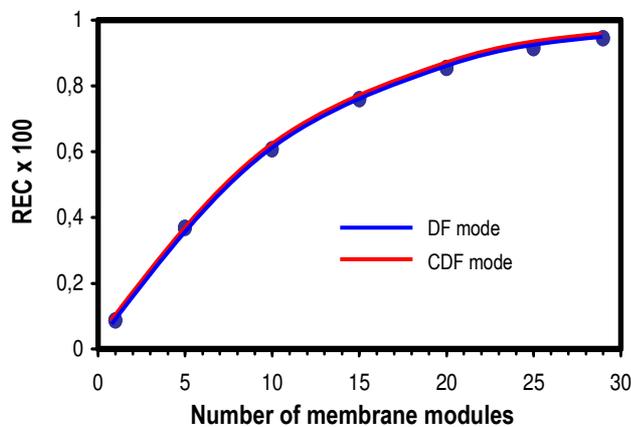
Experimental and simulated values of  $C_R^{Ca}$  vs. time.

**Simulation and optimisation of the separation process.**

For the optimisation of the separation process, an industrial case of isolation of goat milk oligosaccharides has been simulated as an illustrative example. The following constraints have been assumed:

- The initial process volume of skimmed goat milk is 1000 L.
- The recovery of oligosaccharides in the permeate should be 95% at least.
- The membrane modules employed have to be commercially available. In this work, the Tournasol modules, marketed by Tami Industries S.A., have been considered.

By using the software gPROMS General Process Modelling System (version 2.0.4), it is demonstrated that in order to obtain the recovery of 95%, it is necessary to employ a minimum membrane area of 10.5 m<sup>2</sup>, which corresponds to 30 membrane modules. This is verified for two possible operation modes: DF (continuous diafiltration) and CDF (concentration followed by continuous diafiltration).



Maximum recovery of oligosaccharides vs. number of membrane modules.

The existence of this minimum area is due to the decrease of the membrane pore radius by effect of fouling, being even lower than the effective radius of the oligosaccharides after a certain process time for low area values.

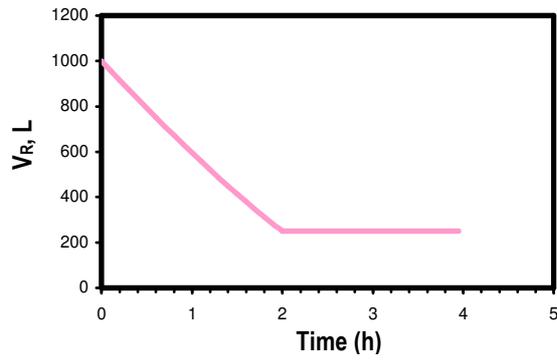
The operating time has been calculated as a function of the number of modules and of the concentration factor (FC) to obtain the 95% of recovery according to the requests of the product. These values are shown in the following table.

Number of modules	Membrane area, m <sup>2</sup>	Time (h)			
		FC = 1	FC = 2	FC = 3	FC = 4
30	10.50	533.471	274.683	185.098	140.663
35	12.25	67.342	34.530	24.193	19.270
40	14.00	39.943	20.695	14.792	12.042
45	15.75	28.707	14.982	10.855	8.959
50	17.50	22.495	11.808	8.639	7.198
55	19.25	18.527	9.769	7.200	6.042
60	21.00	15.768	8.344	6.186	5.218
65	22.75	13.735	7.289	5.429	4.600
70	24.50	12.169	6.474	4.841	4.116
75	26.25	10.927	5.826	4.370	3.729
80	28.00	9.916	5.297	3.985	3.401
85	29.75	9.079	4.857	3.662	3.137
90	31.50	8.372	4.485	3.389	2.908
95	33.25	7.768	4.167	3.154	2.711
100	35.00	7.240	3.891	2.950	2.539

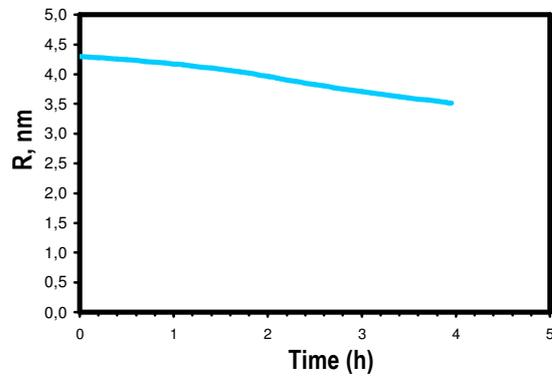
It can be seen that the filtration time decreases gradually with the concentration factor and the number of modules.

In membrane installations, the membrane area determines regularly the capital cost (the cost of the membrane modules are dramatically greater than those for tanks or pumps) and the operating cost (cleaning costs are proportional to membrane area). Thus, process optimisation consists of minimising the membrane area for a given productivity. Therefore, the results from the last table reveal that the optimum operation mode to obtain the goat milk oligosaccharide fraction by tangential ultrafiltration through tubular ceramic membranes at industrial scale is to concentrate to factor 4 (the maximum allowed by the system fluidodynamics) and then to follow continuous diafiltration until the required recovery is reached.

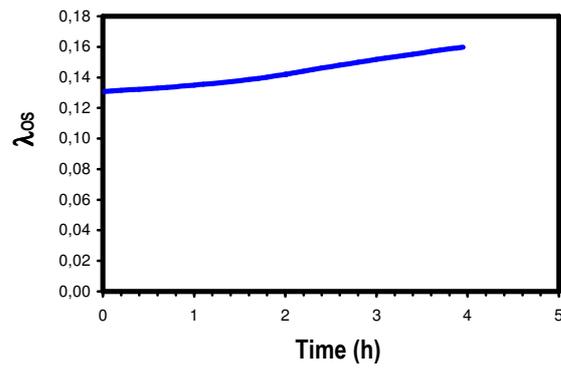
As an example, considering an initial volume of skimmed goat milk of 1000 L and specifying a recovery over 95% and a productivity of 250 L/h, it results a minimum filtration area of 25.20 m<sup>2</sup> and an optimum operation time of 3.95 h, divided into approximately 1.90 h of concentration and 2.10 h of diafiltration. The simulation of some of the most significant variables during the process are represented subsequently: retentate volume, pore radius, ratio effective radius/pore radius for the oligosaccharides and the percentage of recovery of oligosaccharides.



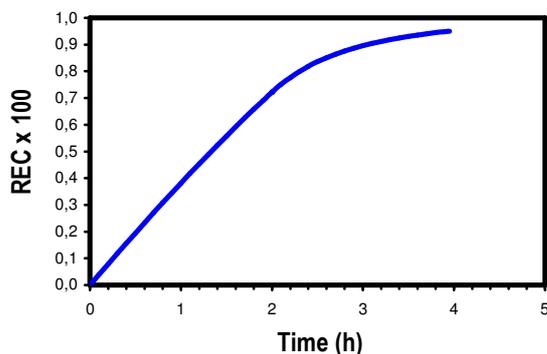
*Evolution of the retentate volume.*



*Evolution of the pore radius.*



*Evolution of the ratio effective radius/pore radius for the oligosaccharides.*



*Evolution of the recovery percentage of oligosaccharides.*

It is important to emphasize the decrease of the pore radius with time, which value ranges from 4.30 nm to 3.52 nm as a result of fouling effects, being always greater than the effective radius of the oligosaccharides. Moreover, the ratio effective radius/pore radius for oligosaccharides is lower than 0.2 during the whole process, which means that the pore radius is more than 5 times wider than the effective radius for oligosaccharides. This guarantees the practical absence of steric effects in the transmission through the membrane and a rejection coefficient for this component close to zero.

With respect to the percentage of recovery of oligosaccharides, the last figure shows that, indeed, the 95% of recovery has been reached after 4 h, which is 3 times faster when compared to the approximately 12 h needed using the continuous diafiltration mode, DF (FC = 1).

**TESIS DOCTORAL**

## INDICE

<b>1. Resumen .....</b>	<b>22</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>37</b>
<b>3. Antecedentes Bblográficos .....</b>	<b>40</b>
3.1. “Factores tróficos” de la leche materna.....	41
3.1.1. Oligosacáridos .....	41
3.1.2. Poliaminas .....	47
3.1.3. Hormonas y factores de crecimiento .....	48
3.1.4. Nucleótidos .....	50
3.1.5. Lactoferrina.....	51
3.1.6. Péptidos bioactivos.....	53
3.1.7. Suplementación de fórmulas infantiles con factores tróficos .....	55
3.2. Separación de compuestos bioactivos minoritarios.....	56
3.2.1. Separación por membranas: Generalidades .....	57
3.2.2. Separación por membranas: Estudios realizados .....	70
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>77</b>
<b>5. Materiales y métodos .....</b>	<b>79</b>
5.1. Selección de la fuente de oligosacáridos.....	80
5.1.1. Identificación y cuantificación de la fracción de oligosacáridos .....	80
5.1.1.1. Sustrato.....	80
5.1.1.2. Cromatografía de capa fina de alta resolución (HP-TLC).....	80
5.1.1.3. Purificación por cromatografía de permeación en gel.....	80
5.1.1.4. Cromatografía líquida de intercambio aniónico a alto pH con detección amperométrica pulsante (HPAEC-PAD).....	81
5.1.1.5. Espectrometría de masas de bombardeo atómico rápido (FAB-MS) .....	81
5.1.2. Evaluación de las propiedades funcionales.....	82
5.1.2.1. Determinación del efecto sobre la diferenciación de enterocitos y células calciformes .....	82

5.1.2.1.1. Determinación de actividades enzimáticas en células Caco-2 .....	83
5.1.2.1.2. Determinación del antígeno nuclear de proliferación (PCNA) .....	85
5.1.2.1.3. Determinación de la expresión de mucinas y “trefoil-factors” en células Caco-2 y HT29/MTX .....	87
5.1.2.2. Estudio de la adhesión de monocitos sobre células HUVEC bajo condiciones de flujo .....	91
5.1.2.2.1. Aislamiento de células HUVEC .....	93
5.1.2.2.2. Aislamiento de momocitos .....	93
5.1.2.2.3. Evaluación de la adhesión .....	94
5.2. Obtención de oligosacáridos por ultrafiltración .....	96
5.2.1. Sustrato .....	96
5.2.2. Módulo de membrana .....	97
5.2.3. Dispositivo experimental .....	98
5.2.4. Métodos analíticos .....	100
5.2.4.1. Métodos analíticos estándar .....	100
5.2.4.2. Distribución de pesos moleculares .....	100
<b>6. Resultados y discusión.....</b>	<b>103</b>
6.1. Selección de la fuente de oligosacáridos.....	104
6.1.1. Identificación y cuantificación de la fracción de oligosacáridos .....	104
6.1.2. Evaluación de las propiedades funcionales .....	111
6.1.2.1. Determinación del efecto sobre la diferenciación de enterocitos y células calciformes .....	111
6.1.2.1.1. Determinación de actividades enzimáticas en células Caco-2 .....	111
6.1.2.1.2. Determinación del antígeno nuclear de proliferación (PCNA) .....	113
6.1.2.1.3. Determinación de la expresión de mucinas y “trefoil-factors” en células Caco-2 y HT29/MTX .....	114
6.1.2.2. Estudio de la adhesión de monocitos sobre células HUVEC bajo condiciones de flujo .....	121
6.2. Obtención de oligosacáridos por ultrafiltración .....	124
6.2.1. Estudio experimental .....	125
6.2.1.1. Selección del módulo de membrana.....	125

6.2.1.2. Selección de las condiciones de operación .....	129
6.2.1.3. Proceso de separación .....	135
6.2.1.4. Cálculo de los índices de rechazo .....	142
6.2.2. Modelización .....	150
6.2.3. Simulación y optimización.....	155
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>172</b>
<b>8. Investigación futura.....</b>	<b>176</b>
<b>9. Nomenclatura.....</b>	<b>179</b>
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>185</b>
<b>11. Apéndice .....</b>	<b>206</b>
<i>Apéndice 11.1. Monosacáridos constituyentes de los oligosacáridos detectados .....</i>	<i>207</i>
<i>Apéndice 11.2. Oligosacáridos neutros identificados en leche humana .....</i>	<i>208</i>
<i>Apéndice 11.3. Oligosacáridos monosialicos identificados en leche humana .....</i>	<i>213</i>
<i>Apéndice 11.4. Oligosacáridos di- y tri-sialicos identificados en leche humana .....</i>	<i>216</i>
<i>Apéndice 11.5. Composición de los medios de cultivo y tampones utilizados en los ensayos para evaluar las propiedades funcionales de los oligosacáridos .....</i>	<i>217</i>
<i>Apéndice 11.6. Modelo dinámico propuesto para el proceso de ultrafiltración de leche de cabra .....</i>	<i>219</i>
<i>Apéndice 11.7. Simulación y optimización. Volumen de filtrado .....</i>	<i>220</i>
<i>Apéndice 11.8. Simulación y optimización. Concentración de oligosacáridos y calcio en la corriente de retenido.....</i>	<i>221</i>
<i>Apéndice 11.9. Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo DF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana .....</i>	<i>222</i>
<i>Apéndice 11.10. Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo CDF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana .....</i>	<i>229</i>
<i>Apéndice 11.11. Valores simulados para un caso industrial de productividad = 250 L/h, volumen inicial 1000 L y % de recuperación de oligosacáridos superior al 95% .....</i>	<i>234</i>

# **1. RESUMEN**

La leche materna es el alimento ideal en los primeros meses de vida del neonato, aportando todos los nutrientes necesarios para su adecuado desarrollo y crecimiento, tales como proteínas, grasas, hidratos de carbono, minerales y vitaminas. No obstante, es también fuente de una serie de compuestos con importantes actividades bioquímicas y fisiológicas de gran importancia para numerosos órganos y tejidos, y de cuantiosos factores de defensa contra antígenos y agentes patógenos. Así, la leche humana contiene hormonas y factores de crecimiento, enzimas, proteínas y péptidos bioactivos, nucleótidos, poliaminas, oligosacáridos, y un largo etcétera que en conjunto reciben el nombre de “factores tróficos de la leche”.

En particular, los oligosacáridos constituyen el tercer componente de la leche materna, que contiene alrededor de 8-10 g/L, habiéndose identificado más de 130 estructuras distintas, lo que implica una complejidad y variabilidad de estructuras no encontrada en la leche de otras especies.

El interés de los investigadores por los oligosacáridos comenzó hace años con la observación de que podrían ser promotores de la flora bifidogénica en los niños alimentados al pecho. Hoy día existe evidencia científica que demuestra que los oligosacáridos poseen efectos beneficiosos para el niño recién nacido tanto por su carácter prebiótico como por sus propiedades anti-infecciosas. En este sentido, existe un creciente interés en el papel de los oligosacáridos de leche materna como receptores de patógenos. El hecho de que sean sintetizados por las mismas glicosiltransferasas que participan en la síntesis de las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de las células intestinales, hace que existan similitudes entre los carbohidratos de la superficie de las células epiteliales y los oligosacáridos. Esto apoya la hipótesis de que estos últimos actuarían como homólogos o análogos de los receptores celulares para microorganismos patógenos, produciéndose interacciones específicas entre ambos y actuando de esta forma como protectores de las células de la mucosa intestinal frente al ataque de patógenos.

Otro aspecto importante es la influencia de los oligosacáridos sobre la interacción entre leucocitos y células endoteliales. Existen actualmente agentes terapéuticos que bloquean dicha interacción, provocando un efecto dramático en la progresión de la respuesta inflamatoria en numerosos modelos animales. Dicho efecto se puede conseguir aplicando el anticuerpo apropiado o utilizando ligandos (carbohidratos sintetizados enzimáticamente) específicos para las selectinas, una familia de moléculas de adhesión celular que se expresan en la superficie de leucocitos, plaquetas y células endoteliales, que están directamente implicados en los fenómenos de adhesión celular durante los procesos inflamatorios. Se ha demostrado que muchos oligosacáridos ácidos y fucosilados de leche humana poseen efectos similares.

Además de todo lo señalado anteriormente, los oligosacáridos de la leche materna podrían desempeñar un importante papel como suministradores de ácido siálico, esencial para el desarrollo cerebral del lactante, y galactosa, principal componente de los galactocerebrósidos que constituyen la mielina y las membranas celulares de las neuronas, ya que en determinadas ocasiones la capacidad de síntesis del recién nacido podría no superar las necesidades de los mismos.

En base a las importantes funciones biológicas descritas anteriormente para los oligosacáridos, que revelan su importante acción en el desarrollo y crecimiento del recién nacido, la adición de los mismos a las leches infantiles aportaría un nuevo paso en el difícil reto de conseguir maternizar al máximo las fórmulas para lactantes existentes en el mercado. Por otro lado, además de su potencial aplicabilidad en nutrición infantil, los oligosacáridos encontrarían mercado en la suplementación de alimentos funcionales específicos para la tercera edad destinados a la prevención de infecciones e incluso en nutrición clínica y hospitalaria, en la formulación de preparados o dietas especiales para el tratamiento de pacientes con ciertas patologías, lo que contribuiría a una mejor y más rápida recuperación, y en definitiva, a mejorar la calidad de vida de estas personas.

No obstante, la suplementación con oligosacáridos está condicionada por la extrema dificultad de síntesis, tanto por vía enzimática como biotecnológica, y por la capacidad de aislamiento de dichas biomoléculas minoritarias en caso de existir una fuente natural rica en las mismas. De hecho, ninguna compañía suplementa sus fórmulas con oligosacáridos similares a los de la leche humana, y las que lo hacen adicionan estructuras simples producidas enzimáticamente como fructooligosacáridos (FOS), de origen vegetal, y/o galactooligosacáridos (GOS), de origen lácteo, que poseen un efecto prebiótico estimulando de forma dosis-dependiente el crecimiento de *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* en el intestino, pero carecen del resto de funciones descritas previamente para los oligosacáridos de leche humana. Otros compuestos que actualmente se adicionan con las mismas carencias que los FOS y GOS son isomaltooligosacáridos y oligosacáridos obtenidos de la soja.

Así, el trabajo que se describe en la presente Memoria recoge la labor investigadora que el Grupo de Biorreactores del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada en colaboración con el Departamento de Biomedicina de Puleva Biotech S.A. están llevando a cabo para el desarrollo de técnicas de producción y separación de compuestos con actividad biológica. En concreto, los objetivos planificados para ésta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

- Búsqueda de una fuente de oligosacáridos similares a los de leche materna para nutrición infantil entre las principales especies animales productoras de leche: vaca, cabra y oveja.
- Evaluación de su actividad funcional a nivel gastrointestinal mediante el estudio de la influencia de los oligosacáridos sobre la diferenciación (actividad fosfatasa alcalina, leucín-aminopeptidasa y disacaridasas), la proliferación (tomando como marcador el PCNA) y la expresión de mucinas (MUC2, MUC4 y MUC5B) y “trefoil-factors” (TFF1 y TFF3) en células intestinales en cultivo (Caco-2 y HT29/MTX).
- Evaluación de la actividad funcional a nivel inmunológico mediante la determinación de la influencia de los oligosacáridos en la adhesión de monocitos sobre células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) estimuladas con TNF- $\alpha$  bajo condiciones de flujo.

- Obtención de la fracción de oligosacáridos por tecnología de membranas. El objetivo perseguido es poner a punto el proceso de ultrafiltración que permita la separación o aislamiento del 90-95% de los oligosacáridos de la fracción proteica sin alterar sus propiedades biológicas ni su biodisponibilidad.
- Modelización dinámica del proceso de ultrafiltración.
- Optimización de la etapa de separación para minimizar el área de filtración lo que determinaría el modo de operación más idóneo para llevar este proceso a cabo a escala industrial.

A continuación se exponen los resultados obtenidos:

**Selección de la fuente de oligosacáridos.**

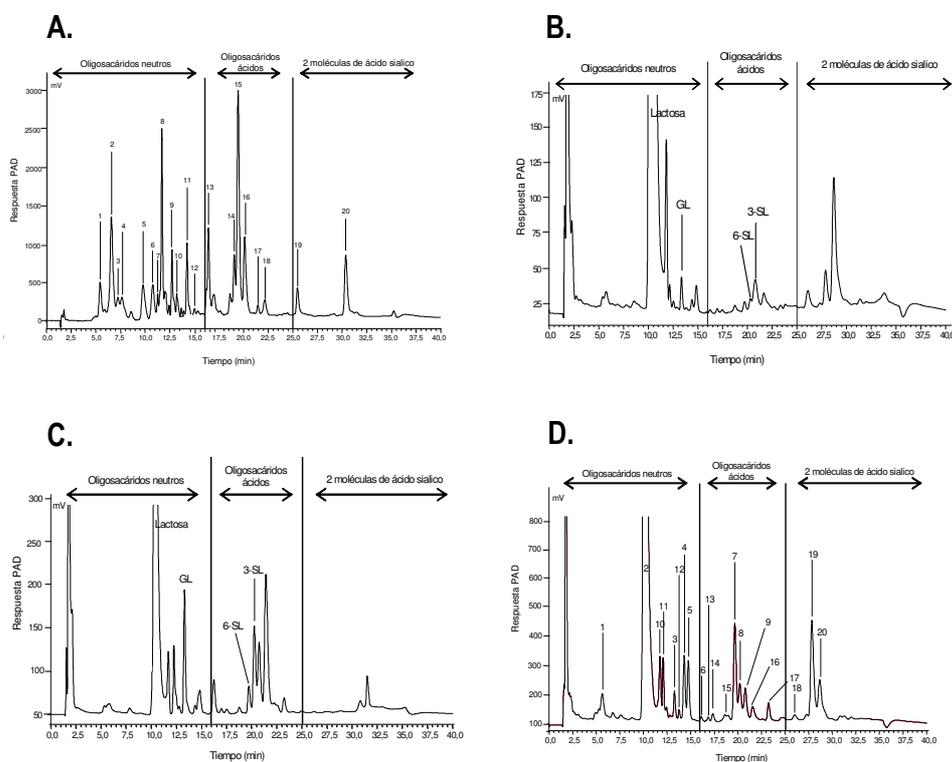
La leche de cabra es una óptima fuente de oligosacáridos tanto por su composición como por su concentración, y la mejor en comparación con las leches comercialmente disponibles (vaca y oveja), conteniendo una gran variedad de oligosacáridos ácidos y N-acetil-glucosaminil-lactosa junto con galactosil-lactosa como oligosacáridos neutros mayoritarios, tal como lo demuestra el análisis realizado por las siguientes técnicas: cromatografía de permeación en gel y cromatografía líquida de intercambio aniónico a alto pH con detección amperométrica pulsante (HPAEC-PAD) para la cuantificación y cromatografía de capa fina de alta resolución (HP-TLC), junto con espectrometría de masas de bombardeo atómico rápido (FAB-MS) para la caracterización de los mismos.

Por otra parte, el contenido de oligosacáridos de la leche de cabra es significativamente menor en comparación con el de la leche humana, aunque las similitudes estructurales encontradas entre los oligosacáridos y otros glicoconjugados de leche de cabra y los de leche materna sugieren que podrían desarrollar una bioactividad similar, pudiendo ser utilizados en productos para nutrición humana.

Los valores de concentración de oligosacáridos y lactosa detectados en leche de cabra, vaca, oveja y humana se muestran en la siguiente tabla:

Tipo de leche	Oligosacáridos (g/L)	Lactosa (g/L)
Leche de cabra	0.25 – 0.30	45
Leche de vaca	0.03 – 0.06	46
Leche de oveja	0.02 – 0.04	48
Leche materna	5 – 8	68

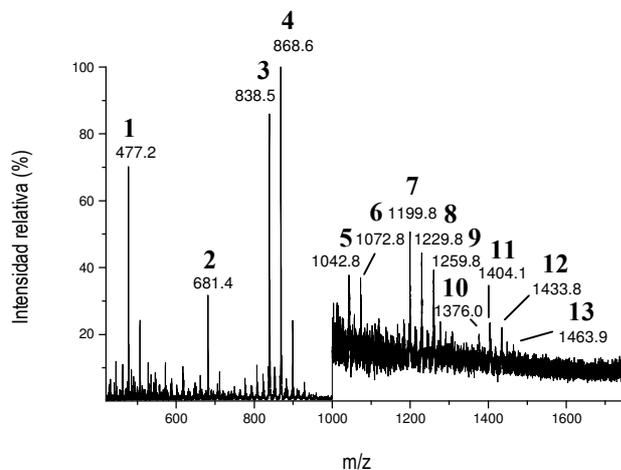
El análisis por HPAEC-PAD de cada una de ellas se muestra a continuación:



Perfil de oligosacáridos por HPAEC-PAD de leche materna (A), oveja (B), vaca (C) y cabra (D).

Como se puede observar en las figuras anteriores, el perfil cromatográfico de la leche de cabra es el más similar al de la leche humana, mostrando a su vez un mayor número de picos en comparación con los cromatogramas de leche de oveja o vaca. Además, las figuras muestran que la fracción de oligosacáridos ácidos de leche de cabra es rica en estructuras conteniendo tanto una como varias moléculas de ácido siálico, al igual que la leche humana, mientras que la fracción de oligosacáridos ácidos de leche de oveja contiene principalmente estructuras con dos moléculas de ácido siálico y el perfil ácido de la leche de vaca está compuesto fundamentalmente por estructuras con solo una molécula de ácido siálico.

La siguiente figura muestra el espectro obtenido por FAB-MS de la fracción de oligosacáridos de leche de cabra, incluyendo algunos de los oligosacáridos permetilados ácidos y neutros encontrados. Mediante ésta técnica, se han encontrado, además de los ya identificados por cromatografía, 15 nuevos oligosacáridos en leche de cabra no descritos anteriormente, 4 de ellos neutros y 11 ácidos.



Espectro obtenido por FAB-MS de la fracción de oligosacáridos de leche de cabra.

En resumen, los oligosacáridos mayoritarios detectados en leche de cabra por HPAEC-PAD y FAB-MS, su abreviatura y concentración se recogen en la siguiente tabla.

Abreviatura	Nombre	Concentración (g/L)
<b>Oligosacáridos ácidos</b>		
6-SL	6-Sialil-lactosa	0.07 – 0.08
3-SL	3-Sialil-lactosa	0.05 – 0.06
NGL	N-glicolil-neuraminil-lactosa	0.03 – 0.04
SLNH	Sialil-lacto-N-hexaosa	0.001 – 0.005
DSL	Di-sialil-lactosa	0.001 – 0.005
SNGL	Sialil-N-glicolil-neuraminil-lactosa	0.001 – 0.005
SHL	Sialil-hexosil-lactosa	Trazas
NGHL	N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa	Trazas
SNGHL	Sialil-N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa	Trazas
DSHL	Di-sialil-hexosil-lactosa	Trazas
DNGL	Di-N-glicolil-neuraminil-lactosa	Trazas
SDHL	Sialil-di-hexosil-lactosa	Trazas
DNGHL	Di-N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa	Trazas
NGLNH	N-glicolil-neuraminil-lacto-N-hexaosa	Trazas
<b>Oligosacáridos neutros</b>		
GL	Galactosil-lactosa	0.05 – 0.06

NAL	N-acetil-glucosaminil-lactosa	0.03 – 0.04
LNH	Lacto-N-hexaosa	0.001 – 0.005
NALNH	N-acetil-glucosaminil-lacto-N-hexaosa	0.001 – 0.005
DNAL	Di-N-acetil-glucosaminil-lactosa	0.001 – 0.005
NAHL	N-acetil-glucosaminil-hexosil-lactosa	Trazas
NADHL	N-acetil-glucosaminil-di-hexosil-lactosa	Trazas
<b>Total oligosacáridos</b>		0.25 – 0.30

***Evaluación de la actividad funcional de los oligosacáridos de leche de cabra a nivel gastrointestinal.***

Los oligosacáridos de la leche de cabra inducen la maduración del epitelio intestinal, lo que permite una mayor resistencia a la adhesión de patógenos en la superficie epitelial, y estimulan la diferenciación celular, pero no la proliferación celular, ya que:

- la adición de oligosacáridos purificados de leche de cabra al medio de cultivo de células Caco-2 aumenta la mayoría de las actividades enzimáticas ensayadas, entre ellas fosfatasa alcalina, lactasa, maltasa y sacarasa, generando a su vez una tendencia al aumento de la actividad leucín-aminopeptidasa.
- la suplementación del medio de cultivo, tanto en células Caco-2 como en HT29/MTX, con oligosacáridos de leche de cabra no produce ninguna alteración significativa en los niveles del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), un marcador de proliferación utilizado habitualmente para estudiar el efecto de diferentes nutrientes presentes en el lumen intestinal sobre el mantenimiento y la proliferación del epitelio del colon.

Hasta ahora, el interés de los oligosacáridos estaba centrado en su papel como receptores de patógenos, protegiendo la mucosa intestinal del ataque de bacterias patógenas o como factores de crecimiento para *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, pero su implicación en fenómenos de diferenciación de células epiteliales no había sido descrita. Así, se ha sugerido que la glicosilación a nivel de las microvellosidades intestinales es un proceso que se regula a través del desarrollo, en el que pueden influir bacterias probióticas y factores tróficos presentes en la dieta. Esa inmadurez del intestino delgado puede ser un factor determinante en la colonización microbiana, relacionándose directamente con las infecciones intestinales en niños. De esa forma, los oligosacáridos procedentes de la leche humana y otros rumiantes, como los de leche de cabra, ricos en ácido siálico, N-acetil-glucosamina, glucosa, galactosa, ácido N-glicolil-neuramínico y N-acetil-galactosamina, pueden influenciar los patrones de glicosilación de las células epiteliales hacia un mayor grado de diferenciación.

Por otra parte, la adición de oligosacáridos purificados de leche de cabra al medio de cultivo influye sobre la expresión génica de la síntesis de mucoproteínas y “trefoil factors” en células Caco-2 y HT-29/MTX, produciendo una disminución significativa y específica en la expresión de MUC2, MUC4 y MUC5B. Además, disminuye

significativamente la expresión de TFF1 y TFF3 en células Caco-2, pero no produce efecto alguno en células HT29/MTX .

***Evaluación de la actividad funcional de los oligosacáridos de leche de cabra a nivel inmunológico.***

La suplementación del medio de cultivo celular con oligosacáridos de leche de cabra inhibe *in vitro* la adhesión de monocitos sobre células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) estimuladas con TNF- $\alpha$  bajo condiciones de flujo en un 21.1%, lo que sugiere la existencia de epítomos similares a los ligandos de las selectinas, ejerciendo una importante acción sobre la cascada de adhesión celular que conduce a la extravasación de células de la sangre a los tejidos durante los procesos de inflamación.

Esto ha sido puesto de manifiesto mediante un ensayo hidrodinámico *in vitro* en el que se simula la circulación de los monocitos en el corriente sanguíneo, el endotelio y la interacción entre ambos.

Las selectinas se clasifican en tres tipos, E-, L- y P-selectina, en función del tipo de molécula en cuya superficie son capaces de expresarse, y juegan un papel importante en la cascada de adhesión celular, pues son capaces de retirar leucocitos de la circulación sanguínea, que comienzan a rodar por la pared endotelial hasta que quedan perfectamente unidos a la pared, proceso que es mediado por otro tipo de moléculas de activación endotelial llamadas integrinas. El hecho de que entre los oligosacáridos de leche humana existan varias estructuras que tienen epítomos muy similares a los ligandos para las selectinas y que sean mínimamente digeridos en el tracto gastrointestinal del neonato y parcialmente absorbidos en niños alimentados con leche materna, refuerza la hipótesis de que podrían no solo tener funciones en el intestino, sino también ejercer efectos a nivel sistémico, como por ejemplo, en procesos inflamatorios.

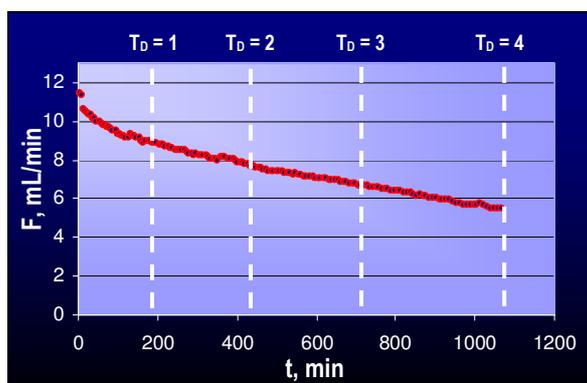
En este sentido, dado que las principales estructuras de oligosacáridos encontradas en leche de cabra también están presentes en leche humana, lo que, unido al hecho de que también son capaces de inhibir la adhesión celular de monocitos, podríamos postular que los oligosacáridos de leche de cabra podrían tener esta misma acción protectora que se les confiere a los de leche humana. En cualquier caso, para confirmar estos resultados, en nuestro laboratorio estamos llevando a cabo estudios que permitan discernir si estas estructuras oligosacáridicas pueden también actuar como inmunomoduladores *in vivo*.

***Obtención de la fracción de oligosacáridos por tecnología de membranas.***

El proceso de ultrafiltración tangencial de leche de cabra desnatada con módulos de membrana cerámicos tubulares de tamaño de corte 50 KDa en las siguientes condiciones de operación: T<sup>a</sup> = 30°C, velocidad de recirculación  $v = 3.30$  m/s y P<sub>TM</sub> = 0.90 bar, permite la separación de la fracción proteica mayoritaria de la fracción de oligosacáridos,

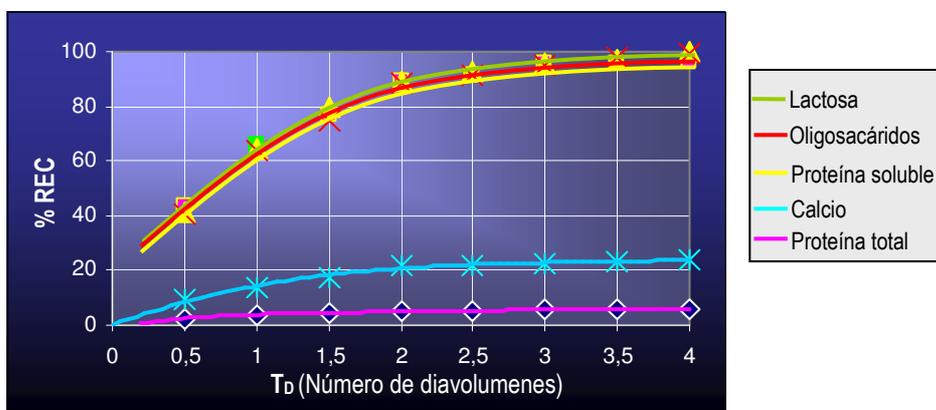
permitiendo la recuperación de más del 95% de los mismos sin alterar sus propiedades biológicas ni su biodisponibilidad.

Para ello, se han realizado una serie de experimentos en el modo de diafiltración continua que se han monitorizado mediante la evolución del volumen y el caudal de filtrado durante el proceso, y la concentración en las corrientes de alimentación, retenido y permeado acumulado cada medio ciclo de diafiltración de cada componente: oligosacáridos, lactosa, calcio, caseína, proteína soluble y proteína total. A continuación se representa la evolución del caudal de filtrado,  $F$ , y el porcentaje recuperado (REC) de cada componente durante el proceso.



Representación del caudal de filtrado ( $F$ ) vs. tiempo.

Se observa una caída progresiva del caudal de filtrado a medida que transcurre el proceso. Esta caída es debida a la disminución del tamaño de poro a consecuencia del fouling de la membrana producido por los niveles de calcio existentes en la corriente de retenido, que ha sido identificado como una de las mayores causas de fouling en productos lácteos, no solamente debido a la precipitación en forma de fosfato tricálcico sino también a que en forma iónica puede actuar como puente salino entre la membrana y las proteínas existentes.



Porcentaje recuperado de cada componente cada medio ciclo de diafiltración.

En cuanto a la composición del filtrado, se observa que en el tercer ciclo de diafiltración más del 95% de la lactosa, oligosacáridos y proteína soluble, han atravesado la membrana. Éstas tres fracciones muestran un comportamiento similar debido a que el peso molecular de todos ellos es significativamente inferior al tamaño de poro de la membrana, lo que se traduce en un índice de rechazo igual a cero. En cambio, en los 4 ciclos de diafiltración, solo atraviesa la membrana el 24.79% del calcio total presente, cuyo índice de rechazo calculado ha sido 0.26. Nótese que solo el 34% del calcio total presente es soluble, ya que el resto está asociado a las caseínas. Por su parte, el 5.73% de la proteína total que atraviesa la membrana se corresponde con la fracción de proteína soluble filtrada, lo que confirma el hecho de que ni la fracción caseínica ni las proteínas séricas mayoritarias,  $\alpha$ -lactalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina, han atravesado la membrana.

**Modelización dinámica del proceso de ultrafiltración.**

El modelo dinámico desarrollado para el proceso de ultrafiltración de leche de cabra consta de 10 ecuaciones independientes, 4 diferenciales y 6 algebraicas:

$\frac{dV_F}{dt} = F$ [1]	$J = \frac{F}{A}$ [2]
$J = \alpha R^4$ [3]	$\frac{dR}{dt} = -\beta \frac{C_R^{Ca} \cdot J}{R}$ [4]
$\frac{dC_R^{OS}}{dt} = -\frac{F \cdot S_{OS} \cdot C_R^{OS}}{V_R}$ [5]	$\frac{dC_R^{Ca}}{dt} = -\frac{F \cdot S_{Ca} \cdot C_R^{Ca}}{V_R}$ [6]
$S_{OS} = \frac{C_F^{OS}}{C_R^{OS}}$ [7]	$S_{Ca} = \frac{C_F^{Ca}}{C_R^{Ca}}$ [8]
$\lambda_{OS} = \frac{R_{OS}}{R}$ [9]	$\lambda_{Ca} = \frac{R_{Ca}}{R}$ [10]

*Modelo dinámico del proceso de ultrafiltración de leche de cabra.*

de forma que fijados los valores del volumen de retenido ( $V_R$ ) y área de membrana ( $A$ ), y determinados experimentalmente la variación del volumen de filtrado ( $V_F$ ) y de las concentraciones de oligosacáridos ( $C_R^{OS}$ ) y calcio ( $C_R^{Ca}$ ) en el retenido con el tiempo, se pueden estimar los valores de los parámetros del modelo, que han resultado ser los siguientes:

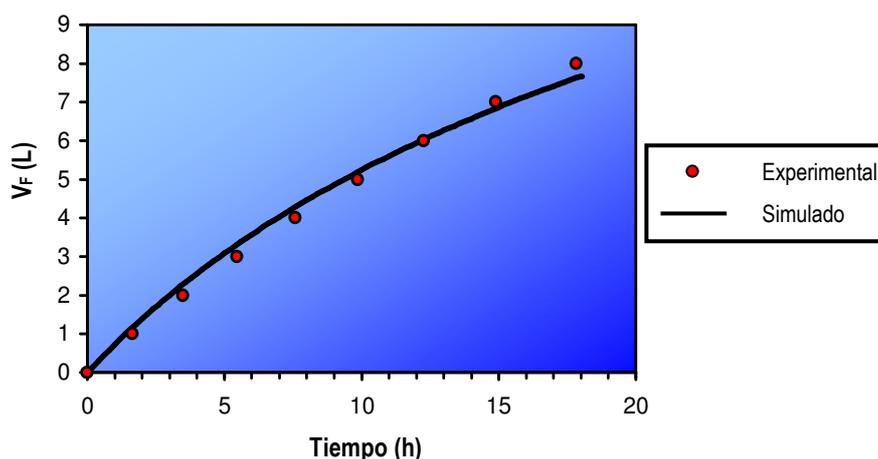
- coeficiente de flujo,  $\alpha = 4.98 \times 10^{-2} \text{ L}/(\text{h m}^2 \text{ nm}^4)$
- coeficiente de fouling,  $\beta = 2.15 \times 10^{-5} (\text{nm}^2 \text{ m}^2) / \text{mg Ca}$
- radio efectivo de la molécula de oligosacáridos,  $R_{OS} = 0.562 \text{ nm}$
- radio efectivo para el calcio,  $R_{Ca} = 2.884 \text{ nm}$
- y el radio inicial de poro,  $R = 4.299 \text{ nm}$ .

Para ello, se minimiza la desviación entre datos experimentales y calculados por el modelo, utilizando el software Berkeley Madonna (Modelling and Analysis of Dynamic Systems, versión 8.0.1 para Windows, 2003). La desviación es la raíz cuadrática media, rms, definida como sigue:

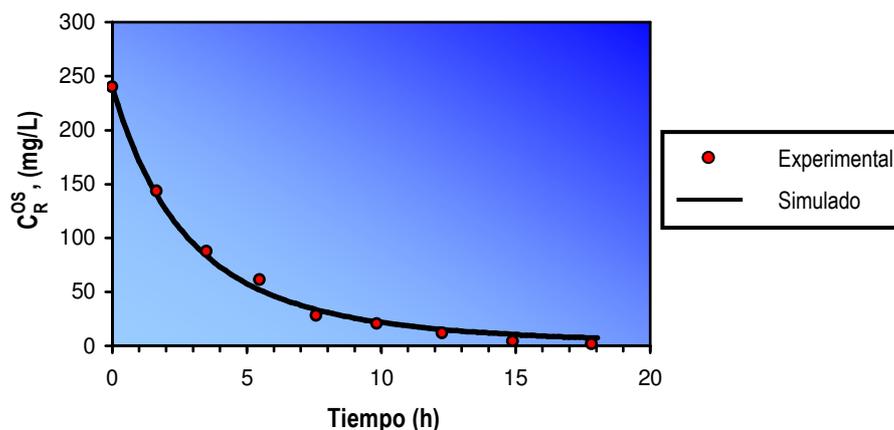
$$rms = \sqrt{\frac{\sum_j \sum_i P_j (x_{\text{exp}_i} - x_{\text{cal}_i})^2}{n}}$$

donde el índice  $j$  representa las variables experimentales y el índice  $i$ , las parejas de datos. Por su parte,  $p_j$  son los pesos para cada serie.

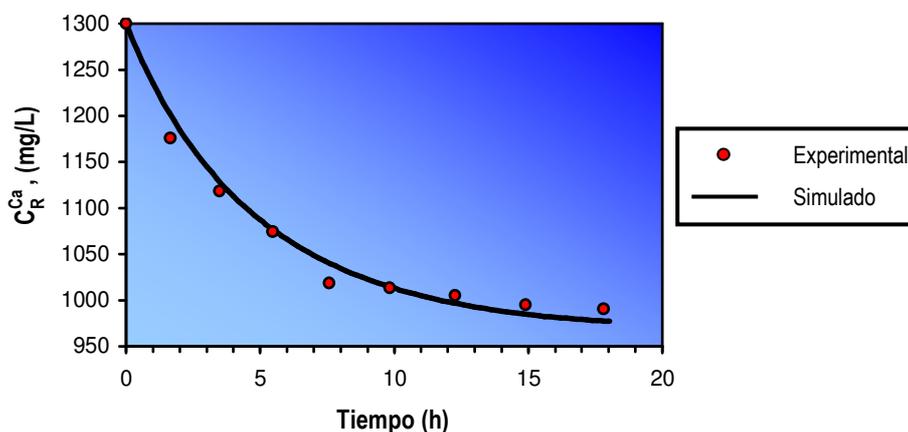
Se comprueba que el modelo reproduce fielmente los datos experimentales, como se observa en las siguientes figuras donde se representa la evolución del volumen de filtrado ( $V_F$ ), y concentración de oligosacáridos y calcio en la corriente de retenido ( $C_R^{OS}$  y  $C_R^{Ca}$ ) con el tiempo de proceso.



Valores de  $V_F$  simulados y experimentales.



Valores de concentración de oligosacáridos en el retenido,  $C_R^{OS}$ , simulados y experimentales.



Valores de concentración de calcio en el retenido,  $C_R^{Ca}$ , simulados y experimentales.

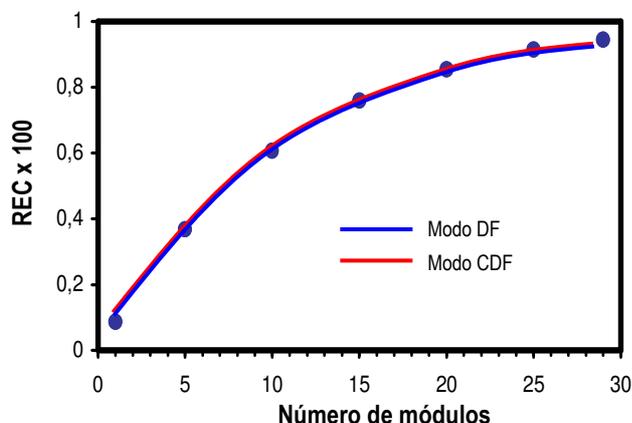
**Simulación y optimización de la etapa de separación.**

Para la optimización de la etapa de separación, se realiza la simulación de un caso industrial de obtención de oligosacáridos de leche de cabra, considerando las siguientes condiciones:

- Un volumen de leche de cabra inicial a tratar de 1000 L.
- La recuperación de oligosacáridos en el filtrado no debe ser inferior al 95%.
- La utilización de módulos de membrana industriales disponibles en el mercado.

Mediante el software gPROMS (Introductory User Guide, Process Systems Engineering Ltd., 2003) se comprueba que para obtener la recuperación deseada, es necesario emplear un área mínima de membrana de 10.5 m<sup>2</sup> correspondiente a 30 módulos, tanto en el modo de operación DF (diafiltración continua) como en el CDF

(concentración hasta el máximo factor que permitan las condiciones fluidodinámicas del sistema, seguida de diafiltración continua).



Máxima recuperación alcanzable según el área de membrana utilizado.

La existencia de este área mínima es debida a la disminución que experimenta el radio de poro de la membrana por efecto del fouling, llegando a ser menor que el radio efectivo de los oligosacáridos.

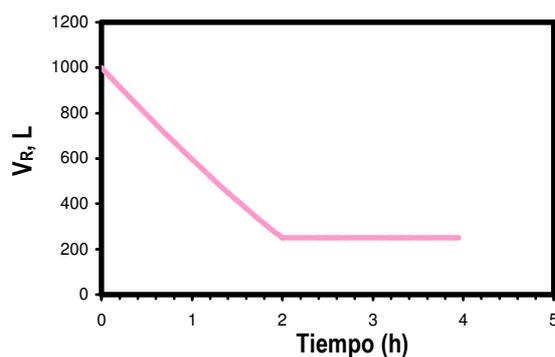
Se han calculado los tiempos de operación en función del número de módulos y del factor de concentración (FC) para alcanzar el 95% de recuperación de acuerdo con los requerimientos del producto. Estos valores se recogen en la siguiente tabla.

Módulos	Área, m <sup>2</sup>	Tiempo (h)			
		FC = 1	FC = 2	FC = 3	FC = 4
30	10.50	533.471	274.683	185.098	140.663
35	12.25	67.342	34.530	24.193	19.270
40	14.00	39.943	20.695	14.792	12.042
45	15.75	28.707	14.982	10.855	8.959
50	17.50	22.495	11.808	8.639	7.198
55	19.25	18.527	9.769	7.200	6.042
60	21.00	15.768	8.344	6.186	5.218
65	22.75	13.735	7.289	5.429	4.600
70	24.50	12.169	6.474	4.841	4.116
75	26.25	10.927	5.826	4.370	3.729
80	28.00	9.916	5.297	3.985	3.401
85	29.75	9.079	4.857	3.662	3.137
90	31.50	8.372	4.485	3.389	2.908
95	33.25	7.768	4.167	3.154	2.711
100	35.00	7.240	3.891	2.950	2.539

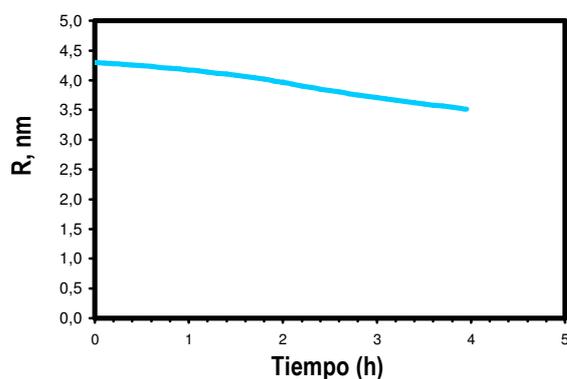
Se observa que el tiempo de filtración disminuye gradualmente con el factor de concentración y el número de módulos.

En procesos de membrana, el área de la instalación determina regularmente los costes tanto de capital (el coste de los módulos de membrana es sensiblemente mayor que el de tanques y bombas) como de operación (fundamentalmente debidos a ciclos de limpieza). De esta forma, la optimización del proceso pasa por minimizar el área de membrana para una productividad dada. Por tanto, los resultados de la tabla anterior revelan que el modo de operación óptimo para obtener a nivel industrial la fracción de oligosacáridos de leche de cabra por ultrafiltración tangencial a través de módulos cerámicos tubulares es concentrar hasta factor 4, máximo permisible por la fluidodinámica del sistema, y posteriormente realizar diafiltración continua hasta alcanzar la recuperación requerida.

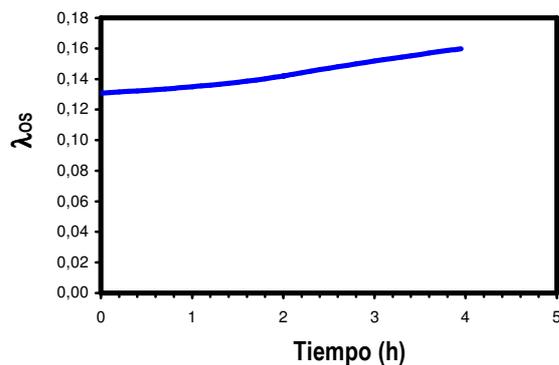
Para un caso práctico, partiendo de 1000 L de leche de cabra y especificando una recuperación de oligosacáridos superior al 95% y una productividad de 250 L/h, se comprueba que existe un área mínima de filtración de 25.20 m<sup>2</sup> y un tiempo óptimo de operación de 3.95 h, dividido en aproximadamente 1.90 h de concentración y 2.10 h de diafiltración continua. A continuación, se representa la evolución de algunas de las variables más significativas del proceso, como volumen de retenido ( $V_R$ ), radio de poro (R), relación radio efectivo/radio de poro para los oligosacáridos ( $\lambda_{os}$ ) y porcentaje de recuperación de oligosacáridos (REC):



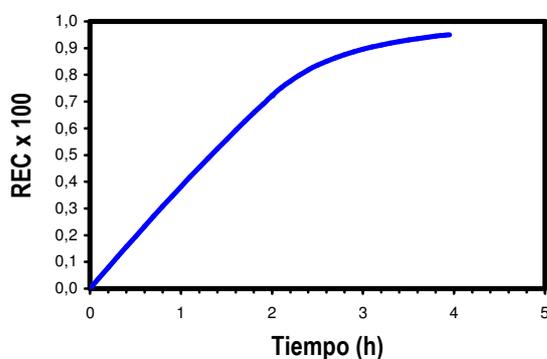
*Evolución del volumen de retenido con el tiempo.*



*Evolución del radio de poro con el tiempo.*



*Evolución del cociente radio efectivo/radio de poro para los oligosacáridos con el tiempo.*



*Evolución del porcentaje de recuperación de oligosacáridos con el tiempo.*

Cabe destacar la disminución del radio de poro con el tiempo, que pasa de 4.30 nm a 3.52 nm por efecto del fouling, que nunca llega a ser inferior al valor del radio efectivo de los oligosacáridos. Concretamente, la relación radio efectivo/radio de poro para los oligosacáridos,  $\lambda_{os}$ , es durante todo el proceso inferior a 0.2, lo que implica que el radio de poro es superior en más de 5 veces al efectivo de los oligosacáridos, lo que garantiza la no influencia de los efectos estéricos y que el índice de rechazo para este componente sea cero.

En cuanto al porcentaje de recuperación de oligosacáridos (REC), en la última figura se observa que, efectivamente, a las 4 h de proceso se ha alcanzado el 95% de recuperación de los oligosacáridos, un tiempo 3 veces inferior en comparación con las aproximadamente 12 horas necesarias en el modo de operación DF (FC = 1).

## **2. INTRODUCCIÓN.**

La leche materna es un complejo fluido biológico que aporta la energía y los nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento del recién nacido. En definitiva, es el alimento ideal en los primeros meses de vida del niño. La composición de la leche humana está adaptada, al igual que en cada especie, a las necesidades nutricionales del recién nacido, siendo su composición distinta en cada especie de mamífero (tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Composición de la leche materna, vaca, cabra y oveja (% en peso).

<b>Componente</b>	<b>Humana</b>	<b>Vaca</b>	<b>Cabra</b>	<b>Oveja</b>
Proteína	1.0	3.4	2.9	5.5
Caseína	0.4	2.8	2.5	4.6
Grasa	3.8	3.7	4.5	7.4
Lactosa	7.0	4.6	4.1	4.8
Minerales	0.2	0.7	0.8	1.0

Jensen, 1995

Además de los nutrientes necesarios para el crecimiento del bebé (proteínas, grasas, hidratos de carbono, minerales y vitaminas), la leche humana es también fuente de una serie de compuestos con importantes actividades bioquímicas y fisiológicas de gran importancia para el desarrollo de numerosos órganos y tejidos, y de cuantiosos factores de defensa contra antígenos y agentes patógenos. Así, la leche humana contiene hormonas y factores de crecimiento, enzimas, proteínas y péptidos bioactivos, nucleótidos, poliaminas, oligosacáridos, y un largo etcétera que en conjunto reciben el nombre de “*factores tróficos de la leche*”.

Aunque los conocimientos actuales sobre el papel biológico de algunos de estos compuestos bioactivos es aún limitado, existen suficientes datos para apoyar la hipótesis de que ejercen importantes funciones en el desarrollo y crecimiento del recién nacido (tabla 2.2, Goldman, 2000) y de que son potencialmente esenciales en el tratamiento de determinadas enfermedades, por lo que se ha sugerido incluso la suplementación de leches maternizadas en algunos de estos componentes para el tratamiento de ciertas patologías (tabla 2.3, Bohles *et al*, 1998).

**Tabla 2.2** Sitios de acción de distintos componentes bioactivos de la leche humana.

	<b>Lugar de acción</b>		
	<b>Epitelio</b>	<b>Sistema inmune</b>	<b>Sistema nervioso</b>
IGF-1	+	-	-
Poliaminas	+	-	-
TGF	+	+	-
Lactoferrina	+	+	-
Prolactina	+	+	-
TNF- $\alpha$	+	+	-

Oligosacáridos	+	+	-
IL-6	-	+	-
IL-10	-	+	-
Péptido vasoactivo	-	+	+
Sustancia P	-	+	+
Somatostatina	-	+	+

Goldman, 2000

**Tabla 2.3.** Suplementos en fórmula infantiles y fórmulas enterales destinados al tratamiento de determinadas patologías.

<b>Patología</b>	<b>Suplementación sugerida</b>
Síndrome de intestino corto	EGF, nucleótidos, poliaminas, glutamina, vitaminas
Inflamación crónica	Ácidos grasos w-3, vitamina E, carnitina, antioxidantes, cisteína
Infecciones	Antioxidantes, cisteína, oligosacáridos, lisozima, lactoferrina
Diarrea	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, taurina, antioxidantes, cisteína, nucleótidos, lactoferrina, lisozima

Bohles *et al*, 1998

A pesar de todos estos conocimientos, hoy día, las fórmulas infantiles carecen de muchos de estos compuestos, aunque, evidentemente, aportan todos los nutrientes básicos para el desarrollo del neonato.

### **3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.**

### 3.1. “FACTORES TRÓFICOS” DE LA LECHE MATERNA.

Los factores tróficos de la leche materna son fundamentalmente los siguientes: oligosacáridos, poliaminas, hormonas y factores de crecimiento, nucleótidos, lactoferrina, péptidos bioactivos, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, etc. A continuación se describen brevemente algunos de ellos, indicando qué son, su bioactividad y su presencia en las fórmulas infantiles actualmente comercializadas.

#### 3.1.1. Oligosacáridos.

La fracción glucídica de la leche humana se compone no solo de lactosa, que es el azúcar mayoritario, sino también de otros carbohidratos como por ejemplo azúcares de nucleótidos, glicolípidos, glicoproteínas y oligosacáridos. Estos últimos constituyen el tercer componente de la leche materna y últimamente son objeto de un gran número de investigaciones. Dichas biomoléculas constan de un extremo reductor con una molécula de lactosa y otro extremo no reductor con la presencia o no de ácido siálico y fucosa (Newburg, 1996), y están formados por combinaciones de 5 monosacáridos diferentes (apéndice 11.1): glucosa, galactosa, ácido siálico, fucosa y N-acetilglucosamina (McVeagh y Miller, 1997). Se calcula que la leche materna contiene alrededor de 8-10 g/L (Kunz *et al*, 1999a), habiéndose identificado más de 130 estructuras distintas (apéndices 11.2, 11.3 y 11.4), lo que implica una complejidad y variabilidad de oligosacáridos no encontrada en la leche de otras especies.

#### ***Los oligosacáridos de leche humana y la flora bifidogénica del lactante.***

En los primeros meses de vida, el feto y su tracto intestinal son estériles, pero, ya desde su nacimiento, una serie de factores ambientales, así como el tipo de parto y la forma de alimentación, condicionan una rápida colonización microbiana del aparato digestivo, demostrable a las pocas horas de vida, en lo que viene a representar la “primera herencia biológica adquirida” (Hanson y Korotkova, 2002).

El aparato digestivo del ser humano está colonizado por unos cien billones de microorganismos, un número 10 veces superior al número de células que componen el propio organismo. De entre las más de 400 especies descritas, sólo unas 30-40 representan el 99 % de la “flora intestinal microbiana normal”, que convive en estrecha simbiosis con el huésped. A la luz de los trabajos científicos aparecidos en los últimos años, parece claro que la flora bacteriana intestinal contribuye al mantenimiento de la salud y está ausente de cualquier patogenicidad, en especial las llamadas bacterias ácido-lácticas que conforman la flora bifidogénica, como son los Lactobacilos y las Bifidobacterias (Borriello *et al*, 2003).

La importancia de la flora bifidogénica radica en que la mucosa del colon es incapaz de nutrirse a través de la sangre, por lo que la demanda nutritiva debe suministrarse a través del lumen, donde la flora no patogénica produce los

siguientes nutrientes, algunos de los cuales inhiben o destruyen patógenos: ácidos grasos de cadena corta (favorecen un pH más bajo en el colon), aminoácidos (arginina, cisteína, glutamina), poliaminas, factores de crecimiento, vitaminas y antioxidantes (Cummings y Macfarlane, 1997; Metges, 2000; Milovic y Turchanowa, 2003).

Algunos de los efectos positivos para la salud y el bienestar de la flora microbiana intestinal, en especial la bifidogénica, son los siguientes: protección frente a bacterias patógenas (efectos bacteriostáticos y bactericidas), inhibición competitiva de la adhesión bacteriana (efecto barrera), consumo competitivo de nutrientes para el crecimiento de patógenos, regulación de la función digestiva (aumento de la digestibilidad de la leche y de la tolerancia a la lactosa y proteínas), actividad inmunomoduladora y de prevención de la alergia a macromoléculas, etc (Guarner, 2002). Asimismo, la microflora del ácido láctico puede participar en la degradación de compuestos tóxicos, la eliminación de sustancias cancerígenas y/o mutagénicas, producción de compuestos antimutagénicos o antitumorales, etc (Rafter, 2002).

Por otra parte, el interés de los investigadores por los oligosacáridos comenzó hace años con la observación de que podrían ser promotores de ésta flora bifidogénica en los niños alimentados al pecho (Mountzouris *et al*, 2002). Hoy día, existe evidencia científica que demuestra que los oligosacáridos poseen efectos beneficiosos para el niño recién nacido por su carácter prebiótico y propiedades anti-infecciosas (Kunz *et al*, 2000). Además, parecen ser resistentes a la hidrólisis enzimática del tracto gastrointestinal, como se comprueba mediante digestiones *in vitro* con preparaciones enzimáticas de páncreas humano y porcino y membranas intestinales (Engfer *et al*, 2000). En particular, se ha demostrado que menos del 5 % de los oligosacáridos de leche humana son digeridos en el tracto gastrointestinal (Gnoth *et al*, 2000), lo que implica su papel como prebiótico y/o su influencia sobre el sistema inmune local en el intestino del niño alimentado con leche materna. En este sentido, los oligosacáridos constituirían la “fibra soluble” de la leche humana, proporcionando sustrato para todas las bacterias beneficiosas en el colon del lactante, contribuyendo así a las diferencias en el pH y flora que existen entre los niños alimentados al pecho y con fórmulas infantiles (McVeagh y Miller, 1997).

Además, los oligosacáridos, por su efecto bifidogénico, estimulan el crecimiento de ciertas especies de lactobacilos y bifidobacterias capaces de excretar antibióticos naturales (por ejemplo lactocinas, helveticinas, lactacinas, curvacinas, nisina o bifidocina) con amplia actividad, ya que pueden ejercer un efecto antimicrobiano sobre numerosos patógenos gram-positivos y gram-negativos, tales como *Salmonella*, *Campilobacter* y *Escherichia Coli* (Guarner y Malagelada, 2003).

#### ***Los oligosacáridos de leche materna como receptores de patógenos.***

En la actualidad existe un creciente interés en el papel de los oligosacáridos de leche materna como receptores de patógenos (Tabla 3.1).

El hecho de que sean sintetizados por las mismas glicosiltransferasas que participan en la síntesis de las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de las células intestinales, hace que existan similitudes entre los carbohidratos de la superficie de las células epiteliales y los oligosacáridos. Esto apoya la hipótesis de que estos últimos actuarían como homólogos o análogos de los receptores celulares para microorganismos patógenos, produciéndose interacciones específicas entre ambos y actuando de esta forma como protectores de las células de la mucosa intestinal al ataque de los patógenos (Newburg, 1996). Constituirían un mecanismo de defensa adicional para los recién nacidos, cuyo pH gástrico es menos ácido que en el adulto y cuyo sistema inmunitario no está todavía maduro (McVeagh y Miller, 1997).

**Tabla 3.1.** Oligosacáridos presentes en la leche humana como receptores de microorganismos.

<b>Receptores</b>	<b>Microorganismo</b>
Glicoproteínas conteniendo manosa	<i>Escherichia coli</i> (tipo 1 Fimbrae)
Oligosacáridos fucosilados	<i>E.coli</i> (enterotoxina termorresist.)
Tetra y pentasacáridos fucosilados	<i>E. coli</i>
Sialil $\alpha$ (2-3) lactosa y glicoproteínas	<i>E. coli</i> (S-fimbriae)
Sialil ( $\alpha$ 2-3) galactósidos y mucinas	<i>E. coli</i> (S-fimbriae)
Oligosacáridos neutros	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Fuc ( $\alpha$ 1-2) Gal epítomos	<i>Candida Albicans</i>
Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc o Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sialil-lactosa	<i>Campylobacter pylori</i>
Sialil-lactosa	<i>Streptococcus sanguis</i>
Sialil-lactosa y glicoproteínas	<i>Campylobacter pylori</i>
Glicoproteínas sialiladas ( $\alpha$ 2-3)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Poli-N- acetillactosaminas	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
$\alpha$ (2-3) poly-N-acetillactosaminoglicanos	<i>Streptococcus suis</i>
Sialil $\alpha$ (2-3)lactosa	<i>Influenza virus A</i>
Sialil $\alpha$ (2-3)lactosa	<i>Influenza virus B</i>
9-O-Ac de NeuAc $\alpha$ (2-3) Rad	<i>Influenza virus C</i>

Kunz y Rudloff, 1993

De hecho, los niños alimentados al pecho muestran menores tasas de diarrea, enfermedades respiratorias, otitis media, y en general, enfermedades infecciosas (Newburg, 1999; Kunz *et al*, 2000) en comparación con aquellos alimentados con fórmula. Varios ejemplos se han descrito: inhibición del efecto tóxico de la toxina estable de *Escherichia coli* (Cravioto *et al*, 1991; Newburg *et al*, 1992; Crane *et al*, 1994), inhibición de la infección por *Campylobacter jejuni* (Cervantes *et al*, 1995), bloqueo de la unión de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* con sus respectivos receptores (Andersson *et al*, 1986), inhibición de la unión de *Helicobacter pylori* al epitelio gastrointestinal (Simon *et al*, 1997), etc. La tabla 3.2 recoge los patógenos más comúnmente conocidos y sus correspondientes ligandos de adhesión.

**Tabla 3.2.** Patógenos y sus correspondientes ligandos de adhesión.

<b>Patógeno</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Referencia</b>
<b>Bacterias</b>		
<i>Escherichia Coli</i> (Tipo 1-Fimb)	Man	Duguid y Gillies, 1957
<i>Escherichia Coli</i> (S-Fimbr)	NeuAc $\alpha$ (2-3)	Parkinen <i>et al</i> , 1983
<i>Escherichia Coli</i> (K 99)	NeuGc	Ouadia <i>et al</i> , 1992
<i>Escherichia Coli</i> (P-Fimbr)	Gal $\alpha$ (1-4) Gal	Strömberg <i>et al</i> , 1990
<i>Campylobacter pylori</i>	Monosialil-gangliosidos	Emödy <i>et al</i> , 1988
<i>Campylobacter pylori</i>	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal	Evans <i>et al</i> , 1988
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc / Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc	Andersson <i>et al</i> , 1986
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	GalNAc $\beta$ (1-3) Gal / GalNAc $\beta$ (1-4) Gal	Cundell y Tuomanen, 1994
<i>Streptococcus suis</i>	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal	Liukkonen <i>et al</i> , 1992
<i>Streptococcus suis</i>	Gal $\alpha$ (1-4) Gal	Haataja <i>et al</i> , 1992
<i>Streptococcus sanguis</i>	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	Murray <i>et al</i> , 1982
<i>Helicobacter pylori</i>	NeuAc $\alpha$ (2-3)	Hirno <i>et al</i> , 1996
<i>Helicobacter pylori</i>	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal	Miller-Prodraza <i>et al</i> , 1996
<i>Helicobacter pylori</i>	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	Simon <i>et al</i> , 1997
<i>Vibrio cholerae</i>	Fuc	Holmgren <i>et al</i> , 1983
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc / Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc	Ramphal <i>et al</i> , 1991
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Man	Cho-chou Kuo <i>et al</i> , 1996
<b>Virus</b>		
Influenza A	NeuAc $\alpha$ (2-6) Gal $\beta$ (1-4) Glc	Weis <i>et al</i> , 1988
Influenza B	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	Weis <i>et al</i> , 1988
Influenza C	NeuAc <sub>2</sub>	Rogers <i>et al</i> , 1986
Polyomavirus	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal $\beta$ (1-3) GalNAc	Cahan y Paulson, 1980
Rotavirus	NeuAc	Svensson, 1992
<b>Toxinas</b>		
Toxina de <i>Vibrio cholerae</i>	Gangliosido GM1 / NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	Idota <i>et al</i> , 1995
Toxina de <i>Escherichia Coli</i>	Fuc	Cravioto <i>et al</i> , 1991
Toxina Pertussin	NeuAc	Brennan <i>et al</i> , 1988
<b>Micoplasma</b>		
<i>Micoplasma pneumoniae</i>	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal con unidades de polilactosamina	Loveless y Feizi, 1989
<b>Hongos</b>		
<i>Candida albicans</i>	Fuc $\alpha$ (1-2) Gal $\beta$	Brassart <i>et al</i> , 1991
<b>Protozoos</b>		
<i>Trypanosoma cruzi</i>	NeuAc	Schenkman y Eichinger, 1993

Es importante destacar que las madres lactantes se diferencian genéticamente en su capacidad para producir oligosacáridos, y esto podría influir de manera importante en la susceptibilidad de los recién nacidos alimentados al pecho a las infecciones intestinales (Erney *et al*, 2001). La tabla 3.3 muestra las estructuras predominantes en leche humana en función del grupo sanguíneo.

**Tabla 3.3.** Estructuras predominantes en leche materna en función del grupo sanguíneo.

<b>Grupo sanguíneo</b>	<b>Estructura predominante</b>
H	Fuc $\alpha$ (1-2) Gal $\beta$ - Rad
Lewis <sup>a</sup>	Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ - Rad   Fuc $\alpha$ (1-4)
Lewis <sup>b</sup>	Fuc $\alpha$ (1-2) Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ - Rad   Fuc $\alpha$ (1-4)
Lewis <sup>x</sup>	Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ - Rad   Fuc $\alpha$ (1-3)
Lewis <sup>y</sup>	Fuc $\alpha$ (1-2) Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ - Rad   Fuc $\alpha$ (1-3)

**Los oligosacáridos de leche materna y la respuesta inflamatoria.**

Otro aspecto importante es la influencia de los oligosacáridos sobre la interacción entre leucocitos y células endoteliales. Existen actualmente agentes terapéuticos que bloquean dicha interacción, provocando un efecto dramático en la progresión de la respuesta inflamatoria en numerosos modelos animales. Dicho efecto se puede conseguir aplicando el anticuerpo apropiado o utilizando ligandos (carbohidratos sintetizados enzimáticamente) específicos para las selectinas, una familia de moléculas de adhesión celular que se expresan en la superficie de leucocitos, plaquetas y células endoteliales, que están directamente implicados en los fenómenos de adhesión celular durante los procesos inflamatorios (McEver, 1994; Springer, 1994; Lasky, 1995). Se ha demostrado que muchos oligosacáridos ácidos y fucosilados de leche humana poseen efectos similares (Kunz *et al*, 1999a).

Rudloff *et al* (2002) confirmaron la presencia de ligandos sialyl-Lewis entre la fracción de oligosacáridos de leche materna, lo que sugiere que podrían ser ligandos específicos de algunas selectinas y por tanto influir en la respuesta inflamatoria.

**Los oligosacáridos de leche materna como suministradores de ácido siálico.**

Además de todo lo señalado anteriormente, los oligosacáridos de la leche materna podrían desempeñar un importante papel como suministradores de ácido siálico, esencial para el desarrollo cerebral del lactante. Así, Sánchez-Díaz *et al* (1997), han encontrado valores más bajos de ácido siálico total y oligosacáridos en niños alimentados con fórmulas de iniciación que en aquellos alimentados con leche materna, concretamente un 36 y 28% menos

respectivamente, de los valores encontrados en niños alimentados al pecho. Por otro lado, Wang *et al* (2001) encontraron niveles de ácido siálico en leche materna entre 933 y 1405 mg/L, mientras que en fórmulas infantiles menos de 192 mg/L. Además, vieron que el ácido siálico presente en las fórmulas infantiles está unido a las proteínas de la leche, o está ausente por completo en aquellas que carecen de suero lácteo, mientras que en leche humana la mayoría del ácido siálico está unido a oligosacáridos libres que son capaces de actuar como receptores de patógenos.

Sin embargo, a pesar de la especial relevancia de los oligosacáridos en nutrición infantil, ninguna compañía suplementa sus fórmulas con oligosacáridos similares a los de la leche humana, debido tanto a la complejidad en la síntesis enzimática de dichas biomoléculas como a que no se ha encontrado hasta la fecha ninguna especie animal entre los mamíferos principales productores de leche cuya leche contenga una proporción de oligosacáridos similar a la leche materna, tanto cualitativa como cuantitativamente (Martínez-Férez *et al*, 2001). En este sentido, tan solo la leche de muy pocas especies, como por ejemplo la de elefante (20.8 g/L) o primate (0.5 – 1 g/L), han demostrado tener un perfil de oligosacáridos relativamente similar al de la leche humana (Kunz *et al*, 1999b; Warren *et al*, 2001), pero no ser una buena fuente de dichas estructuras dada su escasa producción y su difícil obtención.

No obstante, existen compañías que adicionan estructuras simples producidas enzimáticamente como fructooligosacáridos (FOS), de origen vegetal, y/o galactooligosacáridos (GOS), de origen lácteo, que poseen un efecto prebiótico estimulando de forma dosis-dependiente el crecimiento de *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* en el intestino (Moro *et al*, 2002), pero carecen del resto de funciones descritas previamente para los oligosacáridos de leche humana. Otros compuestos que actualmente se adicionan con las mismas carencias que los FOS y GOS son isomaltooligosacáridos y oligosacáridos obtenidos de la soja. Algunos ejemplos de productos infantiles enriquecidos con pre- y probióticos se muestran en la tabla 3.4.

**Tabla 3.4.** Alimentos infantiles presentes en el mercado enriquecidos con pre-y probióticos.

<b>Nombre</b>	<b>Producto</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Enriquecido con</b>
Almirón Omneo 1	Leche de inicio	Nutricia	FOS <sup>1</sup> / GOS <sup>2</sup>
Conformil 1	Leche de inicio	Milupa	FOS / GOS
Conformil 2	Leche de continuación	Milupa	FOS / GOS
Nativa 2	Leche de continuación	Nestlé	Bífidus BI <sup>3</sup> + ST <sup>4</sup>
Nidina 2	Leche de continuación	Nestlé	Bífidus BI + ST
Simbiotic	Leche de continuación	Nutribén	Bífidus BI y ST/FOS
Almirón Omneo 2	Leche de crecimiento	Nutricia	FOS / GOS
Baby 2	Leche de crecimiento	Hero	Bífidus Bb <sup>5</sup> y BI
Blemil 3 efecto bífidus	Leche de crecimiento	Ordesa	FOS
Blevit Plus Bífidus	Cereales infantiles	Ordesa	FOS

<sup>1</sup> FOS: fructooligosacáridos; <sup>2</sup> GOS: galactooligosacáridos; <sup>3</sup> BI: *Bifidobacterium longum*; <sup>4</sup> ST: *Streptococcus thermophilus*; <sup>5</sup> Bb: *Bifidobacterium bifidum*.

En base a todo lo expuesto, uno de los campos actuales de investigación es la influencia de la suplementación de los preparados para lactantes con oligosacáridos en la susceptibilidad de los recién nacidos a las enfermedades del tracto gastrointestinal, por ejemplo diarrea aguda.

### 3.1.2. POLIAMINAS.

Las poliaminas son un grupo de compuestos nitrogenados presentes en tejidos animales, bacterias y virus. Reciben distintos nombres, como putrescina (diamina), espermidina y espermina (poliaminas). Sus concentraciones varían según tejidos y órganos, pero aumentan durante los períodos de proliferación rápida, estimulando la síntesis proteica y la acumulación de nucleótidos. Por ello, son buenos marcadores del desarrollo y la proliferación de la mucosa intestinal y páncreas. En definitiva son esenciales para el crecimiento y diferenciación celulares (George y Defrancesca, 1989).

La leche humana contiene cantidades importantes de poliaminas, aunque sus niveles varían según los diversos autores. No obstante, parece claro que la concentración de poliaminas muestra el siguiente perfil: espermina>espermidina>putrescina, con una relación de espermidina/espermina de 0.78-0.86. Buts *et al* (1995), determinan una concentración media de espermina, espermidina y putrescina en leche humana de 313, 220 y 24 nmol/dL respectivamente. Numerosos factores modifican la cantidad de poliaminas en leche humana, como factores genéticos, fase de la lactancia, factores ambientales, y por supuesto, estado nutricional y dieta ingerida. Por ejemplo, estos autores describen que durante la primera semana posparto, los niveles de putrescina permanecen muy bajos mientras las concentraciones de las otras dos poliaminas aumentan considerablemente durante los tres primeros días hasta alcanzar valores 8-10 veces mayores que el primer día posparto.

#### ***Papel biológico de las poliaminas de la leche humana.***

Como hemos señalado anteriormente, las poliaminas son buenos marcadores del desarrollo y la proliferación de la mucosa intestinal y páncreas. A pesar de ello, su acción sobre el crecimiento, desarrollo y la permeabilidad intestinal no es del todo conocida y suscita controversia. Sin embargo, las investigaciones realizadas parecen indicar que las poliaminas son necesarias para el desarrollo intestinal, y más concretamente, pueden ejercer efectos tróficos directos sobre las células intestinales inmaduras, mejorando la permeabilidad de la mucosa. Buts *et al* (1993), consiguieron mediante administración oral de poliaminas a ratas recién nacidas prematuras una maduración intestinal prematura. Ter Steege *et al* (1997), mediante administración oral de espermina en ratones recién nacidos, obtuvieron paralelamente a una maduración bioquímica, una maduración del sistema inmune intestinal, afectando particularmente a la diferenciación de la población linfocitaria intraepitelial. Resultados positivos se han obtenido también en ensayos *in vitro* (Capano *et al*, 1998). De manera opuesta, la deprivación de poliaminas gastrointestinales mediante dietas deficientes en las mismas y la inhibición de la síntesis de poliaminas por bacterias mediante antibióticos orales,

conduce a una significativa hipoplasia del intestino delgado y mucosa colónica, evidenciando su importante papel como factores esenciales en el desarrollo intestinal (Loser *et al*, 1999).

Otro capítulo importante de la actividad biológica de las poliaminas de la leche materna es su posible acción como agentes preventivos de la alergia alimentaria. Una ingesta deficiente de poliaminas podría jugar un papel en la inducción de la sensibilización a alérgenos de la dieta. Estudios en humanos indican que existe una variabilidad individual de la concentración de poliaminas en la leche de las distintas madres debido a factores genéticos, dietéticos y de estilos de vida. En base a esto, la probabilidad de desarrollar alergia alimentaria por el niño puede llegar al 80% si la concentración media de espermina en leche es menor de 2 nmol/mL, y, 0% si la concentración de la misma es mayor de 13 nmol/mL. También se ha observado que la espermina incrementa la proliferación y diferenciación de linfocitos (Dandriofosse *et al*, 2000).

En cuanto a la concentración de poliaminas en los preparados para lactantes es menor que la de la leche humana. Buts *et al* (1995), estiman alrededor de 10 veces menos la cantidad de poliaminas en fórmulas para lactantes en polvo. Más aún, Capano *et al* (1998), sugieren que sólo la leche humana, y no la leche de vaca ni las fórmulas infantiles, contiene suficientes poliaminas para prevenir la inhibición del desarrollo celular intestinal en un modelo celular donde está inhibida la síntesis de poliaminas.

### 3.1.3. HORMONAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO.

Está claramente establecido que el calostro y la leche humana contienen numerosas hormonas y factores de crecimiento. Estas hormonas tienen influencia en un amplio número de sistemas. Entre estos sistemas se incluyen el sistema hipotalámico-hipofisario (ya que la leche contiene prolactina, somatostatina, oxitocina, etc), glándula tiroidea (ya que contiene hormona estimulante del tiroides, tirosina y calcitonina), glándulas sexuales (por su contenido en estrógenos y progesterona), y glándulas adrenales y pancreáticas (Koldovsky y Strbak, 1995).

Estos compuestos parecen tener poca influencia en el adulto debido a que la escasa permeabilidad del epitelio intestinal no deja pasar a la mayoría de estos factores. Ahora bien, es importante destacar que cuando estos compuestos son administrados a pacientes con afecciones intestinales (ej. enfermedad celíaca o de Crohn) la mayor permeabilidad intestinal asociada a estas patologías podría permitir que estos compuestos alcanzaran sus receptores y ejercer sus efectos fisiológicos. En los recién nacidos, al contrario que los adultos sanos, estos péptidos pueden penetrar debido a la mayor permeabilidad del tracto gastrointestinal. Además, la resistencia de estos péptidos y hormonas a la acción proteolítica del tracto gastrointestinal, que es condición indispensable para su acción, es grande y mucho mayor que en adultos. Por tanto, en recién nacidos estos compuestos parecen tener un papel funcional (Playford *et al*, 2000).

Se han realizado numerosos estudios (prácticamente todos en modelos celulares y animales) que evidencian el efecto beneficioso de estos compuestos en el desarrollo y estado inmunitario del recién nacido alimentado con leche materna. Entre estos compuestos podemos destacar:

- a. El *factor de crecimiento epidérmico (EGF)*, que podría participar en la regulación del desarrollo hepático e intestinal. Ingestas orales de EGF producen un aumento de síntesis de DNA, transcripción de RNA y como consecuencia, un aumento de la síntesis proteica, así como una estimulación del transporte de glucosa, agua y electrolitos (Bohles *et al*, 1998; Playford *et al*, 2000) y podría jugar un papel en la prevención del fenómeno de la traslocación bacteriana (Okuyama *et al*, 1998).
- b. El *factor  $\alpha$  transformador del crecimiento (TGF- $\alpha$ )*, cuyo papel fisiológico más importante, de acuerdo con la mayoría de los trabajos, es el mantenimiento de la continuidad del epitelio intestinal así como su normal funcionamiento (Playford *et al*, 2000).
- c. El *factor  $\beta$  transformador del crecimiento (TGF- $\beta$ )*, que parece estar implicado en numerosos procesos como desarrollo y diferenciación del epitelio intestinal, crecimiento, carcinogénesis y regulación de la respuesta inmune (Playford *et al*, 2000). Respecto a esta última, tiene un efecto crucial en dos mecanismos esenciales del sistema inmune de la mucosa intestinal: producción de Ig A e inducción de la tolerancia oral (Kalliomaki *et al*, 1999).
- d. *Factores de crecimiento insulínicos tipo I y II (IGF-I, IGF-II)*, expresados en grandes cantidades en el estómago e intestino fetal y alcanzando el máximo tras el nacimiento. Parecen promover la proliferación y diferenciación celular (Playford *et al*, 2000).
- e. *Hormona del crecimiento (GH)*, presente en calostro, leche humana y bovina. Parece ejercer un importante papel en el desarrollo y función intestinal (Playford *et al*, 2000).
- f. *Neuropéptidos*, como la neurotensina, sustancia P, somatostatina o el péptido vasoactivo. Parecen potenciar la respuesta inmunitaria mediante el incremento de producción de IgA (péptido vasoactivo), estimulación de células T, activación de macrófagos y producción de IL-12 (Goldman, 2000).

El interés por la presencia de todas estas sustancias biológicamente activas en la leche de mujer viene reforzado por su ausencia casi general en los preparados para lactantes.

### 3.1.4. NUCLEÓTIDOS.

Los nucleótidos son compuestos constituidos por una base nitrogenada purínica o pirimidínica, una pentosa y uno o varios grupos fosfatados. Pertenecen a la fracción nitrogenada no proteica de la leche materna que constituye entre el 18-30% del nitrógeno total, mientras que en la leche de vaca sólo constituye un 5%. Los nucleótidos representan del 2 al 5% del nitrógeno no proteico de la leche humana, cantidad no despreciable que podría contribuir a la excelente utilización de la proteína por los niños alimentados con leche materna. No obstante, la leche humana, además de nucleótidos, contiene significativas cantidades de compuestos relacionados, como nucleósidos, bases púricas y pirimidínicas, ácidos nucleicos y productos que se derivan de ellos, como la uridina difosfato galactosa (Gil y Uauy, 1995).

Los nucleótidos y sus metabolitos derivados desempeñan un papel clave en numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos, tales como procesos de transferencia de energía, precursores de la síntesis de ácidos nucleicos (DNA y RNA) y son claves en la síntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas. También actúan sobre el sistema inmunitario, metabolismo lipídico y funcionalidad hepática (Gil y Uauy, 1995).

Los nucleótidos pueden ser sintetizados endógenamente, sin embargo, pueden llegar a ser esenciales en ciertas ocasiones cuando esta síntesis es insuficiente para cubrir las necesidades del organismo, aunque su ausencia no provoque carencia en el sentido clásico del término. Ejemplo de estas situaciones son determinadas patologías, cuadros donde se limite la síntesis endógena, casos de déficit alimentario y períodos de crecimiento rápido como ocurre en el recién nacido (Uauy, 1989). Por ello se recurre al término semiesencial para describir el papel de los nucleótidos en la nutrición humana. En base a lo anterior, el aporte exógeno de estos nutrientes en tales condiciones ahorraría al organismo el costo de la síntesis de nucleótidos o el de la vía de recuperación de los mismos, optimizando las funciones hísticas. Una de estas situaciones fisiológicas donde los nucleótidos desempeñan un papel semiesencial es la del recién nacido, debido a que ciertos tejidos en rápido desarrollo como el epitelio intestinal o las células linfoides necesitan una cantidad incrementada de estos compuestos, situación que pasamos a tratar a continuación.

#### ***Papel biológico de los nucleótidos en el recién nacido.***

En primer lugar, es importante destacar que la leche humana es la exclusiva fuente de nucleótidos para el recién nacido en los primeros meses de vida y su perfil de nucleótidos es marcadamente diferente al de las fórmulas infantiles, así como al de la leche de vaca, cabra y oveja (Gil y Sánchez-Medina, 1982). Además, los datos referidos a la adición de nucleótidos a lactantes son limitados. Carver *et al* (1991), encuentran en lactantes alimentados al pecho y con fórmulas adicionadas de nucleótidos, un aumento de la actividad de NK y producción de IL-2 respecto de aquellos alimentados con preparados libres de nucleótidos. Pickering *et al* (1998) demostraron que fórmulas infantiles enriquecidas con nucleótidos al mismo nivel que la leche humana incrementa la respuesta inmune humoral produciendo anticuerpos frente a *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) y *diphtheria*.

Por otra parte, se han llevado a cabo diversos estudios que muestran el efecto de los nucleótidos en el perfil de ácidos grasos, provocando un aumento de las concentraciones plasmáticas y eritrocitarias de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga tanto en recién nacidos (Gil *et al*, 1986) como en modelos animales (Boza *et al*, 1992; Jiménez *et al*, 1992). Esos trabajos sugieren que los nucleótidos exógenos favorecerían la elongación a 20 átomos de carbono de los ácidos grasos esenciales. Otro mecanismo de actuación podría estar relacionado con la inhibición de la actividad de las desaturasas por altos niveles de 18:2n-6 (ácido linoleico) en la dieta (caso de algunos preparados para lactantes). De esta forma, los nucleótidos de la dieta favorecerían la desaturación y elongación de los ácidos grasos esenciales revertiendo la situación de inhibición de las desaturasas en situaciones de exceso de sustrato (ácido linoleico) en la dieta (Martínez-Valverde *et al*, 1996).

En base al carácter semiesencial de los nucleótidos, a su carencia en fórmulas maternizadas y a los distintos estudios mencionados que sugieren el potencial de los nucleótidos de la leche materna en inmunidad, absorción de hierro, flora intestinal, metabolismo lipídico, y desarrollo intestinal, se están adicionando en la actualidad a las fórmulas infantiles con el fin de aproximarlas lo más posible a la leche materna (Gil y Valverde, Patent # US 4.544.559, 1985).

### 3.1.5. LACTOFERRINA.

La lactoferrina es uno de los componentes más importantes de las proteínas de la leche materna, constituyendo alrededor del 10-15% de las mismas. El calostro contiene aproximadamente entre 2-3 g/L, mientras que en la leche madura desciende a 1-1,5 g/L (Lonnerdal *et al*, 1976). Más recientemente, Montagne *et al* (2001) detectaron niveles de lactoferrina de 5.8 g/L en calostro y 2.0 g/L en leche madura. Es una glicoproteína de peso molecular alrededor de 80.000 Da capaz de unirse a dos átomos de hierro férrico, conjuntamente con los aniones bicarbonato o carbonato. Debido a esta capacidad de ligante de hierro, se le han atribuido funciones de mantenimiento del status de hierro en el período neonatal y propiedades inhibitorias del crecimiento bacteriano como se describe más adelante.

Esta proteína posee la capacidad de resistir la proteólisis, especialmente en su forma saturada de hierro, por tanto, puede resistir en el intestino del lactante la acción de las enzimas pancreáticas y pepsina. Prueba de ello es la recuperación de lactoferrina intacta en deposiciones de lactantes alimentados al pecho o con lactancia artificial en numerosos estudios (Brines y Brock, 1983; Davidson y Lonnerdal, 1987). También se ha hallado en orina, lo que prueba que no sólo puede resistir la digestión sino también ser absorbida y excretada intacta (Hutchens *et al*, 1991).

#### ***Funciones biológicas atribuidas a la lactoferrina.***

Se han propuesto numerosas funciones fisiológicas, aunque unas deben ser consideradas con más precaución que otras. A continuación describimos las más importantes.

*a. Papel de la lactoferrina en la absorción de hierro.*

A partir del conocimiento de que una parte significativa del hierro en la leche humana va unida a la lactoferrina, se ha formulado la hipótesis de que la lactoferrina podría favorecer la absorción de hierro en los lactantes alimentados con leche materna. La capacidad de una parte de la lactoferrina de escapar a la digestión, así como la existencia de lactoferrina suficiente como para ligar la totalidad del hierro de la leche humana apoyan esta hipótesis (Lonnerdal, 1997). Más aún, se ha observado que los lactantes alimentados con leche materna, que contiene 0,2-0,4 mg/L de hierro, tienen un status de hierro a los seis meses de edad mejor que el de los alimentados con preparados para lactantes que tenían una mayor cantidad de hierro (0,7 mg/L) (Fransson y Lonnerdal, 1980). Saarinen *et al* (1977) encontraron una absorción del 50% del hierro en leche humana y del 20% en fórmulas infantiles. Sin embargo, diversos estudios realizados con aporte de lactoferrina bovina no encuentran diferencias significativas respecto de su adición o no a preparados con sulfato ferroso, argumentándose que esta falta de efecto puede deberse a que la lactoferrina bovina es incapaz de unirse a los receptores intestinales humanos (Lonnerdal, 1997).

*b. Papel de la lactoferrina como antimicrobiano, antiviral y antifúngico.*

Se han sugerido diversos mecanismos responsables de la actividad antimicrobiana de la lactoferrina (Naidu y Arnold, 1997). Esta capacidad antimicrobiana no es exclusiva de la lactoferrina íntegra, sino que se ha demostrado la existencia de derivados procedentes de la digestión de la misma con dicha capacidad. Kuwata *et al* (1998), evidencian la generación de péptidos antimicrobianos (lactoferricina) resultantes de la digestión de la ingesta oral de lactoferrina bovina.

En los últimos años ha cobrado gran interés la actividad antiviral de la lactoferrina. Los mecanismos de acción parecen estar relacionados con la inhibición del proceso de adsorción de la partícula viral por parte de la célula. Se ha encontrado este efecto protector en estudios *in vitro* con citomegalovirus, Herpes simplex, hepatitis C y otros (Yi *et al*, 1997; Marcheti, 1998). No obstante, existen otros estudios que muestran un efecto fungistático de la leche humana mediada por lactoferrina debido a su capacidad ligante del hierro (Andersson *et al*, 2000).

A través de todos estos mecanismos, y de algún otro, la lactoferrina humana puede desempeñar un papel esencial en la protección del recién nacido frente a infecciones gastrointestinales (Lonnerdal, 1997).

*c. Papel de la lactoferrina como factor de crecimiento.*

La lactoferrina parece estimular el crecimiento y la proliferación de la mucosa intestinal. Según Nichols *et al* (1987), la lactoferrina humana favorece la incorporación de timidina en el DNA de las células de las criptas de rata. Este efecto no parece ser dependiente de la presencia de hierro en la lactoferrina humana y el hecho de que la mayor parte de la misma no esté saturada de hierro parece apoyar esta hipótesis.

Debido a estas capacidades y dadas sus importantes funciones biológicas descritas, la lactoferrina está siendo añadida a algunas leches maternizadas. Para ello existen preparados comerciales de lactoferrina bovina y se investiga en la obtención de lactoferrina humana recombinante insertando el gen en el genoma de la levadura de cerveza, *Aspergillus*, células renales de hámster y/o vaca.

### 3.1.6. PÉPTIDOS BIOACTIVOS.

En los últimos años existe un creciente interés por determinados fragmentos específicos de las proteínas de la dieta, liberados tras la digestión de las mismas, que tienen una actividad biológica, regulando procesos fisiológicos, además de su valor nutricional. La literatura científica evidencia que estos péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, tracto gastrointestinal, y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían alterar el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Robert y Zaloga, 1994).

La gran diversidad de péptidos encontrados en leche humana y de vaca viene determinado por la variabilidad de las proteínas de una especie animal respecto de la otra. Por ejemplo, la caseína de la leche de vaca está formada por caseína  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  y  $\kappa$ , mientras que la caseína humana contiene sobre todo caseína  $\beta$  y un poco de caseína  $\kappa$ . La caseína parece ser la mayor fuente de estos péptidos, pero las proteínas del suero también contienen fragmentos con actividad biológica. En la tabla 3.5 se reflejan los principales péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis de las proteínas de leche humana y de vaca. Estos péptidos bioactivos se han obtenido mediante digestiones *in vitro*, con enzimas proteolíticas tanto de origen animal como microbiano, e *in vivo*, por digestión de la proteína precursora.

**Tabla 3.5.** Principales péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis de las proteínas de leche humana y de vaca.

	<i>Origen de la leche</i>	<i>Péptidos bioactivos</i>	<i>Bioactividad descrita</i>
Caseína $\alpha$	Vaca	$\alpha$ casomorfina	Actividad opiácea
	Vaca	caseína $\alpha$ exorfina	Actividad opiácea
	Vaca	casokinina	Actividad antihipertensiva
Caseína $\beta$	Humana	Vaca $\beta$ casomorfina	Actividad opiácea
	Humana	Vaca casokinina	Actividad inmunomoduladora
	Humana	Vaca Caseinfosfopéptido	+ antihipertensiva Biodisponibilidad mineral
Caseína $\kappa$	Vaca	Caseinmacropéptido	Modulación de la motricidad gastrointestinal y liberación de hormonas
	Humana	Vaca Casoxina Casoplatelinas	Antagonista opiáceo Actividad antitrombótica
$\alpha$ -lactoalbúmina	Humana	Vaca Fragmentos 50-53	Actividad opiácea

$\beta$ -lactoglobulina	Vaca	$\beta$ -lactofinas	Actividad opiácea + antihipertensiva
Lactoferrina	Vaca	Lactoferrosina	Antagonista opiáceo
Lactotransferrina	Humana		

**Beneficios de los péptidos bioactivos.**

*a. Péptidos con efectos sobre el sistema digestivo.*

Se han aislado péptidos que muestran actividad opiácea. Éstos, se unen a los receptores en el lumen intestinal y actúan como moduladores exógenos de la motilidad gastrointestinal, permeabilidad intestinal y liberación de hormonas intestinales. Entre ellos se encuentran las casomorfina, péptidos de 4-10 aminoácidos derivados de la  $\alpha$  y  $\beta$  caseína. Concretamente las  $\beta$ -casomorfina son capaces de reducir la secreción gástrica y la motilidad intestinal, importante efecto para el tratamiento de la diarrea, e incluso podrían ejercer un efecto local, sin necesidad de absorción sistémica, reduciendo el reflejo peristáltico mediante reducción de la respuesta refleja (Allescher *et al*, 2000).

También se han descrito péptidos de actividad opioide antagonista, como las casoxinas (procedente de  $\kappa$ -caseína) y lactoferroxinas, que podrían antagonizar el efecto de inhibición de la motilidad gástrica inducida por las casomorfina. En la leche madura domina la actividad opioide dado que las  $\alpha$  y  $\beta$  caseínas se encuentran en mayor concentración que la  $\kappa$ -caseína (Schanbacher *et al*, 1998).

Otros péptidos de acción sobre el sistema gastrointestinal son los llamados caseinmacropéptidos, relacionados con la secreción de la hormona colecistoquinina reguladora de la secreción pancreática y reguladora del vaciamiento gástrico (Beucher *et al*, 1994). El denominado glicomacropéptido (GMP) ha sido objeto de numerosos estudios. Es el resultado de la inicial digestión de la  $\kappa$ -caseína con obtención de la  $\kappa$ -paracaseína y el GMP, que comprende los aminoácidos 106-169 de la  $\kappa$ -caseína. Se le atribuyen numerosas funciones biológicas como ser factor estimulador de bifidobacterias (al contener oligosacáridos), fuente de ácido siálico (importante para el desarrollo cerebral del lactante), actividad antiviral (debido a los residuos de ácido siálico), modulador de las secreciones gástricas y puede ser objeto de nuevas digestiones dando lugar a péptidos bioactivos con actividad antitrombótica (Steijns, 1996).

*b. Péptidos con efectos inmunomoduladores y antimicrobianos.*

Suelen ser pequeños péptidos de 4-6 aminoácidos, como por ejemplo el Met-enkephalin, que altera la respuesta inmune y retrasa la respuesta de hipersensibilidad cutánea (Jankovic y Maric, 1990). Como ejemplo de

actividad antimicrobiana, podemos citar fragmentos de la caseína  $\alpha$  conocidos como isracidina, que muestran *in vivo* un efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* (Lahov y Regelson, 1996).

c. *Péptidos con efectos sobre el sistema cardiovascular.*

Los principales efectos descritos sobre el sistema cardiovascular son de actividad antihipertensiva y actividad antitrombótica. Los péptidos que poseen actividad antihipertensiva lo hacen por inhibición de la enzima de la conversión de angiotensina. Esta enzima es clave en la regulación de la presión sanguínea al convertir la angiotensina I en angiotensina II que es un potente vasoconstrictor. Se han descrito tres péptidos de la  $\alpha_{s1}$  caseína y dos de la  $\beta$ -caseína que muestran esta actividad (Schlimme y Meissel, 1995). El efecto antitrombótico de otra serie de péptidos procedentes, entre otros lugares, de la caseína-  $\kappa$  de la leche de vaca, parece venir dada de la similitud estructural de éstos con la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno, de forma que entran en competencia con los receptores plaquetarios, inhibiendo así, la agregación plaquetaria (Jolles *et al*, 1986).

Hoy en día, existen diferentes fórmulas nutricionales que contienen péptidos, pero el tipo y cantidad de los mismos varía de unas a otras dependiendo de la fuente proteica utilizada (caseína, lactoalbúmina, soja, carne) y del grado y tipo de hidrólisis enzimática empleada. Se han obtenido mejores respuestas inmunológicas en ratones alimentados con hidrolizados de lactoalbúmina que de caseína (Bounous y Kongshavn, 1982), mejor respuesta inmune con caseína que con proteína de legumbres (Martínez *et al*, 1992) y menor presión arterial en individuos alimentados con proteína vegetal que con animal (Rouse y Beilin, 1994).

### **3.1.7. SUPLEMENTACIÓN DE FÓRMULAS INFANTILES CON FACTORES TRÓFICOS.**

En base a las importantes funciones biológicas descritas anteriormente para los factores tróficos de la leche materna y que son nutrientes potencialmente esenciales en períodos de crecimiento y desarrollo o cuando la capacidad de síntesis no supera las necesidades de los mismos, como es el caso del recién nacido, la adición de factores tróficos a las fórmulas infantiles aportaría un nuevo paso en el difícil reto de conseguir maternizar lo máximo posible las leches para lactantes existentes en el mercado. Por otro lado, además de su potencial aplicabilidad en nutrición infantil, la suplementación de alimentos funcionales específicos para la tercera edad con algunos de estos factores tróficos, e incluso en nutrición clínica y hospitalaria para el tratamiento de pacientes con ciertas patologías, como síndrome de intestino corto e inflamación crónica, podría contribuir a una mejor y más rápida recuperación, y en definitiva a mejorar la calidad de vida de estas personas.

No obstante, dicha suplementación está condicionada por la dificultad de síntesis, tanto por vía enzimática como biotecnológica, y por la posibilidad de aislamiento de dichas biomoléculas minoritarias en caso de existir una fuente natural rica en las mismas.

En la actualidad existe una amplia gama de técnicas para la separación y purificación de compuestos minoritarios de matrices complejas, algunas de las cuales se describen a continuación.

### 3.2. SEPARACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS MINORITARIOS.

En la separación de compuestos bioactivos (proteínas, péptidos y otros componentes minoritarios de bajo peso molecular) existe una amplia gama de procesos, entre los que se pueden mencionar los siguientes: métodos cromatográficos (de fase normal y reversa, de adsorción, de intercambio iónico, de exclusión por tamaño, por afinidad), separación multidimensional (electroforesis bidimensional en gel y cromatografía multidimensional), tecnología de membranas, sistemas de dos fases, purificación y electroforesis capilar (Larive *et al*, 1999). De entre todos los métodos mencionados, a excepción de la tecnología de membranas, ninguno ha tenido implantación a gran escala, bien por su complejidad, alto costo, pobre selectividad, baja producción y/o degradación (asociada a pH, temperatura o concentración de sales usados en el proceso) inaceptable del producto (Zydney, 1998).

Así por ejemplo, Pearce (1992) desestimó la cromatografía de intercambio iónico para el fraccionamiento de proteínas y componentes de bajo peso molecular por ser anti-económico a gran escala, aunque conducía a una separación efectiva. En este sentido, Skudder (1985) demostró que la resina de intercambio aniónico Spherosil-QMA adsorbía preferentemente  $\beta$ -lactoglobulina a pH 6.63 con una mínima adsorción de inmunoglobulinas, lactoferrina y lactoperoxidasa, aunque a nivel industrial su aplicación era económicamente inviable.

También se han usado procesos de precipitación selectiva por combinación de cambios de pH, concentración de sales y temperatura, aunque no han llegado a utilizarse a escala comercial debido a los altos costes y la gran cantidad de efluentes no deseados (Maubois y Ollivier, 1997). Por ejemplo, según Amundson *et al* (1982), la proteína  $\beta$ -lactoglobulina puede ser precipitada del suero a pH 4.65, o las inmunoglobulinas utilizando sulfato de sodio o amonio (Maubois y Ollivier, 1997).

Sin embargo, la tecnología de separación por membranas tiene en el presente un alto impacto industrial, con un mercado en constante crecimiento ya que es efectiva y económicamente viable. En este sentido, se aplica a un amplio rango de procesos de separación y/o concentración debido a que ofrece ventajas respecto a los métodos convencionales mencionados, tales como reducción de costes, mayor selectividad y menor aparición de productos no deseados (puesto que no se requieren aditivos), mayor simplicidad, posibilidad de llevar a cabo la operación en continuo, menor consumo de energía (ya que no hay un cambio de fase asociado al proceso), facilidad de combinación con otros procesos, posibilidad de efectuar la operación en condiciones no severas y fácil escalado.

Dado que es la tecnología de mayor viabilidad, se describirá en más detalle y se recogerán las investigaciones más relevantes.

### 3.2.1. SEPARACIÓN POR MEMBRANAS: GENERALIDADES.

En general, la filtración se define como la separación de dos o más componentes de una corriente fluida (Cheryan, 1986), siendo en este caso la membrana la que actúa como barrera selectiva entre dos fases: la alimentación y el filtrado o permeado (Figura 3.1).

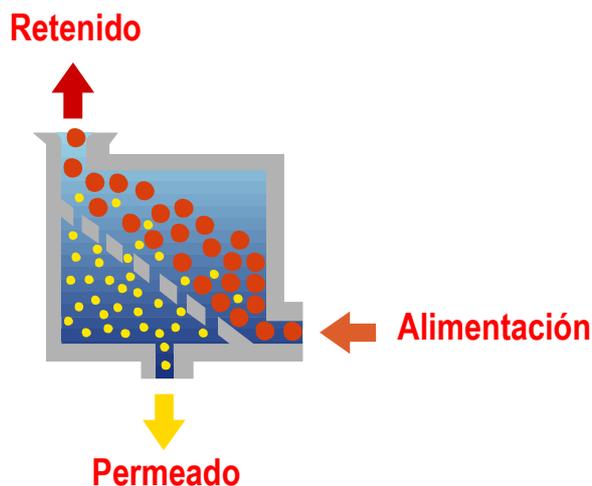


Figura 3.1. Diagrama general de un proceso de filtración por membranas.

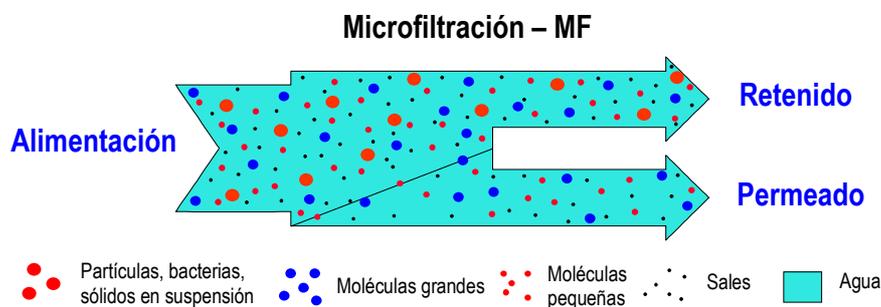
#### **Clasificación de los procesos de separación por membranas.**

Los procesos de membrana en los que la fuerza impulsora es la presión se clasifican generalmente en 4 categorías, basándose en las partículas o moléculas separadas, y por tanto en función del tamaño de poro de la membrana, que son: microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (RO). A medida que se reduce el tamaño de poro, la resistencia a la transferencia de materia se hace mayor y por tanto la presión a aplicar tiene que ser mayor. A continuación se describen cada uno de ellos.

- *Microfiltración (0.05-10  $\mu\text{m}$ , 0.5-3 bar).*

La microfiltración se utiliza para separar partículas en el rango de 0.05 a 10  $\mu\text{m}$  utilizando membranas porosas, y suele trabajar con presiones en un rango entre 0.5 y 3 bar (figura 3.2). La mayoría de las membranas de microfiltración suelen estar fabricadas con materiales poliméricos, aunque los materiales inorgánicos son también muy utilizados, tales como alúmina, zirconio, titanio, carbono y varios metales (acero, estaño, níquel, etc). Se utilizan principalmente para retener sólidos suspendidos y pueden usarse en procesos de clarificación (como paso previo de limpieza), esterilización y concentración. Algunas aplicaciones importantes son: esterilización en frío de bebidas y

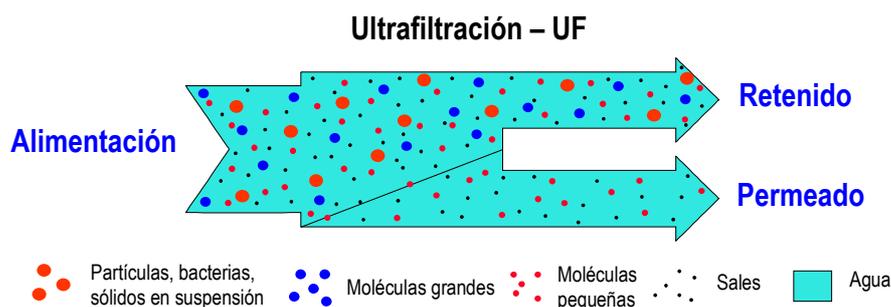
productos farmacéuticos, clarificación de zumos de frutas, vino y cerveza, recuperación de metales como óxidos o hidróxidos coloidales, tratamiento de aguas residuales y de superficie y separación de emulsiones aceite-agua.



**Figura 3.2.** Esquema general de un proceso de microfiltración.

- *Ultrafiltración (0.1-0.001  $\mu\text{m}$ , 1-10 bar).*

La ultrafiltración se utiliza para retener moléculas de relativo gran tamaño en un rango entre 2 y 100 nm, como por ejemplo proteínas, polímeros o partículas coloidales y emulsiones, aplicando presiones comprendidas entre 1 y 10 bar (figura 3.3). Las moléculas pequeñas tales como sales y disolventes o solutos de bajo peso molecular pueden pasar libremente a través de la membrana. Al igual que en microfiltración, las membranas de ultrafiltración pueden estar fabricadas tanto de polímeros como de materiales inorgánicos. La ultrafiltración tiene muchas aplicaciones como etapa de concentración y purificación en la industria láctea (leche, lactosuero, queso, etc) y alimentaria (almidón, proteínas, etc), así como en metalurgia, industria textil (recuperación de tintes) y del automóvil (recuperación de pinturas) y tratamiento de aguas residuales.

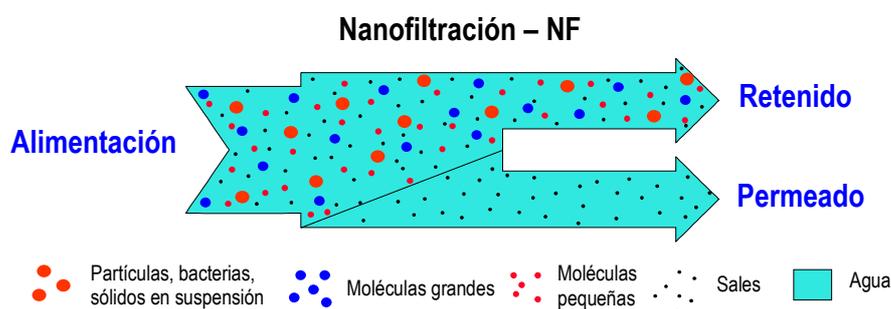


**Figura 3.3.** Esquema general de un proceso de ultrafiltración.

- *Nanofiltración (0.005-0.0005  $\mu\text{m}$ , 5-30 bar)*

La nanofiltración es un proceso de membrana intermedio entre la ultrafiltración y la ósmosis inversa, empleado para retener moléculas orgánicas de bajo peso molecular (200-1000 Da) e iones multivalentes, como por

ejemplo  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 3.4). La separación de iones se realiza en base a sus características de difusión y carga, con lo que dicha separación se encuentra gobernada por fenómenos de transferencia de materia, consistentes en difusión y flujo a través de poros. Las presiones aplicadas se mueven en el rango comprendido entre 5-30 bar, relativamente bajo en comparación con la ósmosis inversa. Las membranas de nanofiltración son principalmente membranas compuestas (composite), más parecidas a las de ósmosis inversa que a las de ultrafiltración. Las principales aplicaciones de este proceso son la separación de pequeñas moléculas, tales como péptidos, enzimas, antibióticos, tintes, herbicidas, pesticidas e insecticidas, eliminación de la dureza del agua y tratamiento de aguas residuales.



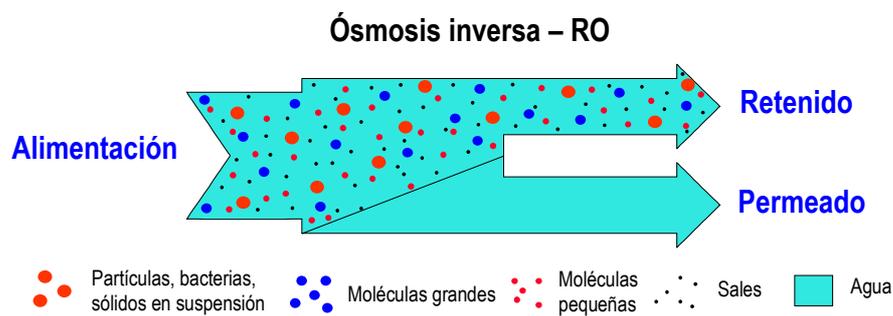
**Figura 3.4.** Esquema general de un proceso de nanofiltración.

- Ósmosis inversa ( $<0.0005 \mu\text{m}$ , 10-50 bar).

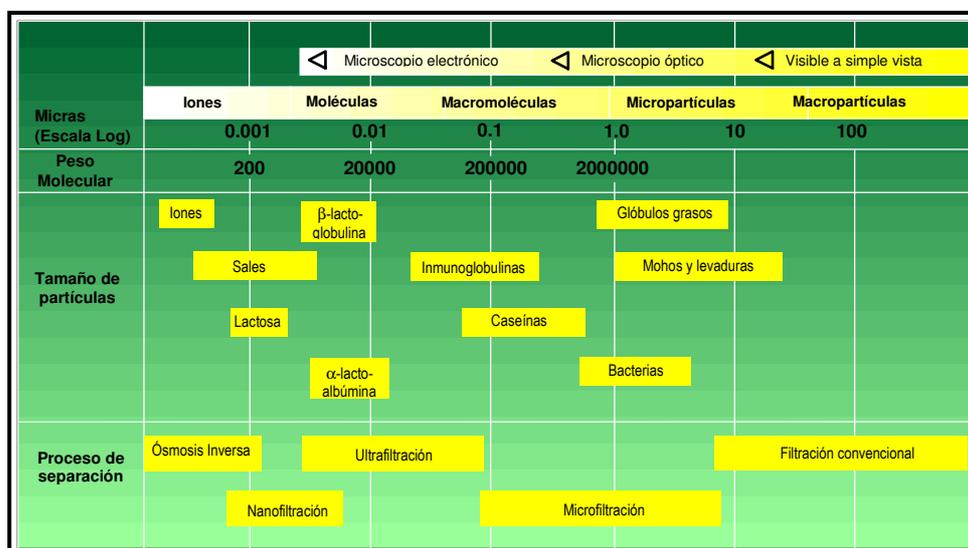
La ósmosis inversa permite retener moléculas de bajo peso molecular, tales como las sales. La retención de disolventes orgánicos generalmente no es alta debido a que se disuelven en la membrana. La resistencia de ésta es mayor que en la nanofiltración, lo que implica que el flujo, para una presión determinada, es siempre menor. Las presiones a aplicar son del orden de 10 a 50 bar. Se utilizan membranas tanto asimétricas como compuestas, siendo los materiales más comunes triacetato de celulosa, poliamidas aromáticas y polibenzimidazoles.

Su mayor campo de aplicación está en la desalinización de agua de mar, producción de agua ultrapura, concentración de zumos, azúcares y leche en la industria alimentaria y tratamiento de aguas residuales. La figura 3.5 muestra un esquema general de un proceso de ósmosis inversa.

En concreto, para la leche, se pueden sintetizar de forma esquemática los componentes que separa cada operación de acuerdo con la figura 3.6.



**Figura 3.5.** Esquema general de un proceso de ósmosis inversa.



**Figura 3.6.** Espectro de filtración de los componentes de la leche por procesos de membrana.

**Morfología y materiales de membrana.**

Las membranas se pueden clasificar atendiendo a su morfología y al material en que están fabricadas. Desde el punto de vista de su morfología, se distinguen básicamente 3 tipos de membranas: homogéneas, asimétricas y compuestas (A. Guadix, Tesis Doctoral, 2001).

*a. Membranas homogéneas.*

Las membranas homogéneas tienen un espesor comprendido entre 10 y 200  $\mu\text{m}$ , siendo la resistencia a la transferencia de materia proporcional al espesor de la membrana. No obstante, se encuentran poco desarrolladas puesto que presentan una permeabilidad relativamente débil.

*b. Membranas asimétricas.*

Las membranas asimétricas, también denominadas anisotrópicas, están constituidas por una película fina y densa superior de 0.1 a 1.5  $\mu\text{m}$  de espesor, soportada por una sub-capa porosa de estructura relativamente porosa con un espesor de entre 50 a 150  $\mu\text{m}$  que permite un elevado flujo de solvente. Por tanto, combina la selectividad de una membrana densa con el alto índice de permeabilidad de una membrana delgada, puesto que la resistencia a la transferencia de materia está determinada fundamentalmente por la primera película.

*c. Membranas compuestas.*

Un tipo especial de membranas asimétricas, son las membranas compuestas, que fueron desarrolladas con el fin de aumentar la permeabilidad de las membranas asimétricas mediante una disminución del espesor de la capa activa. Se elaboran depositando una delgada película semipermeable de 10 a 100 nm sobre un soporte poroso de polisulfonas u otros polímeros. Entre el soporte y la capa activa se sitúa una capa mesoporosa que actúa de unión entre capas y aporta estabilidad al conjunto. El soporte macroporoso y la capa activa están formados de materiales diferentes, de ahí el nombre de "compuestas".

A su vez, en cuanto al material del que están fabricadas, las membranas porosas de filtración se clasifican en orgánicas, minerales o inorgánicas y líquidas. A continuación se describen brevemente cada una de ellas.

*a. Membranas orgánicas.*

Las membranas orgánicas están fabricadas a base de polímeros o mezcla de estos, como por ejemplo acetato de celulosa, poliamidas, polisulfona, etc. Se hallan bien desarrolladas y son competitivas en cuanto a sus propiedades de separación y costes. Pueden ser hidrofílicas, si están hechas de materiales altamente polares con alta afinidad por el agua, como ésteres celulósicos, poliamidas alifáticas, etc o bien hidrofóbicas, si se componen de materiales apolares con baja afinidad por el agua, como polietileno, polipropileno, etc.

Las primeras membranas orgánicas fueron las de acetato de celulosa, en las que el material de base es la celulosa en las que se reemplazan uno o varios grupos hidroxilo por grupos acetilo. Su fabricación es fácil y barata y ofrece baja adsorción de proteínas, por lo tanto, poseen una tendencia al colmatado inferior a otros polímeros. Sin embargo, este tipo de polímero actualmente está en desuso puesto que presenta sensibilidad a la temperatura, pH y cloro, lo que dificulta el trabajo a temperaturas elevadas sobre todo durante los procesos de limpieza. Igualmente, son

sensibles a la degradación por parte de microorganismos y a la compactación por efecto de la presión aplicada, lo que disminuye la permeabilidad y modifica la selectividad.

Las membranas de poliamidas fueron desarrolladas para las aplicaciones de ósmosis inversa y nanofiltración, teniendo en cuenta los inconvenientes del acetato de celulosa. Este material tiene mayor resistencia a temperaturas elevadas, mejor estabilidad química, mayor tolerancia a pHs extremos y una resistencia mecánica superior. No obstante, tiene gran sensibilidad a los oxidantes, en concreto al cloro, permeabilidad reducida y presenta problemas de adsorción, en particular de proteínas, debido a su carácter menos hidrófilo que el acetato de celulosa.

Por su parte, las membranas de polisulfonas se caracterizan por tener un grupo  $-SO_2-$  relativamente estable. La carga de la membrana va a depender en cada momento del pH de la solución en contacto con ella. Actualmente alcanzan una gran difusión en el mercado, ya sea formando la capa activa o como base de los componentes macroporosos. Ofrecen una buena estabilidad térmica, correcta resistencia a los pHs extremos (1-13), lo que le confiere un gran interés desde el punto de vista de la limpieza, y buena resistencia a concentraciones de cloro relativamente elevadas (5-200 mg/L) según el período de exposición. Aunque las evoluciones habidas en los últimos años han mejorado esta característica, tienen cierta sensibilidad al compactado, dado que en general no soportan presiones superiores a 25 bar.

Otros materiales ampliamente utilizados en la fabricación de membranas orgánicas son los polímeros acrílicos y los fluorados. Los principales polímeros acrílicos utilizados son el ácido acrílico (también conocido como ácido acroleico) y el poliacrilonitrilo, ya sea bien solos, asociados (ácido acrílico sobre poliamidas o polialcoholes) o formando copolímeros. Ofrecen buena estabilidad térmica y química y la posibilidad de almacenado en seco. Por el contrario, su resistencia mecánica es limitada y se encuentra dificultad para obtener pequeños diámetros de poro. En cuanto a los polímeros fluorados se emplean exclusivamente en microfiltración, siendo los más comunes el polifluoruro de vinilideno (PVDF) y el politetrafluoroetileno (PTFE), ya sea de forma aislada, formando uniones con otros polímeros o en forma de copolímeros unidos. Su resistencia térmica y estabilidad química son excelentes, aunque la permeabilidad es reducida, debido al carácter hidrófobo de la membrana, siendo también difícil obtener pequeños diámetros de poro.

#### *b. Membranas inorgánicas o minerales.*

Las membranas inorgánicas o minerales son conocidas como las membranas de tercera generación por ser las más avanzadas del mercado. Las de soporte de carbono están constituidas por tubos de carbono poroso de 6 mm de diámetro interior, 2 mm de espesor y 1200 mm de longitud. El interior del tubo está recubierto de una capa fina de óxido de zirconio de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de espesor. Estas membranas son susceptibles de separar moléculas con una masa molar de 20000 o más hasta partículas de 0.1  $\mu\text{m}$ .

Las membranas inorgánicas compuestas de alúmina han surgido de la investigación realizada en la industria nuclear. En el mercado se encuentran fundamentalmente bajo la geometría tubular y de monolito o multicanal, es decir, se trata de un bloque cerámico atravesado en toda su longitud por varios canales. El soporte suele estar realizado en alúmina  $\alpha$  con un diámetro de poro de 12  $\mu\text{m}$ . Las capas activas con un espesor de 20  $\mu\text{m}$  pueden tener diferente naturaleza (alúmina  $\alpha$ , alúmina  $\gamma$ , óxido de zirconio), según el diámetro de poro deseado.

Con las membranas minerales se puede trabajar a pHs comprendidos entre 0 y 14 y a presiones de 20 bar. Son muy pocos los agentes químicos que afectan a estas membranas, excepto el ácido fluorhídrico, y en el caso de membranas en base de alúmina, el ácido fosfórico. Además, soportan temperaturas de esterilización, por lo que son de gran aplicabilidad en la industria alimentaria dadas las normas higiénicas exigidas. Además, se caracterizan por su capacidad de "backflushing", técnica por la que se aplica presión desde la corriente de filtrado hacia la alimentación o retenido, a fin de cambiar el sentido del flujo en el interior de los poros de la membrana y así mejorar los fenómenos de fouling. Sin embargo, su precio es muy elevado y el volumen muerto es muy importante (1.5 L/m<sup>2</sup>) debido a su configuración tubular.

#### *c. Membranas líquidas.*

Las membranas líquidas se utilizan tanto adsorbidas en capilares como emulsionadas, y aunque han sido muy estudiadas, se les han encontrado pocas aplicaciones a nivel industrial. Una de ellas es la recuperación de uranio del agua de mar y las salmueras (Franklin *et al*, Patente CU #22269 A1, 1989).

Por otra parte, en cuanto a los métodos de fabricación de membranas porosas de filtración, es importante resaltar que tanto el material de la membrana como el tamaño de poro deseado influyen en la selección del método más apropiado. En este sentido, los principales métodos de fabricación de membranas son los siguientes: separación o inversión de fases para las membranas orgánicas de microfiltración o ultrafiltración, polimerización interfacial para las membranas orgánicas de nanofiltración y ósmosis inversa y sinterización para las membranas minerales de microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración.

#### **Configuraciones de membrana.**

Para sus aplicaciones industriales, las membranas deben montarse sobre unos determinados soportes denominados módulos, que le confieren diferentes configuraciones: plana, espiral, tubular y de fibra hueca; algunas de éstas configuraciones se muestran en la figura 3.7.

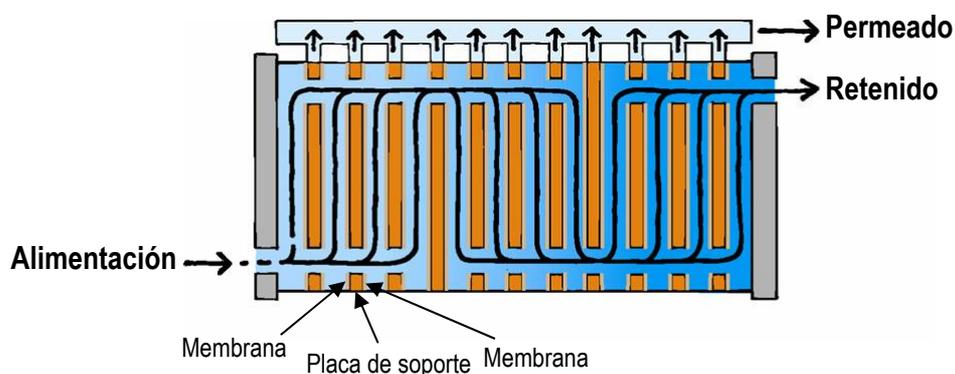


**Figura 3.7.** Configuraciones de membrana plana, espiral y tubular (cedido por Invensys APV group, New York, USA).

A continuación se describen brevemente cada una de ellas:

a. *Módulos planos.*

La configuración en módulos planos es la más simple y la más antigua. Se puede presentar en forma de placas unitarias o en forma de cartucho (figura 3.8). Uno de los parámetros importantes es la distancia entre membranas. Una distancia reducida hace necesaria la prefiltración, dificulta la limpieza e impide el tratamiento de productos viscosos. Por otra parte, una distancia elevada implica un volumen muerto importante, aunque disminuye la energía necesaria para el bombeo.



**Figura 3.8.** Esquema de una membrana de configuración plana en forma de cartucho.

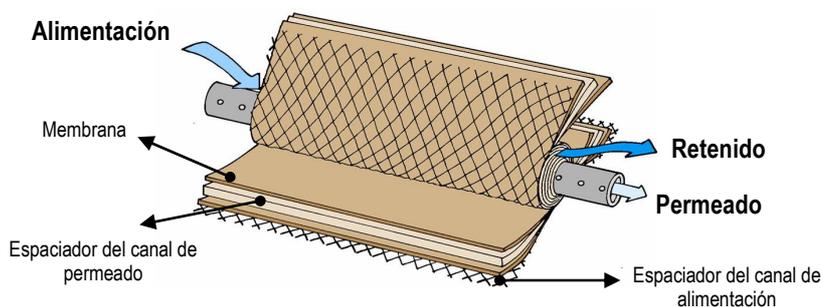
Este sistema es muy modular, pudiendo ser modificado de manera relativamente sencilla, con gran facilidad para el recambio de membranas. No obstante, el sistema es poco compacto (de 100 a 400 m<sup>2</sup> por m<sup>3</sup>) y requiere una inversión relativamente elevada. La figura 3.9 muestra membranas planas reales utilizadas a escala industrial.



**Figura 3.9.** Membranas de configuración plana.

b. *Módulos espirales.*

En los módulos de configuración espiral, las membranas planas son enrolladas alrededor de un tubo perforado y hueco destinado a conducir el permeado, tal como se muestra en la figura 3.10. Entre las membranas se instala una rejilla plástica de espesor variable, que tiene la función de separar las membranas y, al mismo tiempo, crear una turbulencia en la vena del fluido.



**Figura 3.10.** Enrollamiento de membranas planas en configuración espiral.

Para poder ejercer la presión necesaria al proceso, los rulos de membrana, denominados cartuchos, son insertados en cuerpos de presión tubulares con un sistema de juntas en los extremos (figura 3.11). En general, en un tubo de presión se instalan varios cartuchos. El sistema es modular, pudiendo ser adaptado a las necesidades de la industria con relativa facilidad.

La compacidad de éstos módulos es elevada (de 300 a 1000 m<sup>2</sup> por m<sup>3</sup>), el coste de inversión es relativamente reducido y el consumo energético es bajo. Por el contrario, presenta baja adaptabilidad a productos viscosos, con flujos reducidos. Las pérdidas de carga y la colmatación son elevadas y aparecen zonas muertas.



**Figura 3.11.** Membranas de configuración espiral.

- *Módulos tubulares.*

Los módulos tubulares están constituidos por tubos porosos sobre los cuales está fijada la membrana. El diámetro del tubo resulta de un compromiso entre el consumo de energía (que disminuye con el diámetro) y el coste de fabricación (que aumenta con el diámetro). Al tratarse de tubos con diámetros relativamente importantes, los módulos tubulares pueden aceptar fluidos relativamente cargados de partículas y ofrecen sencillez en la instalación, limpieza y reemplazamiento de las membranas. Las figuras 3.12 y 3.13 muestran membranas tubulares cerámicas y orgánicas respectivamente (Invensys APV group).

Según Martínez-Alonso (1999), las ventajas de la configuración tubular frente a las demás son las siguientes: facilidad de limpieza, simplificación de los pretratamientos, simplicidad de la tecnología de reemplazo e instalación de las membranas y, por último, posibilidad de escalar el proceso con fiabilidad. Además, si se comparan las membranas cerámicas tubulares con las planas en un proceso de filtración de leche, se aprecia que debido a la diferencia de velocidades de circulación entre ambas en idénticas condiciones de presión, las planas necesitan más superficie (Grangeon y Lescoche, 2000).



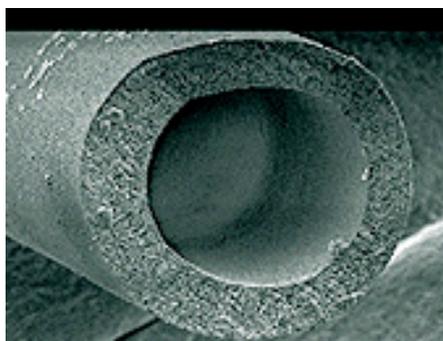
**Figura 3.12.** Membranas cerámicas tubulares.



**Figura 3.13.** Membranas orgánicas tubulares.

d. *Módulos de fibra hueca.*

Los módulos de fibra hueca pueden ser considerados como módulos tubulares compuestos de tubos de pequeño diámetro (figura 3.14). Generalmente, los tubos huecos tienen un diámetro exterior comprendido entre 50 y 1000  $\mu\text{m}$  y un diámetro interior entre 25 y 800  $\mu\text{m}$ , y se obtienen mediante procesos de hilado análogos a los utilizados en la industria textil. La diferencia con los módulos tubulares es que éstos están constituidos por una membrana activa y un soporte inerte, mientras que las fibras huecas juegan a la vez el papel de soporte y de membrana. Su estructura es generalmente asimétrica, con la capa activa situada bien en el exterior o en el interior de la fibra. Poseen alta compacidad, con la relación superficie de intercambio/unidad de volumen más elevada (entre 1000 y 10000  $\text{m}^2$  por  $\text{m}^3$ ) y un volumen muerto reducido. El consumo energético es bajo, ya que el régimen de circulación es laminar. La sensibilidad al colmatado es elevada, debido al reducido diámetro de las fibras, por lo que es necesario realizar pretratamientos relativamente exhaustivos y se encuentra dificultad para el tratamiento de productos viscosos. No obstante, existe la posibilidad de limpieza en contracorriente.



**Figura 3.14.** Configuración en módulos de fibra hueca.

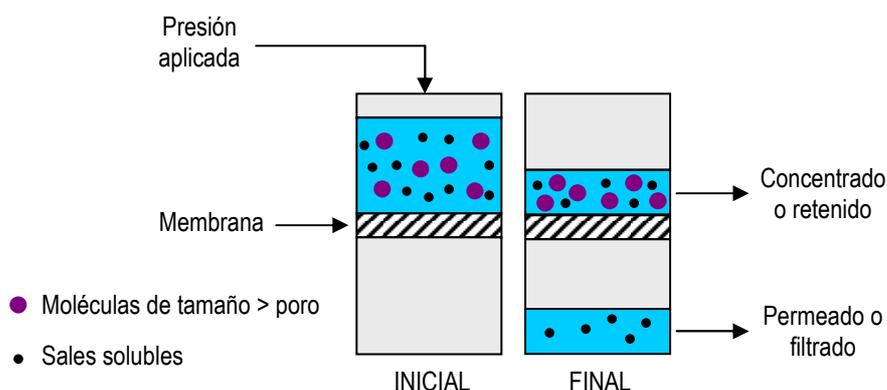
**Modos de operación.**

Los modos de operación que existen en la separación de componentes por membranas son básicamente dos: concentración y diafiltración (continua o discontinua) (Schwartz, 2003).

- *Concentración.*

En el modo de operación por concentración, la solución a filtrar es bombeada al módulo de membrana de forma continua, lo que se traduce en una reducción de volumen de la fracción que no es capaz de atravesar la membrana, definiéndose el factor de concentración (FC) como el número de veces que la corriente de alimentación reduce su volumen desde el volumen inicial (Millipore, Technical Brief, 2003).

La figura 3.15 muestra un ejemplo de filtración convencional (aunque el mismo principio se aplica en los procesos de filtración tangencial) por concentración con un FC = 2 de una muestra compuesta por agua, moléculas de gran tamaño y sales solubles. Se observa que las moléculas de tamaño superior al corte de la membrana quedan retenidas en la mitad del volumen original (de ahí el nombre de concentración) junto con la mitad de las sales solubles. Por su parte, el filtrado contiene la otra mitad de las sales solubles, pero ninguna de las moléculas de mayor tamaño. Por tanto, las moléculas grandes son concentradas por eliminación de agua y sales. La relación sales solubles/volumen en el concentrado permanece constante, por lo que la fuerza iónica de dicha solución también se mantiene relativamente constante.



**Figura 3.15.** Proceso de filtración por concentración 2X.

No obstante, la posibilidad de concentrar está limitada por las condiciones fluidodinámicas del proceso, ya que al concentrar, la viscosidad del producto incrementa, lo que se traduce en un descenso del flujo a través de la membrana.

- *Diafiltración.*

El modo de operación por diafiltración es esencialmente un proceso de dilución que se realiza junto con un proceso de concentración, en el que agua, o cualquier otro solvente, es adicionado mientras se va retirando el filtrado. Se utiliza ampliamente en procesos de filtración para eliminación de compuestos cuya retención es nula o próxima a cero, por ejemplo sales solubles (reducción de la fuerza iónica), ya que presenta ventajas frente a los métodos tradicionales de diálisis y filtración en gel, tales como un menor tiempo de proceso, menor volumen de agua requerido, la muestra podría ser posteriormente concentrada en el mismo dispositivo, minimizando el riesgo de contaminación o pérdida de muestra, etc (Schwartz, 2003).

Se define el volumen de diafiltración o diavolumen ( $V_D$ ) como el volumen de retenido cuando comienza el proceso de diafiltración (Millipore, Technical Brief, 2003), y tasa de diafiltración ( $T_D$ ) al número de diavolumenes de solución añadidos.

Existen varias formas de realizar la diafiltración, pero aunque el fin podría ser el mismo, el tiempo de operación y el volumen de solvente requerido para completar el proceso puede variar considerablemente de una a otra. Son las siguientes:

- a. *Diafiltración continua.*

La técnica de la diafiltración continua (también denominada como diafiltración a volumen constante) conlleva la adición de agua o un tampón a la misma velocidad que se genera la corriente de filtrado, con lo que el volumen de retenido permanece constante.

- b. *Diafiltración discontinua.*

La diafiltración discontinua se puede realizar de dos formas diferentes, mediante dilución secuencial o por reducción de volumen:

- Dilución secuencial: implica en primer lugar diluir la muestra hasta un predeterminado volumen, con agua o el tampón deseado, y posteriormente concentrar la muestra por ultrafiltración hasta el volumen original. Dicho proceso se repite el número de veces necesario hasta que el porcentaje deseado de las sales, solventes o moléculas de bajo peso molecular es filtrado a través de la membrana.
- Reducción de volumen: consiste en el proceso inverso a la diafiltración discontinua por dilución secuencial. En ella, la muestra es previamente concentrada hasta un volumen predeterminado y a continuación es diluida hasta su volumen original por adición de agua o cualquier otro solvente. Al igual que la anterior, este ciclo se repite hasta conseguir el porcentaje de separación requerido.

### 3.2.2. SEPARACIÓN POR MEMBRANAS: ESTUDIOS REALIZADOS.

Las investigaciones realizadas en el campo de la separación de biomoléculas minoritarias por tecnología de membranas se pueden agrupar en dos líneas fundamentales:

- Aquellos autores que se han centrado en la optimización de la separación basándose en los efectos estéricos y en el modo de operación del proceso, que son las denominadas técnicas convencionales de filtración tangencial (TFF).
- Aquellos grupos de investigación que consideran otros factores además de los estéricos en los procesos de separación de biomoléculas por membranas, como los factores de exclusión iónica, pH y fuerza iónica, modificando por tanto la carga y el radio iónico, conocido como proceso de filtración tangencial de alta resolución, HPTFF (Nyström, 1998; Zydney, 1998).

Los procesos de TFF tienen una aplicación limitada a separaciones de solutos cuyo tamaño difiere entre sí un mínimo de 10 veces (van Reis *et al*, 1997). Como razones para dicha limitación se han citado frecuentemente la amplia distribución de tamaños de poro (Mochizuki y Zydney, 1993), el fouling de la membrana (Meireles *et al*, 1991) y los fenómenos de polarización por concentración (Nakatsuka y Michaels, 1992). No obstante, a pesar de sus limitaciones, son muchos los trabajos de investigación en los que la separación de proteínas en soluciones modelo se ha llevado a cabo mediante TFF (Nakao *et al*, 1988; Lentsch *et al*, 1993; Balakrishnan y Agarwal, 1996; Millesime *et al*, 1996; Sannier *et al*, 1996).

Por otra parte, a escala comercial, el uso de la TFF en la industria biotecnológica se ha visto restringido a separaciones de mezclas célula-proteína (Arathoon *et al*, US Patent #5.053.334, 1991), virus-proteína (DiLeo *et al*, 1992) y proteína-tampón (Kurnik *et al*, 1995). A continuación se detallan cronológicamente los estudios más revelantes realizados en la última década.

Surówka y Celej (1996) estudiaron el fraccionamiento y la retención de algunos componentes de leche de vaca desnatada (materia seca, proteína, plomo, cobre y zinc) durante procesos sucesivos de ultrafiltración y diafiltración discontinua a través de 3 membranas sucesivas de fibra hueca con peso molecular de corte decreciente (100, 30 y 10 KDa). El permeado procedente de la primera etapa de ultrafiltración de tamaño de poro 100 KDa constituyó el alimento para la siguiente etapa de 30 KDa, cuyo permeado alimentó a la última etapa de tamaño de corte 10 KDa. Los retenidos procedentes de cada etapa de ultrafiltración se sometieron a diafiltración discontinua. La mayor retención se observó para la primera membrana, 49.0 y 96.9 % para materia seca y proteína respectivamente, y 40.3, 40.7 y 92.4 % para plomo, cobre y zinc, respectivamente. Esto se debió a la impermeabilidad de dicha membrana a la caseína y a la afinidad de dicha proteína por los metales analizados, especialmente zinc. Algunas de las sustancias proteicas que atravesaron esta primera membrana fueron retenidas por las membranas de 30 y 10 KDa, lo que sugiere

que no todas las proteínas del suero están asociadas, permaneciendo por tanto en forma de monómeros o agregados de peso molecular inferior a 100 KDa. Estas proteínas están parcialmente unidas a zinc, pero muestran una menor afinidad a cobre e hierro, ya que el 34, 78 y 77 % respectivamente del zinc, cobre y plomo contenido en el permeado tras la retención de la caseína no fueron retenidos por las membranas de 30 y 10 KDa, y fueron transmitidas al último permeado.

Punidades y Rizvi (1998) separaron leche parcialmente desnatada en una fracción rica en caseína y otra en proteínas séricas utilizando membranas cerámicas de tamaño de poro de 0.05 y 0.2  $\mu\text{m}$ . De entre los tamaños de corte ensayados, la membrana de 0.05  $\mu\text{m}$  tuvo un mejor comportamiento, pues retuvo todas las caseínas y sólo permitió el paso a su través de  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina y componentes de bajo peso molecular. El flujo de permeado se vio afectado principalmente por la velocidad de flujo, mientras que la presión transmembrana tuvo poco efecto. Las condiciones de operación óptimas fueron 5.4  $\text{ms}^{-1}$  y 138 KPa a 50°C. El permeado poseía una excelente capacidad espumante y un contenido en proteína de 0.31 %.

Vellenga y Trägårdh (1998) estudiaron la retención en procesos de nanofiltración de soluciones de sales, azúcares y mezclas de azúcares y sales en distintas proporciones. Observaron que: 1. La retención de las sales dependía de la concentración de la mismas; 2. La retención de los azúcares no era dependiente de su concentración ni de la velocidad de flujo para concentraciones hasta 90 g/L y número de Reynolds comprendido entre 2200 y 6600; 3. Cuando azúcares y sales estaban presentes, la retención de las sales dependía tanto de la concentración de sales como de azúcares. Así, observaron que un incremento en la concentración de azúcar conllevaba un descenso en la retención de sales.

Gésan-Guiziou *et al* (1999) obtuvieron dos fracciones, una rica en  $\alpha$ -lactoalbúmina (52-83 %) y otra en  $\beta$ -lactoglobulina (85-94 %), procedente de suero lácteo por un proceso secuencial que incluye las siguientes etapas: clarificación-desnatado del concentrado de proteínas del suero, precipitación de  $\alpha$ -lactoalbúmina, separación de  $\beta$ -lactoglobulina soluble por diafiltración o microfiltración (membranas de 0.2 micras de tamaño de corte en ambos casos), lavado del precipitado, solubilización del precipitado, concentración y purificación de  $\alpha$ -lactoalbúmina.

Muller *et al* (1999) estudiaron tres modos de operación para la purificación de  $\alpha$ -lactoalbúmina de suero lácteo ácido: diafiltración continua, concentración discontinua y concentración continua. Utilizaron para ello membranas cerámicas de 1.20 m de longitud, 3.6 mm de diámetro hidráulico interno y 0.045  $\text{m}^2$  de superficie de filtración (TAMI Industries, Nyons, Francia). Comprobaron que el rendimiento dependía de la pureza de la alimentación inicial, de la transmisión (membrana y condiciones de operación) y del modo de operación. Concluyeron que una concentración continua hasta una reducción de volumen entre 11 y 15 o una combinación de concentración y diafiltración continua conducía a un mayor rendimiento y pureza de  $\alpha$ -lactoalbúmina en el permeado final.

Goulas *et al* (2002) nanofiltraron diferentes soluciones modelo de azúcares y una mezcla comercial de galacto-oligosacáridos en un dispositivo de filtración tangencial. Observaron que los factores de rechazo de los azúcares individuales aumentaban con la presión debido a un incremento del flujo de solvente y a una compactación de la membrana, siendo mayor dicho efecto para las moléculas de bajo peso molecular. También vieron que un aumento de la concentración total de azúcares en la alimentación conducía a un descenso en la retención de los mismos y que un aumento de la temperatura de filtración conllevaba un descenso en la retención de los azúcares de bajo peso molecular. Ensayaron diferentes membranas y modos de operación, concluyendo que los mejores rendimientos se obtenían con diafiltración continua a través de las membranas NF-CA-50 de InterSep (a 25 °C) y DS-5-DL de Desal (a 60 °C): 14-18 % para monosacáridos, 59-89 % para disacáridos y 81-98 % para trisacáridos, respectivamente.

Por otra parte, la HPTFF, al estar basada en las diferencias de tamaño y carga de las biomoléculas a separar, permite separar moléculas de igual peso molecular o incluso retener biomoléculas de tamaño inferior a otras que atraviesan la membrana (Christy *et al*, 2002). Por tanto, la HPTFF, a diferencia de la TFF, es un método de purificación bidimensional. A continuación se describen cronológicamente los trabajos de investigación publicados más importantes en éste campo.

Aimar *et al* (1986) estudiaron la adsorción de albúmina sérica bovina en membranas IRIS 3038 utilizando proteínas marcadas con yodo-125, y ensayaron diferentes valores de pH y concentración sin aplicar presión. Concluyeron que simplemente el contacto de la membrana con una solución diluida de albúmina sérica bovina conducía a drásticos cambios de las propiedades de filtración, lo que habría que tener en cuenta en el proceso de ultrafiltración.

Mehra y Donnelly (1993) filtraron por una membrana de celulosa de 100 KDa modelo YM100 de Amicon Ltd (Millipore Corporation, Massachusetts, EEUU) diferentes soluciones de proteínas séricas, encontrando que un aumento de pH en el rango comprendido entre 5 y 10 incrementaba la transmisión de cada proteína, al contrario que la presencia de calcio. También observaron que el fraccionamiento de las proteínas séricas de bajo peso molecular ( $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina) de las de mayor peso molecular (albúmina sérica bovina, lactoferrina e inmunoglobulinas) se conseguía mejor a pH 8.0.

Saksena y Zydney (1994) separaron albúmina de inmunoglobulinas (IgG) mediante membranas de polietersulfona de 100 y 300 KDa, demostrando que la efectividad de la filtración selectiva de proteínas se veía fuertemente alterada mediante un control apropiado de las interacciones electrostáticas a través de cambios en el pH y/o fuerza iónica. Así, modificaciones de pH y fuerza iónica de 7.0 y 0.15 M respectivamente (condiciones fisiológicas) a 4.8 y 0.0015 M, aumentaba la selectividad de 2.0 a 50 a través de la membrana de 100 KDa. Por otra parte, se produjo un mayor paso de IgG a través de la membrana de 300 KDa a pH 7.4 y una fuerza iónica de 0.0015 M NaCl.

Pujar y Zydney (1994) demostraron como la transmisión de la proteína BSA a través de una membrana de polietersulfona de 100 KDa disminuía en más de dos unidades de magnitud cuando la fuerza iónica se reducía de 0.15 a 0.0015 M. Concluyeron que las características de rechazo de éstas membranas semipermeables podían ser drásticamente alteradas por cambios en la solución que la rodea.

Palecek y Zydney (1994) estudiaron la microfiltración por membranas de polietersulfona de 0.16  $\mu\text{m}$  de albúmina, lisozima, ribonucleasa A, hemoglobina e inmunoglobulinas, obteniendo en estado estacionario que la permeabilidad de cada proteína era máxima en su punto isoeléctrico y disminuía conforme se aumentaba la concentración de sal a pH por encima y por debajo de su punto isoeléctrico.

Tsuru *et al* (1994) ensayaron varias membranas de nanofiltración fabricadas con diferentes materiales (poliamida y poliéter sulfonado) con objeto de separar péptidos y aminoácidos basándose en la diferencia de carga entre ellos y su interacción con la membrana. Observaron que las membranas de nanofiltración con un tamaño de corte por debajo de 300 Da no eran capaces de separar la fracción de aminoácidos; en cambio, al ensayar membranas de tamaño de corte comprendido entre 2000 y 3000 Da consiguieron que los aminoácidos cargados y los péptidos quedasen retenidos mientras que los aminoácidos neutros atravesaban la misma. Consiguieron asimismo separar péptidos de diferente punto isoeléctrico por modificación del pH.

Bouhallab y Henry (1995) estudiaron la transmisión de  $\beta$ -CN (193-209), un péptido hidrofóbico derivado de la  $\beta$ -caseína bovina, durante la ultrafiltración a través de membranas M5 Carbosep de 10 KDa, M2 Carbosep de 15 KDa y Kerasep de 15 KDa en función del pH, fuerza iónica y en presencia de mezclas de péptidos pequeños utilizados como competidores de adsorción. Se obtuvieron transmisiones de 6, 53 y 66% mientras que el porcentaje de péptidos adsorbidos fue de 41, 89 y 0% con las membranas M5, M2 y Kerasep, respectivamente.

Raymond *et al* (1995) demostraron el potencial de los sistemas de membranas para el fraccionamiento de proteínas plasmáticas de similar peso molecular, trabajando con soluciones modelo de hemoglobina (67000 Da) y albúmina (69000 Da) a través de membranas de polietersulfona de 100 KDa de tamaño de corte. Observaron que el factor de separación del sistema hemoglobina-albúmina podía ser incrementado a más de 70 simplemente reduciendo la concentración de sales y ajustando el pH alrededor de 7 (próximo al punto isoeléctrico de la hemoglobina). Realizaron experimentos de diafiltración en los que vieron que la recuperación de la hemoglobina fue superior al 70% tras 3 ciclos de diafiltración, con un factor de purificación de la hemoglobina próximo a 100 bajo dichas condiciones.

Nyström *et al* (1998) realizaron gran cantidad de experimentos con diferentes membranas para mostrar como las propiedades fisicoquímicas de las membranas y las proteínas influyen en el proceso de fraccionamiento. Utilizaron para ello proteínas globulares de peso molecular comprendido entre 15000 y 80000  $\text{g mol}^{-1}$ , cuyo punto isoeléctrico variaba entre 4.6 y 11 (BSA, ovoalbúmina, lisozima, lactoferrina, mioglobina y conalbúmina). Observaron, tal como se

esperaba, que trabajando en las condiciones óptimas de pH y fuerza iónica, se podían conseguir muy buenos valores de selectividad, incluso para proteínas de similar peso molecular.

Pujar y Zydney (1998) realizaron estudios de cromatografía de exclusión por tamaño y ultrafiltración en paralelo utilizando dextrano neutro y proteínas cargadas, centrados en las interacciones electrostáticas entre ellos. Observaron un comportamiento similar así como una similitud en las interacciones electrostáticas entre compuestos y en la separación conseguida entre ambas técnicas de separación.

Ghosh y Cui (1998) estudiaron el efecto de la modificación de pH en el fraccionamiento de BSA y lisozima por ultrafiltración a través de una membrana de polisulfona de 50 KDa de tamaño de corte. Encontraron que la selectividad en mezclas diluidas de BSA y lisozima dependía en gran medida del pH y varía desde 3,3 a pH 5,2 hasta 220,0 a pH 8,8. Sin embargo, vieron que a medida que aumentaba la concentración en la alimentación disminuía dramáticamente la transmisión de lisozima a través de la membrana. Por otra parte, encontraron un aumento de la transmisión de lisozima hasta el 63% pretratando la superficie de la membrana con mioglobina, incluso con elevadas concentraciones en la alimentación.

Posteriormente, Ghosh *et al* (1998) estudiaron la influencia de la inyección de aire presurizado (proceso conocido como gas sparging) durante el fraccionamiento de dichas proteínas por ultrafiltración a través de una membrana de polisulfona de tamaño de poro 100 KDa. Observaron un incremento significativo en la selectividad (más de 18 veces) así como una disminución en la transmisión de ambas proteínas, mayor en el caso de la BSA, mejorando por tanto el fraccionamiento de ambas proteínas. Dicho incremento en la selectividad se consiguió con un bajo flujo de gas lo que impidió la formación de espuma y la desnaturalización de las proteínas fraccionadas.

Martin-Orue *et al* (1998) nanofiltraron varios péptidos y aminoácidos cargados en soluciones de complejidad creciente a través de una membrana inorgánica. Comprobaron que los efectos debidos a la carga, repulsión de iones y atracción de contraiones, prevalecieron sobre el comportamiento del soluto más que los efectos debidos al tamaño en cualquier solución estudiada. La transmisión de cualquiera de los solutos, y por tanto la selectividad de la separación se vio profundamente afectada por el medio que rodea a dicho soluto, principalmente debido a las interacciones competitivas soluto/soluto y soluto/membrana.

Pouliot *et al* (1999) estudiaron la posibilidad de separar los péptidos presentes en un hidrolizado de proteínas de suero con tripsina por ultrafiltración y nanofiltración. Utilizaron una membrana de tamaño de corte de 10 KDa para separar la enzima y el producto no hidrolizado de la mezcla de reacción. Evaluaron 5 modelos de membranas diferentes de Osmonics (Minnetonka, MN, Estados Unidos) y vieron que el modelo SG13 de tamaño molecular de corte comprendido entre 1000 y 5000 g mol<sup>-1</sup> poseía las mejores propiedades de separación y mayores flujos de permeado. Observaron que un incremento de pH de 5 a 9 en dicha membrana no solo aumentaba el flujo de permeado y los valores de transmisión de nitrógeno, sino que también disminuía el índice de fouling. Sin embargo, al adicionar NaCl

incrementaba la permeabilidad pero conllevaba un incremento del fouling. Por último, un estudio detallado de la separación proteica obtenida mostró que los péptidos cargados negativamente se encontraban en menor proporción en el permeado, mientras que la tendencia opuesta se observó con los péptidos neutros y aquellos cargados positivamente.

Van Reis *et al* (1999) estudiaron el efecto de la carga de la membrana, en combinación con el pH del tampón, en la separación de proteínas por HPTFF, obteniendo mejoras significativas tanto en la selectividad como en el rendimiento y factores de purificación de hasta 990 veces. Dichos resultados fueron obtenidos en sistemas a escala similares a los utilizados actualmente en la industria para ultrafiltración de productos farmacéuticos humanos producidos por métodos de DNA recombinante.

Howell *et al* (1999) estudiaron la transmisión de la albúmina bovina a través de membranas de tamaño de corte de 50 KDa, 100 KDa y 0,2  $\mu\text{m}$  en condiciones controladas de flujo y bajas presiones transmembrana. La membrana de 50 KDa resultó en bajos valores de transmisión, aunque aumentó gradualmente con el flujo, observándose un agudo incremento cuando el flujo alcanzó los 50  $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ . De la misma manera, la membrana de 100 KDa tuvo un comportamiento similar. En cambio, la membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  no mostró este fenómeno de flujo crítico, obteniendo aproximadamente un 100 % de transmisión hasta flujos de 200  $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$ . Observaron también que la transmisión en el punto isoeléctrico de la albúmina bovina (pH 4.9) fue mucho mayor que a pH 3.5 u 8 bajo las mismas condiciones de operación.

Sannier *et al* (2000) purificaron  $\beta$ -lactoglobulina caprina procedente de suero mediante un proceso de ultrafiltración acoplado a un reactor enzimático de membrana. La base de dicho proceso de purificación fue la hidrólisis enzimática de las proteínas contaminantes ( $\alpha$ -lactoalbúmina y trazas de albúmina sérica) con pepsina a 40 °C y pH 2, condiciones bajo las cuales la  $\beta$ -lactoglobulina es resistente a la digestión péptica. Simultáneamente a dicho proceso, la  $\beta$ -lactoglobulina fue separada de los péptidos por ultrafiltración. Ensayaron 3 membranas de diferente tamaño de corte, 10, 30 y 50 KDa; observaron que la segunda ofrecía un mayor porcentaje de recuperación y pureza de  $\beta$ -lactoglobulina en el producto final, 74 y 84 % respectivamente, así como una concentración 6.6 veces superior en comparación con el suero inicial.

Ghosh y Cui (2000 a) estudiaron la separación de lisozima de la clara de huevo por ultrafiltración a través de membranas de polisulfona de 25 y 50 KDa. Observaron que valores elevados de pH reportaban mayores valores de flujo de permeado y transmisión de lisozima con ambas membranas, aunque la primera condujo a una mayor pureza. También observaron que el flujo de permeado, la productividad y la pureza obtenidos con la membrana de 50 kDa se veían mejorados con el aumento de la presión transmembrana. También investigaron la posibilidad de utilizar un proceso secuencial en dos etapas de ambas membranas, 50 y 25 KDa, obteniendo una pureza del 99.2% bajo determinadas condiciones de operación.

Posteriormente, Ghosh y Cui (2000 b) estudiaron la influencia del pretratamiento de la membrana con mioglobina sobre la separación citada anteriormente. Encontraron que la transmisión de lisozima fue aproximadamente un 26 % superior con la membrana pretratada, y que la transmisión de otras proteínas presentes como ovoalbúmina o conalbúmina era inversamente dependiente de la presión transmembrana. De esta manera, con una presión transmembrana de 20 KPa el porcentaje de pureza de lisozima fue del 18 %, llegando al 96 % a 120 KPa.

Sarney *et al* (2000) diseñaron un proceso para el aislamiento de la fracción de oligosacáridos biológicamente activos de leche que combina tratamiento enzimático previo de la leche desnatada con  $\beta$ -galactosidasa, y posterior ultrafiltración y nanofiltración. Demostraron que la hidrólisis enzimática de la lactosa a pH 5.2 con  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23) procedente de *Aspergillus oryzae* hidrolizó prácticamente el 100 % de la lactosa en 4-5 horas, sin observar ningún cambio aparente en la fracción de oligosacáridos. La enzima fue retirada del hidrolizado por ultrafiltración a través de una membrana de tamaño de poro 10 KDa de Amicon (Beverly, MA, EEUU). Posteriormente, ensayaron varias membranas de nanofiltración de diferentes tamaños de corte y materiales, observando un mejor comportamiento con la membrana modelo NF-CA-50 de acetato de celulosa de InterSep (Wokingham, UK), con la que consiguieron obtener en 4 ciclos más del 97 % de la fracción inicial de oligosacáridos. Por último, comprobaron que el perfil de oligosacáridos obtenido por este método era idéntico al obtenido por cromatografía de permeación en gel convencional.

Ulber *et al* (2001) investigaron la posibilidad de purificar lactoferrina bovina procedente de suero dulce mediante un proceso basado en dos etapas: microfiltración tangencial y aislamiento con membranas de intercambio catiónico. Comprobaron la idoneidad de las membranas adsorbentes para el objetivo perseguido frente a la cromatografía de intercambio iónico dados los mayores flujos obtenidos y por tanto ciclos de trabajo más cortos, así como por su fácil manejo y escalado.

Lapointe *et al* (2003) investigaron el fraccionamiento de un hidrolizado de  $\beta$ -lactoglobulina por nanofiltración. La mezcla de péptidos se preparó por hidrólisis con tripsina de  $\beta$ -lactoglobulina comercial seguida de un proceso de ultrafiltración para retirar la enzima. Para el fraccionamiento utilizaron una membrana de nanofiltración modelo SG13 de Osmonics con un peso molecular de corte de 2500 g mol<sup>-1</sup>. Investigaron la influencia de la presión de trabajo (0.2 y 0.5 MPa), la velocidad de recirculación (0.17 y 0.29 m s<sup>-1</sup>) y el tiempo de recirculación (30 y 120 minutos) sobre la transmisión de los diferentes péptidos individuales. En particular, observaron que la transmisión de los péptidos  $\beta$ -Lg 102-105 y  $\beta$ -Lg 142-148 se veía fuertemente aumentada incrementando el tiempo de recirculación a 120 minutos y trabajando a baja velocidad de recirculación, a cualquiera de las presiones de trabajo ensayadas. En general, concluyeron que la selectividad de la membrana de nanofiltración estaba influenciada por las condiciones hidrodinámicas y el tiempo de recirculación a través de una posible interacción péptido-péptido.

## **4. OBJETIVOS.**

El trabajo que se describe en la presente Memoria forma parte de la labor investigadora que el Grupo de Biorreactores del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada y el Departamento de Biomedicina de Puleva Biotech S.A. están llevando a cabo para el desarrollo de técnicas de producción y separación de compuestos con actividad biológica.

Una de sus líneas está centrada en la obtención de oligosacáridos por ultrafiltración. Estos carbohidratos son considerados nutrientes potencialmente esenciales en periodos de desarrollo y en determinadas enfermedades, aunque actualmente no se incluyen en la formulación de alimentos infantiles por su dificultad de síntesis o aislamiento de fuentes naturales a gran escala.

Por ello, los objetivos planificados para ésta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- Búsqueda de una fuente de oligosacáridos similares a los de leche materna para nutrición infantil en la leche de las principales especies animales productoras: vaca, cabra y oveja.
- Evaluación de su actividad funcional a nivel gastrointestinal mediante el estudio de la influencia de los oligosacáridos sobre la diferenciación (PCNA, actividad fosfatasa alcalina, leucín-aminopeptidasa y disacaridasas) y la expresión de mucinas (MUC2, MUC4 y MUC5B) y “trefoil-factors” en células intestinales en cultivo (Caco-2 y HT29/MTX).
- Evaluación de la actividad funcional a nivel inmunológico mediante la determinación de la influencia de los oligosacáridos en la adhesión de monocitos sobre células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) bajo condiciones de flujo.
- Obtención de la fracción de oligosacáridos por tecnología de membranas. El objetivo perseguido era poner a punto el proceso de ultrafiltración que permitiera la separación o aislamiento de la fracción proteica del 90-95% de los oligosacáridos sin alterar sus propiedades biológicas ni su biodisponibilidad.
- Modelización dinámica del proceso de ultrafiltración.
- Optimización de la etapa de separación para minimizar el área de filtración lo que determinaría el modo de operación más idóneo para llevar este proceso a cabo a escala industrial.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS.**

## **5.1. SELECCIÓN DE LA FUENTE DE OLIGOSACÁRIDOS.**

### **5.1.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS.**

La identificación y cuantificación de la fracción de oligosacáridos en las muestras se realizó usando el método descrito por Kunz *et al* (1996, 1999b). En dicho método se aplican las siguientes técnicas analíticas: cromatografía líquida de intercambio aniónico a alto pH con detección amperométrica pulsante (HPAEC-PAD) para la cuantificación de oligosacáridos y cromatografía de capa fina de alta resolución (HP-TLC) junto con espectrometría de masas de bombardeo atómico rápido (FAB-MS) para la caracterización de los mismos.

#### **5.1.1.1. Sustrato.**

Para el análisis comparativo de la fracción de oligosacáridos de leche procedente de diferentes especies animales, se utilizó leche materna que fue amablemente donada por mujeres en estado de lactación a través del Hospital Clínico de la Universidad de Granada, leche de vaca y de oveja suministrados por las empresas Puleva Food S.A. y Puleva Biotech S.A. respectivamente, así como leche de cabra de la raza Murciano-Granadina suministrada por la Granja Experimental Ganadera de la Diputación Provincial de Granada (Albolote, Granada, España).

Previamente a la identificación, la fracción de oligosacáridos fue aislada y purificada del resto de componentes por delipidación, precipitación proteica y cromatografía de permeación en gel. La grasa de las muestras se eliminó por centrifugación a 6500 xg y 4 °C durante 25 minutos, mientras que la fracción proteica fue precipitada con etanol al 66 %. El etanol se eliminó posteriormente en trampa de vapor refrigerada Speed Vac® modelo SPD121P (Savant Instruments, NY, EEUU) a vacío. La solución resultante conteniendo lactosa, oligosacáridos y sales minerales se denominó solución OS-1.

#### **5.1.1.2. Cromatografía de capa fina de alta resolución (HP-TLC).**

Una alícuota de 5 µL de la solución OS-1 se analizó por cromatografía de permeación en gel aplicando una solución butanol:ácido acético:agua (2.5:1:1). Posteriormente, las placas se trataron con una solución conteniendo orcinol 35 mM en ácido sulfúrico al 4 % (v/v). Por último, las placas se calentaron a 100 °C durante 5 minutos haciendo posible la detección cualitativa por medio de bandas de los oligosacáridos presentes en la muestra (Kunz *et al*, 1999b).

#### **5.1.1.3. Purificación por cromatografía de permeación en gel.**

La solución OS-1 se diluyó hasta 1 mL con agua milli-Q y se inyectó en una columna Sephadex G-25 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) conectada a un sistema de FPLC (Akta Prime, Amersham Biosciences,

Uppsala, Suecia) y se eluyó con agua calidad milli-Q a un flujo de 1.0 mL/min. Las fracciones libres de sales y lactosa se recogieron, se mezclaron, se secaron por liofilización, se resuspendieron en 500  $\mu$ L de agua milli-Q y se congelaron a  $-20$  °C para el posterior análisis por HPAEC-PAD y FAB-MS. Esta solución se denominó solución OS-2 (Kunz *et al*, 1996).

#### **5.1.1.4. Cromatografía líquida de intercambio aniónico a alto pH con detección amperométrica pulsante (HPAEC-PAD).**

La cuantificación de los oligosacáridos se realizó por cromatografía líquida de intercambio aniónico a alto pH, utilizando una columna CarboPac™ PA-1 conectada a un cromatógrafo Dionex DX-600 (Sunnyvale, CA, Estados Unidos) equipado con detector amperométrico pulsante.

Se utilizaron patrones puros de oligosacáridos (Oxford Glycosystems, Cambridge, Gran Bretaña) para identificar los picos mayoritarios de los cromatogramas. Se inyectaron 20  $\mu$ L de la solución OS-2 descrita anteriormente y se aplicó un flujo de 1.0 mL/min, consiguiendo separar todas las estructuras ácidas y neutras a temperatura ambiente. Los eluyentes fueron los siguientes: eluyente A, NaOH 100 mM; eluyente B, NaOH 100 mM y acetato sódico 250 mM; el programa de elución comenzó con 3 mL de eluyente A, seguido por un gradiente lineal de 30 minutos (0-100 %) de eluyente B, y finalmente 4 mL de eluyente B. Tras el análisis se aplicaron 3 mL de eluyente A para re-equilibrar la columna (Kunz *et al*, 1999b).

#### **5.1.1.5. Espectrometría de masas de bombardeo atómico rápido (FAB-MS).**

Una alícuota de 100  $\mu$ L de la solución OS-2 descrita anteriormente se liofilizó y se reconstituyó con 500  $\mu$ L de dimetil-sulfóxido, 500  $\mu$ L de yodometano y 100 mg de hidróxido sódico. La solución se mantuvo en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, se añadieron 3 mL de cloroformo y se centrifugó a 1026  $xg$  durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante acuoso y se concentró con nitrógeno hasta un volumen final aproximado de 500  $\mu$ L. Ésta muestra se inyectó posteriormente en una columna de cromatografía de permeación en gel con Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) y se eluyó con una solución cloroformo:metanol (1:1) para purificar finalmente la fracción de oligosacáridos. Se inyectaron entonces 5  $\mu$ L de dicha solución en una placa de sílica y se analizaron por cromatografía de capa fina de alta resolución (HP-TLC). Por último, se rasparon las bandas de interés, se disolvieron con tioglicerol y se guardaron a  $-80$ °C en viales listos para el análisis (Pohlentz *et al*, 1992; Egge y Peter-Katalinic, 2002; Rudloff *et al*, 2002).

La espectrometría de masas se realizó con un espectrómetro VG Analytical ZAB-HF de geometría reversa en el modo de ionización FAB que dispone de atomizador Ion-Tech (VG, Manchester, Gran Bretaña). Se aplicó xenón para el bombardeo atómico y un voltaje de aceleración de 7 KV. El espectro se guardó y se analizó posteriormente en un

equipo informático SAM II/68 K (KWS, Ettlingen, Alemania) utilizando para ello el programa DP10 de AMD (Harpstedt, Alemania).

### 5.1.2. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES.

Para la realización de las distintas pruebas se cultivaron 3 líneas celulares diferentes, que son las siguientes:

1. Células Caco-2 (ECACC nº 85011430).
2. Células HT-29/MTX, cedidas por la Dra. Thécla Lesuffleur (INSERM U550, Centre de Recherches Biomédicales des Cordeliers, París, Francia).
3. Células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC). Los cordones umbilicales fueron cedidos por la unidad de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico de la Universidad de Granada (España).

#### 5.1.2.1. Determinación del efecto sobre la diferenciación de enterocitos y células calciformes.

El objetivo de esta experiencia fue determinar el efecto de los oligosacáridos presentes en leche de cabra sobre la diferenciación (PCNA, actividad fosfatasa alcalina, leucin-aminopeptidasa y disacaridasas) y la expresión de mucinas (MUC2, MUC4 y MUC5B) y "trefoil factors" en células intestinales en cultivo (Caco-2 y HT29-MTX).

#### **Cultivo de las líneas celulares.**

Las células Caco-2 tras alcanzar confluencia se diferencian en cultivo hasta adquirir un fenotipo muy parecido al de enterocitos, mientras que las células HT-29/MTX se diferencian en cultivo hasta células calciformes productoras de mucus.

Las líneas celulares utilizadas (CaCo-2 y HT-29/MTX) se cultivaron en medio DMEM (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) suplementado con glucosa (25 mM), suero fetal bovino inactivado (10% v/v) y glutamina (2 mM). Además se adicionó anfotericina B (0.25 µg/mL) y penicilina G/estreptomicina (0.2 mg/mL).

Las células se cultivaron durante 7 días (hasta confluencia) en ausencia (Control) o presencia de oligosacáridos de leche de cabra purificados por cromatografía de permeación en gel Sephadex<sup>GM</sup> T-25 Fine (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) en una concentración de 5 mg/L (OC) o de un extracto rico en oligosacáridos procedente de leche de cabra obtenido por ultrafiltración (apartado 5.2) en una concentración de 5 mg de oligosacáridos equivalente/L (EC).

Se utilizó solución salina equilibrada de Hank's, HBSS, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) para lavar las células y una solución de tripsina/EDTA 25 mM para despegar las células antes de subdividir las.

### **Preparación de las muestras.**

Los cultivos celulares se homogeneizaron y se recogieron en tampón RIPA (apéndice 11.5) adicionado de inhibidores de proteasas (iodoacetamida, 1,10-fenantrolina, aprotinina, leupeptina y fluoruro de fenil metil sulfonilo o PMSF). Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos.

### **Determinación del contenido proteico.**

La concentración proteica de las diferentes muestras ensayadas en el estudio se determinó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA), descrito por Smith *et al* (1985), utilizando como estándar albúmina sérica bovina.

#### Reactivos utilizados:

Reactivo A: 10 g de ácido bicinonínico, 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.6 g de tartrato sódico, 4 g de NaOH y 9.5 g de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  c.s.p. 1L (pH 11.25).

Reactivo B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4% (p/v) en agua.

Solución estándar de albúmina sérica bovina, 1 mg/L (Roche, Basel, Suiza).

El reactivo de coloración se obtuvo mezclando reactivo A y reactivo B en una proporción de 50:1 (v/v). Se preparó la reacción adicionando a cada pocillo 180  $\mu\text{L}$  del reactivo de coloración además de las muestras. En los casos en que fue necesario se completó el volumen en el pocillo hasta 200  $\mu\text{L}$  con tampón RIPA. A continuación, se incubaron las placas a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido el período de incubación, se determinó la absorbancia de las muestras a 540 nm en un lector de placas.

Los resultados obtenidos se extrapolaron en una curva patrón realizada con albúmina sérica bovina (1 mg/mL).

#### **5.1.2.1.1. Determinación de las actividades enzimáticas fosfatasa alcalina, leucín-aminopeptidasa y disacaridasas en células Caco-2.**

##### **Determinación de la actividad fosfatasa alcalina.**

La medida de esta actividad se fundamenta en la reacción catalizada por la fosfatasa alcalina utilizando como sustrato p-nitrofenil fosfato. El p-nitrofenol, producto de la reacción, presenta un máximo de absorción a 405 nm siendo la intensidad del color proporcional a la actividad enzimática (Goldstein *et al*, 1970).

Reactivos utilizados:

Tampón glicina: glicina 50mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM (pH: 10.5).

Solución sustrato: p-nitrofenilfosfato 5.5 mM en tampón glicina (extemporáneo).

NaOH 20 mM.

Se vertió 1 mL de solución de sustrato en un tubo de ensayo y se añadió 100 µL del homogenado celular diluido 1:2 en agua destilada, incubándose a 37°C durante 30 min. Tras la incubación, se añadieron 10 mL de NaOH 20 mM y se midió la absorbancia a 405 nm. Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron en unidades internacionales de fosfatasa alcalina por mg de proteína del homogenado.

***Determinación de la actividad leucín-aminopeptidasa.***

Las aminopeptidasas son exopeptidasas específicas que hidrolizan enlaces peptídicos en el extremo amino terminal de la molécula proteica. La actividad leucín-aminopeptidasa se determina mediante la hidrólisis del sustrato, L-leucín-p-nitroanilida, hasta L-leucina y p-nitroanilina, compuesto éste último que presenta un máximo de absorción a 405 nm siendo la intensidad del color proporcional a la actividad enzimática (Maroux *et al*, 1977).

Reactivos utilizados:

Tampón Tris 50 mM pH 7.2.

L-leucín-p-nitroanilida 1.2 mM en tampón Tris.

p-nitroanilina: 1 mM en tampón Tris.

En tubos de ensayo, se añadieron 1 mL de la dilución del homogenado celular y 2 mL de la solución del sustrato, midiendo inmediatamente la extinción a 405 nm y tras incubación durante 30 min a 37°C. La cuantificación de la actividad leucín-aminopeptidasa se realizó a partir de una recta de calibrado elaborada con diferentes concentraciones de p-nitroanilina, expresándose como µmoles de p-nitroanilina producidos/h por mg de proteína del homogenado celular.

***Determinación de las actividades disacaridasas.***

Las actividades disacaridasas determinadas fueron las siguientes: lactasa, maltasa y sacarasa. El método de determinación fue el desarrollado por Dahlqvist (1968), que consta de dos etapas: una primera, en la que se efectúa la hidrólisis de los disacáridos por las enzimas correspondientes, y una segunda, donde se determina la glucosa producida. En esta segunda etapa se utilizan glucosa oxidasa y peroxidasa y, al oxidarse la o-dianisidina reducida, se produce un compuesto que presenta su máximo de absorción a 450 nm.

Reactivos utilizados:

Tampón maleato sódico 0.1 M (pH 6).

Soluciones patrones de disacáridos: lactosa, maltosa y sacarosa (56 mM) en tampón maleato.

Tampón Tris 0.5 M (pH 7).

Solución de Tritón X-100 (20% (v/v) en etanol).

o-dianisidina (10 mg/mL en agua destilada).

Reactivo de glucosa: 2 mg de glucosa oxidasa y 0.5 mg de peroxidasa en 100 mL de tampón Tris y adición de 1 mL de la solución de o-dianisidina y 1 mL de la solución de Tritón-X (preparación extemporánea).

Solución estándar de glucosa 2mM.

A 100  $\mu$ L del homogenado celular diluido 1:2 en agua se le añadieron 100  $\mu$ L de la solución del disacárido correspondiente, incubándose la mezcla 1 hora a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 3 mL del reactivo de glucosa, incubándose nuevamente 1 hora a 37°C, tras lo cual se midió la absorción a 450 nm. Las actividades de las diferentes disacaridasas se expresaron en  $\mu$ moles de glucosa hidrolizados/min por mg de proteína del homogenado.

**5.1.2.1.2. Determinación del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).**

***Electroforesis unidimensional de proteínas.***

Reactivos utilizados:

Acrilamida 40% (p/v) / bisacrilamida 0.8% (p/v).

Tris HCl 1.5 M (pH 8.8).

Tris HCl 0.5 M (pH 6.8).

SDS al 10% (p/v).

Persulfato amónico al 10% (p/v).

TEMED.

Tampón de electroforesis: Tris-HCl 0.025 M (pH 8.3), glicina 0.192 M, SDS 0.1% (p/v).

Se cargaron 50  $\mu$ g de muestra por pocillo. La concentración de acrilamida/bisacrilamida del gel separador fue del 8 % o 15 % (v/v) en función de la muestra a determinar. Para el gel concentrador se utilizó una concentración del 4 % (v/v). Como referencia se puso un marcador de peso molecular en una de las calles. Los reactivos utilizados y las fórmulas de preparación para dos minigeles (Mini-Protean II, BioRad, CA, EEUU) se recogen en la tabla 5.1.

El desarrollo electroforético se llevó a cabo en tampón de electroforesis, y a un voltaje constante de 150 V.

**Tabla 5.1.** Concentraciones de los geles de poliacrilamida utilizados en el estudio.

	Gel separador 15 %	Gel separador 8 %	Gel concentrador 4 %
Acrilamida 40 % (p/v) / bis-acrilamida 0.8 % (p/v)	2.5 mL	2 mL	1 mL
Tris HCl 1.5 M (pH 8.8)	2.5 mL	2.5 mL	
Tris HCl 0.5 M (pH 6.8)			2.5 mL
Agua destilada	4.95 mL	5.35 mL	6.4 mL
SDS 10 % (p/v)	100 µL	100 µL	100 µL
Persulfato amónico al 10% (p/v)	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL

***Tinción de geles de electroforesis de proteínas.***

Reactivos utilizados:

Solución de tinción: ácido acético glacial al 5% (v/v), 0.025% (p/v) de Coomassie brilliant blue G y etanol al 50% (v/v).

Solución de lavado: ácido acético glacial al 10% (v/v) y etanol al 40% (v/v).

Una vez finalizada la electroforesis, los péptidos se visulizaron incubando los geles en 20 mL de la solución de tinción durante 3-4 horas, con agitación. El exceso de solución de tinción se eliminó incubando el gel en solución de lavado.

***Análisis de proteínas mediante Western blot.***

El ensayo de Western blot se emplea para detectar y cuantificar la cantidad de una proteína determinada presente en una muestra. Para ello, las proteínas son sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida adicionado de SDS (SDS PAGE) separándose en función de su tamaño, y posteriormente son transferidas a una membrana. La detección de las proteínas en la membrana o filtro se realiza gracias a la unión específica de un anticuerpo desarrollado frente a la proteína a estudiar.

***Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.***

Reactivos utilizados:

Tampón de transferencia: Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v).

Tras la electroforesis se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania), utilizando el sistema de transferencia Miniprotea System II (Bio Rad). La transferencia se llevó a cabo en tampón de transferencia durante 1 hora, utilizando una corriente de 150 V.

#### ***Hibridación y análisis de blots de proteínas.***

##### Reactivos utilizados:

TBS: Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) y NaCl 150 mM.

Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TBS.

TBS-Tween: TBS suplementado con Tween 20 al 0.1% (v/v).

Anticuerpo primario frente al Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Ref. 610665, BD transduction laboratories, KY, EEUU) diluido 1:5000.

Anticuerpo secundario: Anti mouse IgG-peroxidasa (Sigma) diluido 1:1000.

Kit de detección: Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Lifesciences, Boston, MA, EEUU).

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se procedió al bloqueo de la misma durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo. Tras este periodo, se adicionó el anticuerpo primario en la concentración adecuada y se incubó a 4°C durante 18 horas.

A continuación, se lavó la membrana 3 veces en TBS-0.1% Tween durante 15 minutos cada vez y se incubó con el anticuerpo secundario diluido 1:1000 durante 2 horas a temperatura ambiente.

Por último, se llevó a cabo la detección utilizando el kit de detección basado en una reacción de quimioluminiscencia. La membrana se expuso utilizando películas fotográficas Bio Max MS-1 (Kodak, Sigma). Tras el periodo de exposición se reveló la película.

#### **5.1.2.1.3. Determinación de la expresión de mucinas y “trefoil factors” en células Caco-2 y HT29/MTX.**

##### ***Extracción de RNA de cultivos celulares.***

##### Reactivos utilizados

Solución de tiocianato de guanidinio: ver apéndice 11.5.

Acetato sódico 2 M (pH 4.0).

Citrato sódico 0.75 M (pH 7.0).

Cloroformo:alcohol isoamílico, 50:1 (v/v).

Fenol (pH 4.0).

Isopropanol.

Dietil pirocarbonato (DEPC), 1% (v/v).

Etanol al 70% (v/v) en agua tratada con DEPC al 0.1% (v/v).

La extracción de RNA se realizó de acuerdo al método descrito por Murnane *et al* (1991).

Para minimizar los efectos de las ribonucleasas, el aislamiento de RNA se llevó a cabo en hielo. Con el mismo fin, todo el equipamiento y las soluciones utilizadas fueron tratados con un inhibidor de RNAsas, el dietil pirocarbonato (DEPC). Para ello, se preparó una solución de DEPC en agua bidestilada al 1% (v/v) y se agitó durante al menos 4 horas. Esta solución se utilizó para la preparación de los reactivos y para la eliminación de RNAsas del material de plástico, que se mantuvo inmerso en ella durante 4 horas. A continuación, tanto los reactivos como el material de plástico fueron autoclavados dos veces eliminando así el DEPC.

Con el fin de purificar el RNA, cada muestra procedente de cultivo celular se trató con 500  $\mu$ L de la solución de tiocianato de guanidinio, y se homogeneizó utilizando un homogeneizador mecánico (T25 basic, IKA Labor Technik, Staufen, Alemania). A la mezcla resultante se le añadieron 100  $\mu$ L de acetato sódico y se agitó vigorosamente. Posteriormente, se añadieron 1  $\mu$ L de fenol y 200  $\mu$ L de la mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico.

La mezcla resultante se agitó vigorosamente y se centrifugó a 16000 xg y 4°C, durante 30 minutos. Tras esta centrifugación, se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo y se añadió 1 mL de isopropanol a 4°C, se invirtió el tubo y la mezcla se mantuvo 1 hora a -20°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó la mezcla a 16000 xg y 4°C, durante 30 minutos. El precipitado resultante se sometió a una segunda precipitación, para lo que se resuspendió en 300  $\mu$ L de la solución de tiocianato de guanidinio, y se añadieron 300  $\mu$ L de isopropanol frío.

Tras incubar de nuevo 1 hora a -20°C, se centrifugó a 16000 xg y 4°C durante 30 minutos. El precipitado resultante se lavó con 1 mL de etanol al 70% (v/v), centrifugando a continuación a 16000 xg durante 30 minutos. Por último, se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado que fue resuspendido en un volumen adecuado de agua tratada con DEPC.

La cantidad de RNA que contenían las muestras se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (1 unidad de densidad óptica D.O. equivale a 40  $\mu$ g de RNA). La pureza de las muestras obtenidas se determinó obteniendo la relación de absorbancia a 260 nm/280 nm.

#### ***Electroforesis de RNA en geles de agarosa.***

Reactivos utilizados:

Agarosa.

Formaldehído 37% (v/v).

Tampón de carga de RNA (apéndice 11.5).

Solución de bromuro de etidio al 2% (v/v) en borato 1x (apéndice 11.5).

Tampón Borato 10x: ver apéndice 11.5.

Todos los reactivos utilizados, excepto la solución de EDTA fueron preparados en agua tratada con DEPC tal y como se recoge en el apartado anterior de extracción de RNA de cultivos celulares.

Se prepararon geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón borato 1x. Se calentó la mezcla hasta ebullición y se adicionó formaldehído en frío, hasta una concentración final de 0.8% (v/v). Posteriormente, se vertió la mezcla en el molde dejándose solidificar.

Con el fin de desnaturalizar el RNA, se incubaron las muestras durante 10 minutos a 65°C antes de cargarlas en el gel. Las muestras contenían 5 µL de tampón de carga y 2 µL de una solución de bromuro de etidio, que nos permitió observar las muestras a la luz ultravioleta y comprobar mediante el sistema de análisis Scion Image Beta 4.02 Win que contenían aproximadamente la misma cantidad de RNA, además de indicarnos la calidad del mismo.

A continuación se procedió a la electroforesis del gel a 70 V durante aproximadamente dos horas, en frío. El tampón utilizado para la electroforesis fue borato 1x.

#### ***Reacciones de retrotranscripción (RT). Obtención de cDNA.***

La retrotranscripción consiste en la obtención de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA mediante la acción de una transcriptasa reversa y un cebador *Not-dT* obteniéndose como producto final DNA.

Todas las reacciones de retrotranscripción se realizaron utilizando el kit comercial First strand cDNA synthesis (Boheringer Pharmacia Biotech, Barcelona, España). Se utilizaron random primers y se retrotranscribieron 8 µg de RNA por muestra, para un volumen final de reacción de 30 µL, siguiéndose las instrucciones del fabricante.

#### ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).***

El objetivo de esta técnica es la amplificación directa de un gen o un fragmento de DNA, o indirecta de un RNA (en este caso sería necesaria una retrotranscripción previa), presentes en mezclas de muy diversas fuentes, sin necesidad de una purificación previa de la muestra íntegra original. Sin embargo, es imprescindible que se conozca la secuencia de una parte de la región de DNA o RNA que se quiere amplificar.

Reactivos utilizados:

Tampón 10xPCR.

DNTPs 10mM (dCTP, dTTP, dATP, dGTP).

Taq polimerasa.

DNA molde.

Cebadores (ver tabla 5.2)

Todas las reacciones de PCR realizadas en este estudio se llevaron a cabo utilizando tampón de PCR 1x, dNTPs 0.04 mM, 5 unidades de taq polimerasa y como molde 2 µL del cDNA obtenido en la retrotranscripción, para un volumen final de las reacciones de 25 µL.

En la tabla 5.2 se recogen los cebadores, los parámetros determinados mediante RT-PCR y las condiciones que se utilizaron en los mismos.

**Tabla 5.2.** Cebadores utilizados, parámetros determinados mediante RT-PCR y las condiciones de las PCRs.

Gen	Condiciones	Cebadores (*)
<i>MUC 2</i>	94°C 30 s 60°C 30 s 72°C 45 s 30 ciclos	S: 5'-ctgaccaagaccgtcctcatg-3' A: 5'-gcaaggactgaaagactcagac-3'
<i>MUC 4</i>	94°C 30 s 60°C 30 s 72°C 45 s 30 ciclos	S: 5'-gttcttcggcatcttcttggggc-3' A: 5'-cacctccctttccagctccc-3'
<i>MUC 5B</i>	94°C 30 s 58°C 30 s 72°C 45 s 30 ciclos	S: 5'-ctgagagaccgaggtcaacatc-3' A: 5'-tgggcagcaggagcacggag-3'
<i>Trefoil factor 1</i>	94°C 30 s 60°C 30 s 72°C 45 s 30 ciclos	S: 5'-cctggtgtcacgccctccc-3' A: 5'-ccggtggaggtggcagcc-3'
<i>Trefoil factor 3</i>	94°C 30 s 60°C 30 s 72°C 45 s 30 ciclos	S: 5'-gctctgctgaggagtacgtggg-3' A: 5'-ggggcttgaacaccaaggc-3'
$\beta$ actina	94°C 30 s 60°C 30 s 72°C 45 s 30 ciclos	S: 5'-ccatggatgatgatcgccg-3' A: 5'-gcctagaagcatttgcggtgg-3'

(\*) S: sentido; AS: antisentido

**Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

Las moléculas de DNA con un tamaño comprendido entre 200 pb y 50 Kb de longitud se pueden separar en geles de agarosa de diversa concentración. Este tipo de geles se someten a electroforesis horizontales en un campo eléctrico de dirección constante.

Reactivos utilizados:

Agarosa.

Tampón de carga de DNA 6x: 30% (v/v) glicerol y 0.25% (p/v) azul bromofenol-xileno cianol.

Marcador de pesos moleculares.

Tampón TAE (Tris acetato 0.04 M pH 8.0, EDTA 1mM).

Solución de bromuro de etidio al 2% (p/v) en TAE.

Se prepararon los geles en tampón TAE, pesando la cantidad adecuada de agarosa en función de la concentración del gel deseada (tabla 5.3). Esta concentración dependió del fragmento o fragmentos de DNA que se deseaba separar. Posteriormente, se calentó la mezcla hasta ebullición y se vertió en el molde dejándose solidificar.

**Tabla 5.3.** Concentraciones de agarosa a utilizar en la preparación de geles destinados a la separación de DNA.

% Agarosa	Tamaño de DNA (Kb)
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

Tanto las muestras de DNA (5 µL) como el marcador de pesos moleculares se mezclaron con tampón de carga y se cargaron en los pocillos del gel. A continuación, se procedió a la electroforesis del gel a 70V.

Por último, se tiñó el gel en la solución de bromuro de etidio durante 5 minutos y se observaron las bandas en un transiluminador con luz ultravioleta.

**5.1.2.2. Estudio de la adhesión de monocitos sobre células HUVEC bajo condiciones de flujo.**

El objetivo de este ensayo fue estudiar la influencia de los oligosacáridos de leche de cabra en el proceso de adhesión de monocitos sobre células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) bajo condiciones de flujo.

Para ello se realizó un ensayo hidrodinámico *in vitro* en el que se simuló la circulación de los monocitos en el corriente sanguíneo, el endotelio y la interacción entre ambos.

La adhesión celular también puede ser estudiada aplicando ensayos de adhesión estáticos, pero en los ensayos dinámicos se pueden simular además las fuerzas que aparecen en el corriente sanguíneo, por lo que pueden ser utilizados para estimar la fuerza de las uniones entre células y ligandos.

En general, este ensayo hidrodinámico se utiliza para estudiar la importancia relativa de varias interacciones receptor/ligando en la adhesión célula-célula y célula-sustrato y para cuantificar la fuerza de dichas uniones. Así, puede ser utilizado para estudiar la adhesión entre cualquier célula en suspensión y posibles sustratos de unión. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 5.4.

Las etapas que componen este ensayo se describen a continuación, y son las siguientes: aislamiento de las células HUVEC, aislamiento de monocitos y evaluación de la adhesión bajo condiciones de flujo.

**Tabla 5.4.** Ejemplos de células y sustratos de unión en ensayos de adhesión hidrodinámicos.

Células	Sustrato de unión	Referencia
HUVEC	Ninguno	Wechezak <i>et al</i> (1989)
HUVEC	Neutrófilos humano adulto	Smith <i>et al</i> (1991) Kaplanski <i>et al</i> (1993) Abbassi <i>et al</i> (1993)
HUVEC	Neutrófilos humano neonato	Anderson <i>et al</i> (1991)
Células endoteliales de perro	Neutrófilos de perro adulto	Abbassi <i>et al</i> (1991)
Bicapa lipídica con P-selectina	Neutrófilos humano adulto	Lawrence y Springer (1991)
Bicapa lipídica con ICAM-1	Neutrófilos humano adulto	Lawrence y Springer (1991)
E-selectina soluble	Neutrófilos humano adulto	Lawrence y Springer (1993)
ICAM-1 soluble	Neutrófilos humano adulto	Lawrence y Springer (1993)
Plaquetas de humano adulto	Neutrófilos humano adulto	Buttrum <i>et al</i> (1993)
Plaquetas de humano adulto	Plaquetas humano adulto	Alevriadou <i>et al</i> (1993)
Colágeno	Plaquetas humano adulto	Alevriadou <i>et al</i> (1993)
HUVEC	Linfocitos T	Jones <i>et al</i> (1994)
L-ELAM de ratón	Linfocitos T	Jones <i>et al</i> (1994)
L-VCAM-1 de ratón	Linfocitos T	Jones <i>et al</i> (1994)
L-ICAM-1 de ratón	Linfocitos T	Jones <i>et al</i> (1994)
HUVEC	Monocitos	Luscinskas <i>et al</i> (1994)
Fibronectina	Fibroblastos	Truskey y Pirone (1990)

Abreviaturas: ELAM, molécula de adhesión leucocito-endotelial; HUVEC, célula endotelial de cordón umbilical humano; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1; VCAM-1, molécula de adhesión celular vascular 1.

#### **5.1.2.2.1. Aislamiento de células de cordón umbilical humano (HUVEC).**

Reactivos utilizados:

Tampón HBSS (Hank's balanced salt solution): ver apéndice 11.5.

Solución EGF (factor de crecimiento epidérmico): 5 ng/mL.

Medio HUVEC: ver apéndice 11.5.

Colagenasa tipo IA-S (Sigma Aldrich, EEUU): 0.1% (p/v) en tampón HBSS.

Solución tripsina-EDTA: tripsina al 0.5 % (p/v) con EDTA 10 mM.

Una vez recogido el cordón umbilical procedente de parto normal o cesárea (longitud mínima 20 cm), éste se guardó a 4 °C hasta ser procesado (como máximo una semana). El cordón se seccionó, 1 cm aproximadamente, por ambos extremos con bisturí estéril para eliminar tejidos no estériles y se lavó la vena interior y todo el exterior con tampón HBSS libre de calcio y magnesio.

A continuación, se introdujo en la vena la solución de colagenasa, cerrando previamente los dos extremos del cordón, y se dejó incubar durante 20 minutos a 37 °C. Tras este tiempo, se lavó de nuevo con tampón HBSS libre de calcio y magnesio y se adicionó 1 mL de suero fetal bovino para inactivar la enzima. A continuación se centrifugó a 250 xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 15 mL de medio HUVEC.

La suspensión de células se vertió en placas de cultivo pretratadas con gelatina al 0.2 % para su crecimiento y se incubaron aproximadamente 72 horas a 37 °C y 5.1 % CO<sub>2</sub>. Entonces, se eliminó el sobrenadante y se trató con 10 mL de medio comercial 1640 RPMI (PAA laboratories GmbH, Linz, Austria) y 8 mL de la solución tripsina-EDTA para separar las células; por último, se incubaron a 37 °C durante 2 minutos. A continuación, se centrifugó 5 minutos a 250 xg, se eliminó de nuevo el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 5 mL de medio HUVEC.

A continuación, con la ayuda de un hematocitómetro (Bright-Line, Hausser Scientific, Horsham, PA, EEUU) se contabilizó el número de células, con objeto de añadir a cada placa de la cámara de adhesión los µL necesarios para tener 400000 células por ensayo. Por último, se incubaron a 37 °C y 5.1 % CO<sub>2</sub> unos 5 ó 6 días en placas de 6 pocillos que incluyen las láminas de la cámara de adhesión para que crezcan sobre ellas hasta que se vieron confluentes al microscopio.

#### **5.1.2.2.2. Aislamiento de monocitos.**

Reactivos utilizados:

Tampón PBS: ver apéndice 11.5.

Tampón PBS-EDTA: EDTA 5mM en PBS.

Solución Lymphoprep (Progen Biotechnik, Heidelberg, Alemania).

Suero fetal bovino.

Medio de elutriación: HBSS 0.4% BSA, EDTA 0.3 mM.

Se obtuvo sangre heparinizada de donantes sanos que fue diluida 1:1 con PBS-EDTA 5mM, y se aislaron las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad con solución Lymphoprep a 800 xg y 22°C durante 20 minutos. El halo de células mononucleares fue recuperado, lavado dos veces con PBS-EDTA y por último centrifugado sobre suero fetal bovino a 175 xg y 22°C durante 10 minutos para eliminar las plaquetas. Tras otro lavado con PBS, las células fueron resuspendidas en medio de elutriación.

La separación de monocitos de los linfocitos se llevó a cabo mediante centrifugación de contracorriente, utilizando el sistema de elutriación JE-6B (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, EEUU). Las células fueron introducidas en una cámara de elutriación estándar mediante una bomba peristáltica, a una velocidad de flujo constante (18 mL/min). La velocidad del rotor se disminuyó paulatinamente desde las 2500 rpm iniciales, en pasos de 20 rpm. La población obtenida se monitorizó mediante citometría de flujo cada 12.5 mL de medio eluido. La temperatura del medio de elutriación y de la cámara de centrifugación se mantuvo constante a 4°C. El rotor fue detenido cuando la velocidad de salida de las células cayó por debajo de 100 células/segundo. La pureza y viabilidad de la muestra obtenida se determinó mediante citometría de flujo.

Los estudios de citometría de flujo fueron realizados en un citómetro EPICS Profile II (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, EEUU) equipado con el sistema PowerPak que permite la medición simultánea de 3 fluorescencias en una escala de 4 logaritmos.

#### **5.1.2.2.3. Evaluación de la adhesión bajo condiciones de flujo.**

##### Reactivos necesarios:

Tampón PBS: ver apéndice 11.5.

Medio HUVEC: ver apéndice 11.5.

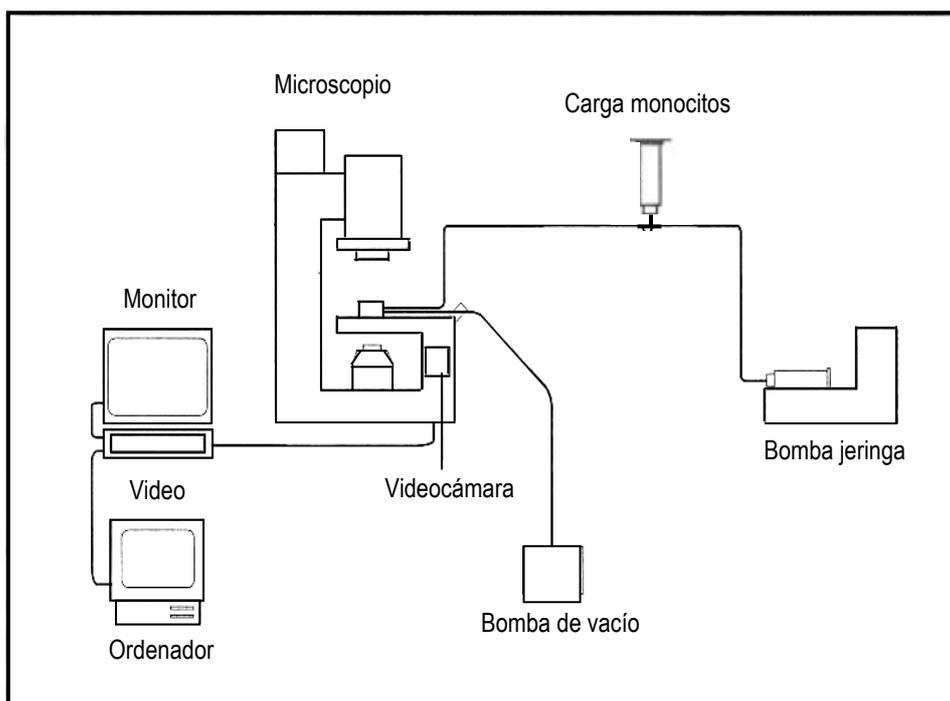
Solución de TNF- $\alpha$ : 10 mg/mL en tampón PBS.

Las células HUVEC deben estimularse previamente a la realización del ensayo con TNF- $\alpha$ , que es un potente activador de células endoteliales. Dicha estimulación se realizó como sigue: se tomaron 5  $\mu$ L de la solución de TNF- $\alpha$  y se mezclaron con 5 mL de medio HUVEC previamente atemperado a 37 °C.

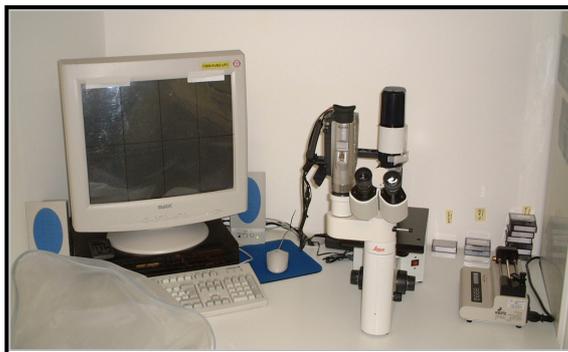
A continuación, se tomaron las células HUVEC una vez confluentes, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 2 mL de la solución anterior. Las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C y 5.1 % CO<sub>2</sub> antes de realizar el ensayo.

Los oligosacáridos de cabra a ensayar, previamente purificados por delipidación, precipitación proteica y cromatografía de permeación en gel según el apartado 5.1.1.3, se filtraron a través de columnas Detoxi-Gel® (Pierce, Rockford, IL, EEUU) con polimixina B inmovilizada para reducir los niveles de endotoxinas. A continuación, se disolvieron en medio HUVEC hasta una concentración de 125 µg/mL, y se repartieron 100 µL en cada una de los pocillos donde se encuentran las células HUVEC confluentes. Las placas se agitaron en un termomixer a 350 rpm durante 60 minutos a 37 °C antes de realizar el ensayo.

Por último, se montó el sistema de flujo de acuerdo con la figura 5.1. La cámara de adhesión con las células HUVEC en confluencia se colocó en el microscopio, se conectó la videocámara y se enfocó hasta ver las células en confluencia. Se cargaron 0.5 mL de la solución con monocitos, se conectó el flujo a 6.7 mL/min y se comenzó la grabación de la adhesión. El recuento de monocitos adheridos se realizó a los 10 minutos de empezar el ensayo de adhesión. Los experimentos se documentaron y evaluaron con el sistema mostrado en la figura 5.2.



**Figura 5.1.** Esquema del sistema de flujo para realizar el ensayo de adhesión dinámico.



**Figura 5.2.** Sistema utilizado para el ensayo de adhesión dinámico.

## 5.2. OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS POR ULTRAFILTRACIÓN.

### 5.2.1. SUSTRATO.

El sustrato empleado en los ensayos de ultrafiltración ha sido leche de cabra de la raza murciano-granadina suministrado por la Granja Experimental Ganadera de la Diputación Provincial de Granada (Albolote, Granada, España). Inmediatamente después de su recogida de la granja, la leche fue desnatada por centrifugación a 6500 xg durante 25 minutos y pasteurizada a 65 °C durante 30 minutos (pasteurización LTLT). El análisis medio de proteínas, hidratos de carbono (lactosa y oligosacáridos), grasa, extracto seco y calcio por 100 g de dicho sustrato se muestra en la tabla 5.5. Los análisis han sido realizados en el departamento de Biomedicina de Puleva Biotech S.A. (Granada, España).

**Tabla 5.5.** Composición media del sustrato inicial.

Proteína total (g)	3.30 ± 0.10
Caseína (g)	2.50 ± 0.10
Nitrógeno soluble (g)	0.20 ± 0.10
Hidratos de carbono	
Lactosa (g)	4.40 ± 0.15
Oligosacáridos (mg)	275 ± 25
Grasa (g)	0.30 ± 0.05
Extracto seco (g)	9.20 ± 0.10
Calcio (mg)	1300 ± 50
Media ± SD (n=10)	

Otros parámetros físico-químicos de interés son, la densidad, que osciló entre 1.026 y 1.042 g/L, en función de la estación, del estado fisiológico y de la raza, y el pH, que mostró variaciones comprendidas entre 6.5 y 6.8 a lo largo de toda la lactación.

### 5.2.2. MÓDULO DE MEMBRANA.

Los módulos de membrana utilizados en esta investigación han sido módulos cerámicos tubulares, suministrados por la casa TAMI Industries S.A. (Nyon, Francia), modelo Céram Inside 100 (figura 5.3). El soporte es tubular de 10 mm. de diámetro con 3 canales de 3.6 mm. de diámetro hidráulico (modelo Clover). Tienen una longitud de 1.2 metros y están hechas de óxido de aluminio, zirconio y titanio. Pueden soportar hasta 10 bar de presión, pHs entre 0 y 14 y temperaturas hasta 350°C. El tamaño de corte utilizado ha sido 50000 Da, con un área de 0.045 m<sup>2</sup> por membrana. La figura 5.3 muestra los módulos de membrana y la carcasa utilizados.



Figura 5.3. Módulo de membrana y carcasa utilizados.

#### ***Limpieza del módulo de membrana.***

La limpieza de la membrana se realiza una vez terminado el proceso de filtración. El protocolo que se ha establecido para el módulo Céram Inside 100 es el siguiente:

1. Se desaloja el producto con agua calidad milli-Q hasta que se comprueba por la salida de retenido que el producto ha dejado de salir.
2. Se recircula una mezcla de SDS (2 g/L) y NaOH (20 g/L) a 50 °C (solución de limpieza) durante el tiempo necesario hasta alcanzar los valores de flujo en las corrientes de filtrado y retenido previamente obtenidos con la membrana nueva, y que sirven de referencia para cada limpieza.
3. Se recircula agua milli-Q hasta conseguir pH neutro tanto por la corriente de retenido como por la de permeado.

4. Se procede a la determinación del caudal de filtrado de agua milli-Q a 30°C con la presión transmembrana para comprobar que la membrana está limpia.
5. En aquellos casos en que no se alcanzan los valores de flujo de referencia, se repiten los pasos 2 a 4. Cuando con esto tampoco se consigue recuperar la membrana, se recircula una segunda solución de limpieza compuesta de hidróxido sódico (15 g/L) y lejía comercial (NaClO) al 0.5% (v/v) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras ello, se desaloja la solución de limpieza utilizada, y se repiten los pasos 3 y 4.

### 5.2.3. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL.

El dispositivo experimental utilizado en ésta investigación incluye los siguientes componentes: un tanque de alimentación de 5 L de capacidad, un módulo de membrana con una membrana tubular de ultrafiltración, una bomba rotatoria de recirculación, válvulas, manómetros, una balanza analítica y un tanque adicional para suministro de agua. La figura 5.4 representa un esquema del dispositivo experimental utilizado, mientras que la figura 5.5 incluye fotografías reales del dispositivo: una visión general (A) o solo algunos componentes (B).

- Alimentación de sustrato:

La solución a filtrar, al pH y temperatura de trabajo, es depositada en el tanque de alimentación, que está previsto de una camisa de refrigeración/calefacción conectada a un baño Tectron S-473 (J.P. Selecta S.A., Barcelona, España) con agua a la temperatura adecuada y bocas en la parte superior para las correspondientes sondas de temperatura, alimentación de sustrato, retorno de retenido y diafiltración con agua.

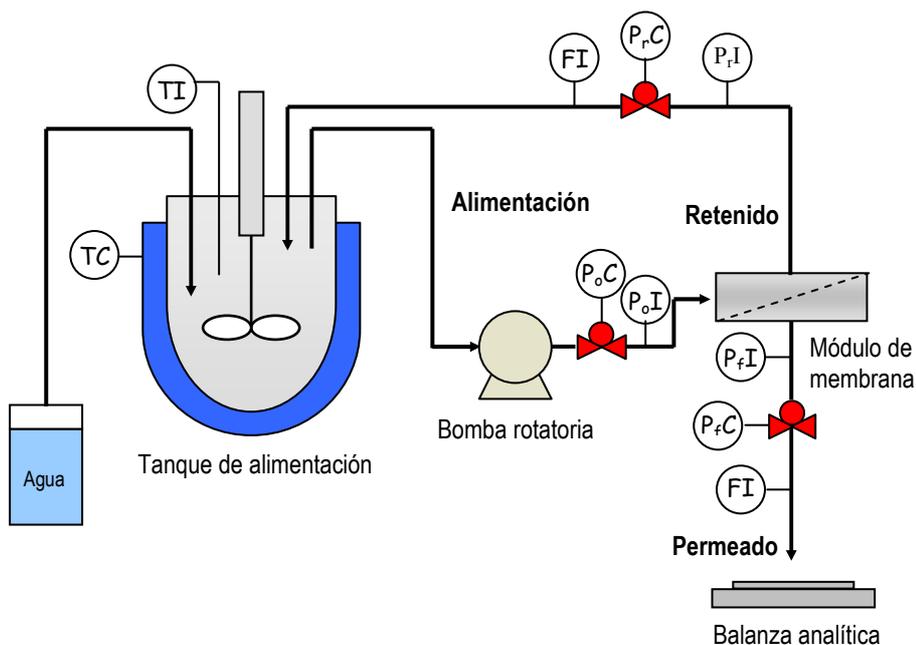
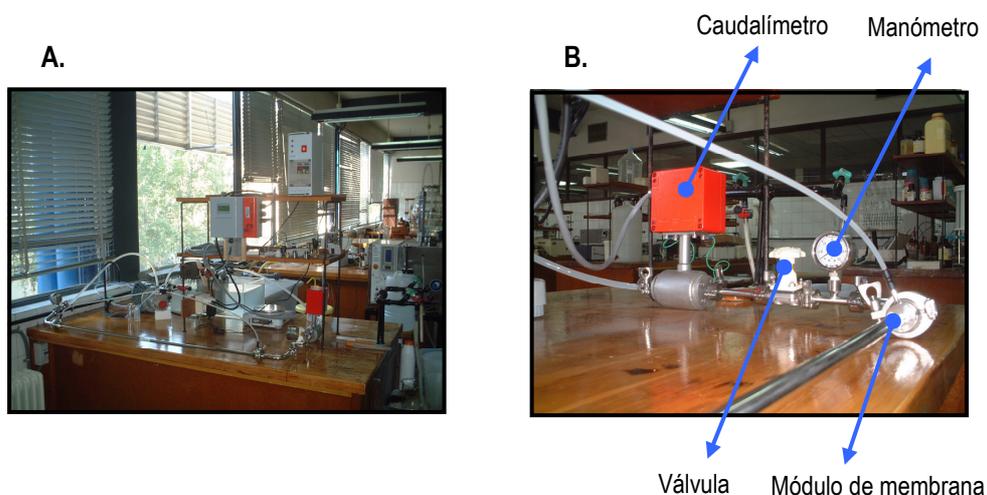


Figura 5.4. Esquema del dispositivo experimental de filtración tangencial.



**Figura 5.5.** A. Visión general del dispositivo experimental de filtración utilizado.  
B. Algunos componentes del equipo de filtración.

También dispone de dos salidas por la parte inferior para desagüe y conexión con el resto de componentes. La agitación mecánica en el tanque se consigue por el flujo turbulento existente al recircular el retenido.

El tanque de alimentación se conecta al módulo de membrana por conducción Masterflex (Chicago, Estados Unidos) a través de una bomba rotatoria de velocidad variable PROCON® modelo RR7 2607XL con un motor trifásico de 220 V y 550 W de potencia (Standex Int. Corp., Tennessee, EEUU) conectada a un controlador digital OMRON modelo Sysdrive 3G3JV inverter (Omron Electronics S.A., Madrid, España) que regula la frecuencia de giro del émbolo.

- Módulo de membrana:

El módulo de membrana utilizado es el descrito en el apartado 5.2.2. El retorno del mismo está conectado a un caudalímetro Badger Meter® (Iberfluid Instruments S.A., Barcelona, España) (figura 5.5 B) mediante conducción Masterflex y es recirculado de nuevo al tanque de alimentación. Dicha conducción está equipada de un manómetro y válvula para medida y control de la presión transmembrana. La salida, permeado, está equipada igualmente con sendos manómetro y válvula, y el flujo se monitoriza por pesada en una balanza electrónica de precisión Mettler Toledo modelo PB1501-S (Columbus, Ohio, EEUU).

- Medida y control de la presión transmembrana:

Las presiones fueron medidas por 3 manómetros con un rango de 0 a 60 psi (figura 5.4) situados a la entrada y salida del módulo de filtración, y en la corriente de permeado. Los valores de presión a la entrada y salida del módulo de membrana fueron controlados variando la velocidad de la bomba de recirculación y mediante la válvula instalada en la línea de recirculación.

#### 5.2.4. METODOS ANALÍTICOS.

Las corrientes de permeado y retenido, incluida la alimentación, han sido caracterizadas durante el proceso de ultrafiltración por la cuantificación de: proteína (proteína total, caseína y nitrógeno soluble), grasa, lactosa, extracto seco, oligosacáridos y la distribución de pesos moleculares de la fracción proteica. A continuación se describe cada uno de ellos.

##### 5.2.4.1. Métodos analíticos estándar.

Los métodos analíticos estándar utilizados y su documentación de referencia se muestran en la tabla 5.6.

**Tabla 5.6.** Métodos analíticos y documentación de referencia.

Parámetro	Método de análisis	Documentación de referencia
Proteínas (Proteína total, soluble y caseína)	Kjeldahl	Norma Internacional FIL-IDF 20B: 1993 Norma Internacional FIL-IDF 29: 1964 BOE 27-Jul-77, Nº 178, Orden 31-Ene-1977 Norma UNE 64011
Grasa	Gerber	Norma Internacional ISO 2446: 1976 BOE 27-Jul-77, Nº 178, Orden 31-Ene-1977
Lactosa	Enzimático	Manual kit 176303 Lac/D-Gal Boehringer Mannheim
Calcio	Absorción atómica	BOE 27-Jul-77, Nº 178, Orden 31-Ene-1977
Extracto seco	Desecación	Norma Internacional FIL-IDF 21: 1962 BOE 27-Jul-77, Nº 178, Orden 31-Ene-1977
Oligosacáridos	Cromatográfico	Kunz <i>et al</i> , 1996 Kunz <i>et al</i> , 1999b

##### 5.2.4.2. Distribución de pesos moleculares.

La determinación de la distribución de pesos moleculares se ha realizado por dos métodos diferentes: cromatográfico y electroforético.

##### ***Cromatografía de exclusión por tamaño.***

El método cromatográfico se realizó según la técnica desarrollada por Richter *et al* (1983) y Knights (1985), basado en cromatografía de exclusión, SE-HPLC, que condujo a una buena separación de péptidos y a una correlación

entre el logaritmo del peso molecular y el tiempo de retención (A. Guadix, Tesis Doctoral, 2001). Éste ha sido el método que mejores resultados ha dado por su mayor resolución y más fácil cuantificación.

Se utilizaron dos columnas en serie TSK-gel G2000-SW (Tosohaas GmbH, Stuttgart, Alemania) de 30 cm de longitud y 7.5 mm de diámetro interno (Mahmoud *et al*, 1992; González-Tello *et al*, 1994). El eluyente fue guanidina clorhídrica 6 M a 1 mL/min. Los efluentes de la columna se detectaron mediante lecturas de absorbancia a 280 nm. Las proteínas y los péptidos utilizados como referencia, su peso molecular y tiempo de retención se recogen en la tabla 5.7.

**Tabla 5.7.** Pesos moleculares y tiempos de retención de los patrones utilizados.

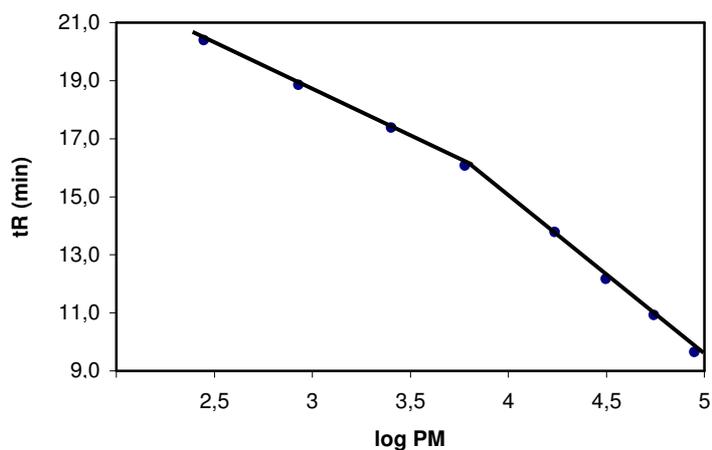
<i>Patrón</i>	<i>Peso molecular (g/mol)</i>	<i>t<sub>R</sub> (min)</i>
Lactoperoxidasa	89000	9.62
Lactoferrina	78000	10.41
Albúmina de huevo	44000	10.51
Quimotripsinógeno	25000	12.07
Ribonucleasa A	13700	14.02
Insulina	6000	16.27
Insulina A	2531	17.38
Péptido inductor del sueño	849	18.81
Phe-Gly-Gly	279	20.42

Se observó una dependencia lineal entre el tiempo de retención y el logaritmo del peso molecular, distinguiéndose dos zonas correspondientes a pesos moleculares mayores y menores de 7000 Da, límite que coincide con el valor por debajo del cual encontramos péptidos solubles en TCA (ver figura 5.6).

Se han encontrado los siguientes ajustes:

$$PM < 7000, t_R = -4.9711 \log PM + 34.035, \quad r^2 = 0.9937$$

$$PM > 7000, t_R = -3.2241 \log PM + 28.293, \quad r^2 = 0.9995$$



**Figura 5.6.** Curva de calibrado de la distribución de pesos moleculares.

***Electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE).***

A pesar de sus limitaciones en la separación de péptidos de peso molecular bajo, la electroforesis en gel, conocida como SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), ha sido utilizada ampliamente por varios autores: Leaver y Thomson 1993, Parrado et al. 1993, Perea et al. 1993, etc.

El objeto del método es la separación en un gel unidimensional de acrilamida con SDS de las distintas fracciones de proteínas en base a su peso molecular, de acuerdo con Laemmli *et al* (1970). Esta técnica se describe en el apartado 5.1.2.1.2.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

## 6.1. SELECCIÓN DE LA FUENTE DE OLIGOSACÁRIDOS.

Para la selección de la fuente natural con un perfil de oligosacáridos más similar, tanto cualitativa como cuantitativamente, al de la leche materna, se ha analizado la leche de diferentes especies animales de granja, entre ellas, la bovina, caprina y ovina. También se ha analizado la leche humana como referencia.

### 6.1.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS.

La concentración de oligosacáridos y lactosa detectada en leche de cabra, vaca, oveja y humana según las técnicas descritas en el apartado 5.1.1 de la sección de Materiales y Métodos se muestra en la tabla 6.1. Como puede observarse, el rango de concentración de oligosacáridos en leche de cabra oscila entre 250 y 300 mg/L, lo que representa aproximadamente entre 4 y 5 veces superior a la cantidad detectada en leche de vaca, y entre 9 y 10 veces superior a los niveles en leche de oveja. Sin embargo, el contenido de oligosacáridos de la leche de cabra es significativamente menor en comparación con el de la materna, cuyos valores oscilan entre 5 y 8 g/L (Kunz *et al*, 2000).

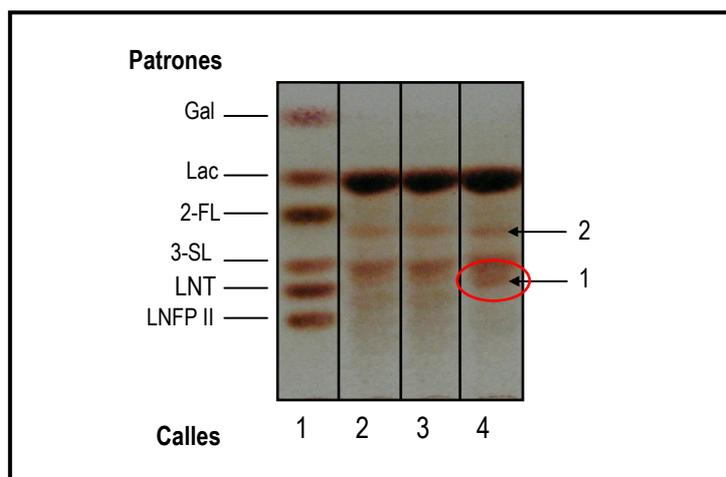
**Tabla 6.1.** Concentración de oligosacáridos y lactosa en leche de cabra, vaca, oveja y materna.

Tipo de leche	Oligosacáridos (g/L)	Lactosa (g/L)
Leche de cabra <sup>1</sup>	0.25 - 0.30	45
Leche de vaca <sup>2</sup>	0.03 - 0.06	46
Leche de oveja <sup>3</sup>	0.02 - 0.04	48
Leche materna <sup>4</sup>	5 - 8	68

<sup>1</sup> n = 10; <sup>2</sup> n = 5; <sup>3</sup> n = 5; <sup>4</sup> n = 3

En la figura 6.1 se muestra el análisis mediante HP-TLC de las muestras de leche de vaca, oveja y cabra desnatadas y desproteinizadas. En el carril 1 se cargaron diferentes patrones de oligosacáridos, mientras que en los carriles 2, 3 y 4 se depositaron las alícuotas correspondientes de leche de vaca, oveja y cabra, respectivamente. Es importante resaltar que se cargaron cantidades similares de carbohidratos en cada una de las calles.

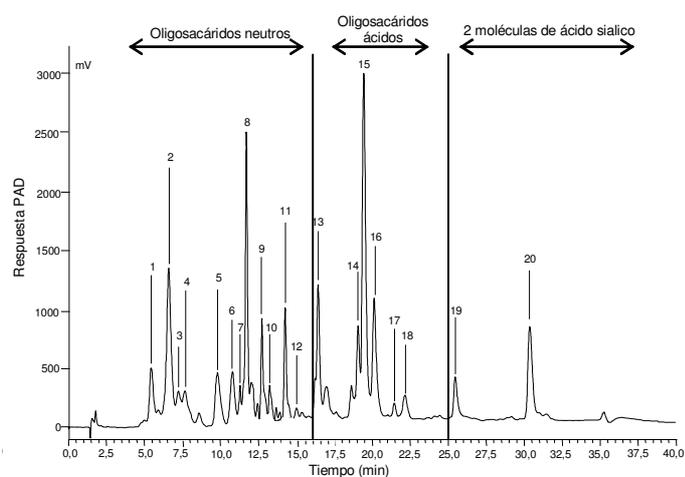
Se observa un patrón de bandas similar en cada una de las calles, a excepción de una intensa banda en el carril 4 correspondiente a la leche de cabra que apareció justo debajo del estándar de 3-sialil-lactosa (flecha 1). Dicha banda es una indicación de la presencia de diferentes estructuradas sialiladas en leche de cabra a diferencia de la leche de las otras dos especies (carriles 2 y 3). Ésta hipótesis fue posteriormente confirmada por cromatografía de intercambio aniónico a alto pH con detección amperométrica pulsante (HPAEC-PAD).



**Figura 6.1.** Placa de HP-TLC de leche desnatada y desproteïnizada. Calle 1: patrones; Calle 2: leche de vaca; 3: leche de oveja; 4: leche de cabra.

Con respecto a la fracci3n de oligosac3ridos neutros, la intensa banda superior que aparece en los 3 carriles es lactosa, que no fue eliminada previamente al an3lisis por HP-TLC. Tambi3n encontramos una banda com3n a las 3 muestras justamente debajo de la anterior (flecha 2), que fue posteriormente identificada como Galactosil-lactosa.

Todas las muestras fueron a continuaci3n analizadas por HPAEC-PAD, que es un m3todo de an3lisis m3s espec3fico para carbohidratos. Las figuras 6.2 a 6.5 muestran el perfil cromatogr3fico de la fracci3n de oligosac3ridos de las diferentes muestras de leche analizadas: humana (figura 6.2), oveja (figura 6.3), vaca (figura 6.4) y cabra (figura 6.5).



**Figura 6.2.** Perfil de oligosac3ridos por HPAEC-PAD de leche materna.

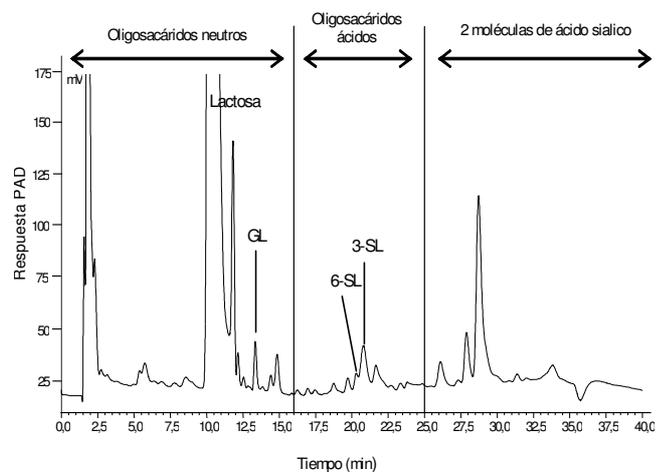


Figura 6.3. Perfil de oligosacáridos por HPAEC-PAD de leche de oveja.

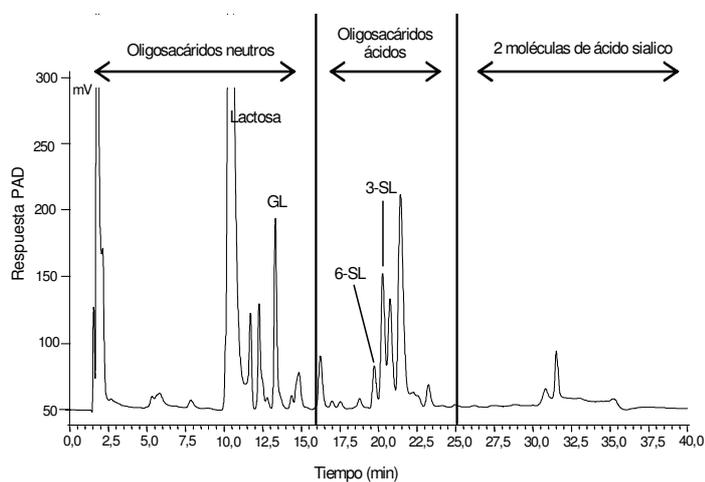


Figura 6.4. Perfil de oligosacáridos por HPAEC-PAD de leche de vaca.

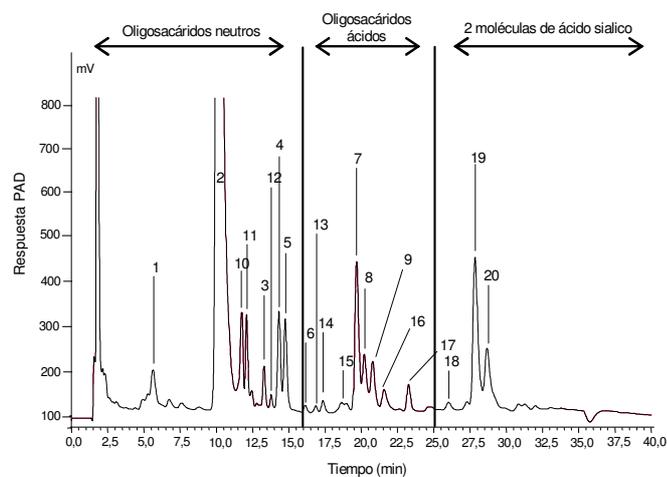


Figura 6.5. Perfil de oligosacáridos por HPAEC-PAD de leche de cabra.

Los tiempos de retención para los oligosacáridos neutros están comprendidos entre los minutos 1 y 16, mientras que el tiempo de retención para la fracción de oligosacáridos ácidos con una molécula de ácido siálico es superior a 16 minutos. Por su parte, los oligosacáridos conteniendo 2 o más moléculas de ácido siálico son detectados a tiempos de elución superiores a 25 minutos.

Como se puede observar en las figuras anteriores, los cromatogramas de leche de oveja y vaca muestran un menor número de picos (figuras 6.3 y 6.4) en comparación con los de leche humana o cabra (figuras 6.2 y 6.5), siendo el perfil cromatográfico de la leche de cabra el más similar al de la leche humana.

Además, el análisis cromatográfico revela que la fracción de oligosacáridos ácidos de leche de oveja contiene principalmente estructuras con dos moléculas de ácido siálico (figura 6.3), mientras que el perfil ácido de la leche de vaca está compuesto fundamentalmente por estructuras con solo una molécula de ácido siálico (figura 6.4). Sin embargo, la fracción de oligosacáridos ácidos de leche de cabra es rica en estructuras conteniendo tanto una como varias moléculas de ácido siálico (figura 6.5), al igual que la leche humana (figura 6.2).

Los picos numerados en el cromatograma de la figura 6.2 correspondiente a leche materna se corresponden con los siguientes oligosacáridos: 1. Lacto-N-difucohexaosa II; 2. 3-fucosil-lactosa; 3. Lacto-N-difucohexaosa I; 4. Lacto-N-fucopentaosa III; 5. Lacto-N-fucopentaosa II; 6. Lactosa; 7. 2-fucosil-lactosa; 8. Lacto-N-fucopentaosa I; 9. Lacto-N-neotetraosa; 10. Galactosil-lactosa; 11. Lacto-N-tetraosa; 12. Lacto-N-hexaosa; 13. Ácido siálico; 14. Sialil-lacto-N-tetraosa c; 15. 6-sialil-lactosa; 16. 3-sialil-lactosa; 17. Sialil-lacto-N-tetraosa a; 18. Sialil-lacto-N-tetraosa b; 19. Disialil-fucosil-lacto-N-hexaosa; 20. Disialil-lacto-N-tetraosa.

En la tabla 6.2 se recoge la cuantificación de este cromatograma, incluyendo la abreviatura y la concentración de la mayoría de los oligosacáridos identificados.

En el caso del cromatograma HPAEC-PAD de leche de cabra (figura 6.5), existen varios picos correspondientes a estructuras que no han sido elucidadas por dicha técnica sino por FAB-MS, al no existir patrones comercialmente disponibles, ya que no se encuentran presentes en leche materna.

Utilizando dicha técnica se han encontrado, además de los ya identificados por cromatografía, 15 nuevos oligosacáridos en leche de cabra no descritos anteriormente, 4 de ellos neutros y 11 ácidos. Todas estas estructuras identificadas tanto por HPAEC-PAD como por FAB-MS aparecen representadas en la figura 6.5 con el correspondiente pico numerado: 1. Galactosa; 2. Lactosa; 3. Galactosil-lactosa; 4. N-acetilglucosaminil-lactosa; 5. Lacto-N-hexaosa; 6. Ácido siálico; 7. 6-sialil-lactosa; 8. 3-sialil-lactosa; 9. N-glicolilneuraminil-lactosa; 10-20. Estructuras elucidadas por FAB-MS: Sialil-lacto-N-hexaosa, N-acetilglucosaminil-lacto-N-hexaosa, Disialil-lactosa, Di-N-glicolilneuraminil-lactosa, Sialil-N-glicolilneuraminil-lactosa, Sialil-hexosil-lactosa, N-glicolilneuraminil-hexosil-lactosa, Sialil-N-glicolilneuraminil-hexosil-

lactosa, Disialil-hexosil-lactosa, Di-N-glicolilneuraminil-hexosil-lactosa, Sialil-dihexosil-lactosa, N-acetilglucosil-hexosil-lactosa y N-acetilglucosil-dihexosil-lactosa.

**Tabla 6.2.** Oligosacáridos identificados en leche materna por HPAEC-PAD.

Abreviatura	Nombre	Concentración (g/L) <sup>1</sup>
<b>Oligosacáridos ácidos</b>		
DSLNT	Disialil-lacto-N-tetraosa	0.30 – 0.60
6-SL	6-sialil-lactosa	0.30 – 0.50
3-SL	3-sialil-lactosa	0.20 – 0.30
LST c	Sialil-lacto-N-tetraosa c	0.20 – 0.30
LST a	Sialil-lacto-N-tetraosa a	0.05 – 0.20
LST b	Sialil-lacto-N-tetraosa b	0.05 – 0.20
<b>Oligosacáridos neutros</b>		
LNFP I	Lacto-N-fucopentaosa I	1.20 – 1.70
LNT	Lacto-N-tetraosa	1.00 – 1.50
LNFP II	Lacto-N-fucopentaosa II	0.30 – 1.00
2-FL	2-fucosil-lactosa	0.40 – 0.50
LNDFH II	Lacto-N-difucohexaosa II	0.20 – 0.30
LNDFH I	Lacto-N-difucohexaosa I	0.10 – 0.20
LNFP III	Lacto-N-fucopentaosa III	0.01 – 0.20
LNH	Lacto-N-hexaosa	0.10 – 0.15
LNnT	Lacto-N-neotetraosa	0.10 – 0.15
3-FL	3-fucosil-lactosa	0.05 – 0.10
<b>Total oligosacáridos</b>		5 – 8

<sup>1</sup> n = 3

La figura 6.6 muestra el espectro obtenido por FAB-MS de leche de cabra, incluyendo algunos oligosacáridos permetilados ácidos y neutros. Los picos numerados y la relación masa/carga que aparecen se corresponden con las siguientes estructuras: 1. Lactosa, 2. Galactosil-lactosa, 3. 3- y 6-sialil-lactosa, 4. N-glicolilneuraminil-lactosa, 5. Sialil-hexosil-lactosa, 6. N-glicolilneuraminil-hexosil-lactosa, 7. Disialil-lactosa, 8. Sialil-N-glicolilneuraminil-lactosa, 9. Di-N-glicolilneuraminil-lactosa, 10. Lacto-N-hexaosa, 11. Disialil-hexosil-lactosa, 12. Sialil-N-glicolilneuraminil-hexosil-lactosa, 13. Di-N-glicolilneuraminil-hexosil-lactosa.

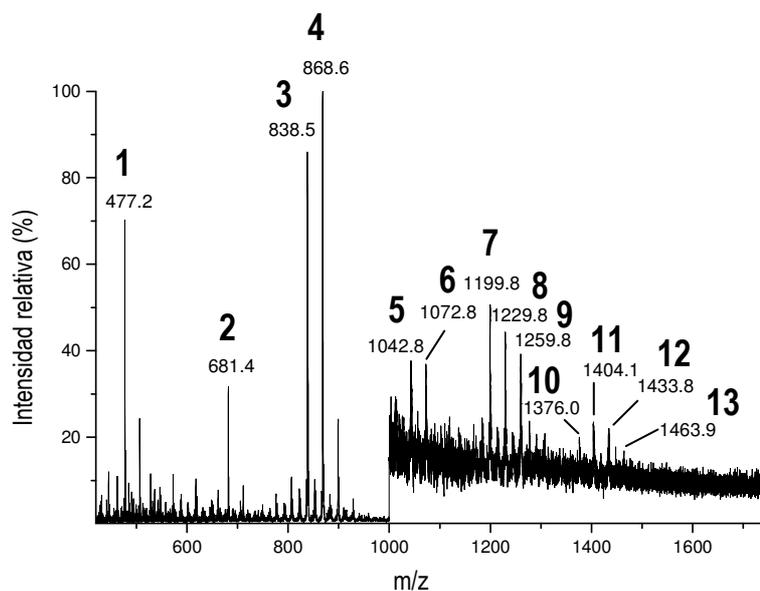


Figura 6.6. Espectro obtenido por FAB-MS de la fracción de oligosacáridos de leche de cabra.

Los oligosacáridos mayoritarios detectados en leche de cabra, su abreviatura y concentración se resumen en la tabla 6.3.

Tabla 6.3. Oligosacáridos mayoritarios encontrados en leche de cabra por HPAEC-PAD y FAB-MS

Abreviatura	Nombre	Concentración (g/L) <sup>1</sup>
<b>Oligosacáridos ácidos</b>		
6-SL	6-Sialil-lactosa	0.07 – 0.08
3-SL	3-Sialil-lactosa	0.05 – 0.06
NGL	N-glicolil-neuraminil-lactosa	0.03 – 0.04
SLNH	Sialil-lacto-N-hexaosa	0.001 – 0.005
DSL	Di-sialil-lactosa	0.001 – 0.005
SNGL	Sialil-N-glicolil-neuraminil-lactosa	0.001 – 0.005
SHL	Sialil-hexosil-lactosa	Trazas
NGHL	N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa	Trazas
SNGHL	Sialil-N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa	Trazas
DSHL	Di-sialil-hexosil-lactosa	Trazas
DNGL	Di-N-glicolil-neuraminil-lactosa	Trazas
SDHL	Sialil-di-hexosil-lactosa	Trazas
DNGHL	Di-N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa	Trazas

NGLNH	N-glicolil-neuraminil-lacto-N-hexaosa	Trazas
<b>Oligosacáridos neutros</b>		
GL	Galactosil-lactosa	0.05 – 0.06
NAL	N-acetil-glucosaminil-lactosa	0.03 – 0.04
LNH	Lacto-N-hexaosa	0.001 – 0.005
NALNH	N-acetil-glucosaminil-lacto-N-hexaosa	0.001 – 0.005
DNAL	Di-N-acetil-glucosaminil-lactosa	0.001 – 0.005
NAHL	N-acetil-glucosaminil-hexosil-lactosa	Trazas
NADHL	N-acetil-glucosaminil-di-hexosil-lactosa	Trazas
<b>Total oligosacáridos</b>		0.25 – 0.30

<sup>1</sup> n = 10

Los resultados obtenidos indican que dentro de la fracción de oligosacáridos ácidos de leche de cabra, las moléculas de 6- y 3-sialil-lactosa son significativamente mayoritarias (figura 6.5, picos 7 y 8), y más abundantes en comparación con la leche de vaca (figura 6.4) u oveja (figura 6.3). En total, dicha fracción ácida representa más del 40% de la cantidad total de oligosacáridos en leche de cabra. En particular, la molécula de sialil-lactosa ha sido descrita como un excelente receptor de patógenos ampliamente conocidos, como por ejemplo *Campylobacter pylori*, *Streptococcus sanguis*, *Helicobacter pylori* y *Streptococcus pneumoniae*, previniendo por tanto la unión de estos patógenos sobre las paredes del tracto gastrointestinal e inhibiendo su crecimiento en el intestino (Kunz *et al*, 1999a; Wang y Brand-Miller, 2003). También se ha descrito recientemente que la fracción sialilada de los oligosacáridos de leche es capaz de unirse a determinadas especies enterotóxicas y uropatógenas de *Escherichia coli* humanas (Martín-Sosa *et al*, 2002). En el caso de los oligosacáridos de leche de cabra, la elevada concentración encontrada de 3-sialil-lactosa y 6-sialil-lactosa sugiere que podrían prevenir el ataque de patógenos sobre el intestino, actuando como receptores de virus y bacterias de una manera similar a como se ha descrito para las mismas estructuras en leche humana.

Con respecto a la fracción de oligosacáridos neutros encontrados en leche de cabra, ésta es significativamente superior en comparación con la de la leche de vaca u oveja. El oligosacárido neutro mayoritario encontrado en las 3 leches animales (oveja, vaca y cabra) es galactosil-lactosa (figura 6.3, figura 6.4 y figura 6.5, pico 3), lo que tiene importantes repercusiones en el desarrollo cerebral postnatal, como se demuestra a continuación. Los glicolípidos mayoritarios constituyentes de la mielina y las membranas celulares de las neuronas son los galactocerebrósidos, que incluyen una molécula de galactosa como grupo polar. Durante el periodo de mielinización y desarrollo cerebral del recién nacido, el hígado podría no ser capaz de proporcionar toda la galactosa necesaria para el neonato, por lo que la suplementación con oligosacáridos de leche de cabra donde la galactosa es uno de los principales componentes, tanto libre como en forma de galactosil-lactosa, podría asegurar que dichos niveles no lleguen a ser limitantes durante este periodo de desarrollo (Kunz *et al*, 1999b).

También dentro de la fracción neutra, se ha detectado lacto-N-hexaosa en leche de cabra, un oligosacárido típico de leche materna descrito por primera vez hace más de tres décadas (Akira y Ginsburg, 1972). Además, también contiene N-acetil-glucosaminil-lactosa (30-40 mg/L), que representa aproximadamente el 15% del total de la fracción de oligosacáridos de leche de cabra y que no ha sido identificado en leche humana. No obstante, el monosacárido N-acetil-glucosamina ha sido descrito como un factor de crecimiento específico de *Bifidobacterium bifidum* (Moro, 1900; Kunz *et al*, 1999a).

En base a los resultados obtenidos se puede considerar la leche de cabra como una óptima fuente de oligosacáridos tanto por su composición como por su concentración, y la mejor en comparación con las leches comercialmente disponibles, conteniendo una gran variedad de oligosacáridos ácidos y N-acetil-glucosaminil-lactosa junto con galactosil-lactosa como oligosacáridos neutros mayoritarios.

Además, las similitudes estructurales encontradas entre los oligosacáridos y otros glicoconjugados de leche de cabra y los de leche materna sugieren que los primeros podrían desarrollar o imitar las actividades descritas para los segundos, pudiendo ser utilizados en productos para nutrición humana, como se demuestra a continuación.

## **6.1.2. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES.**

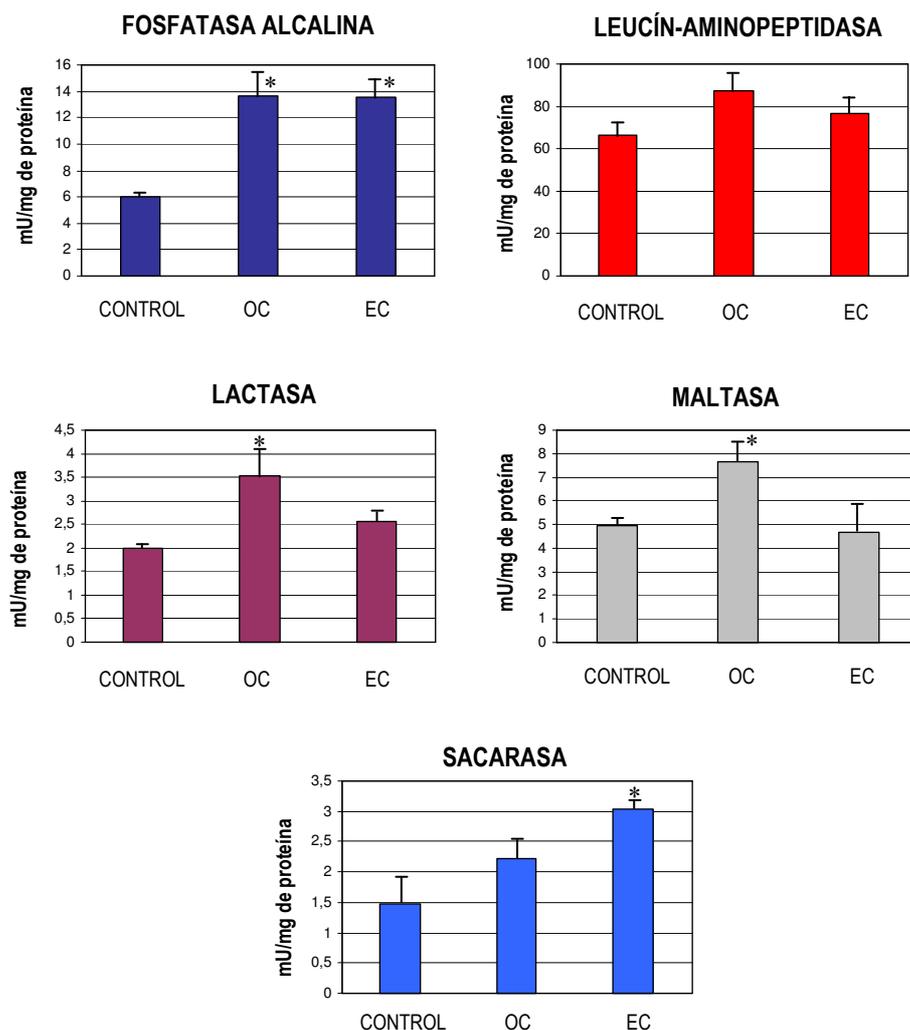
### **6.1.2.1. Determinación del efecto sobre la diferenciación de enterocitos y células calciformes.**

#### **6.1.2.1.1 Determinación de las actividades enzimáticas fosfatasa alcalina, leucín-aminopeptidasa y disacaridasas en células Caco-2.**

La adición de oligosacáridos purificados de leche de cabra (OC) o de un extracto rico en oligosacáridos obtenido por filtración tangencial a partir de leche de cabra (EC) ambos en una concentración de 5 mg oligosacáridos/L de medio de cultivo se tradujo en un aumento de la actividad fosfatasa alcalina. En cuanto a la actividad leucín-aminopeptidasa se observa una tendencia parecida, aunque las diferencias entre los grupos tratados y el grupo control no son significativas. El patrón de actividades lactasa y maltasa, fue muy similar. De hecho, las actividades de estas dos enzimas se vieron incrementadas por la adición de oligosacáridos al medio de cultivo (OC). Por otra parte, la actividad sacarasa no se vio incrementada en este grupo (OC), aunque cuando la adición procedía del extracto rico en oligosacáridos obtenido por ultrafiltración de leche de cabra (EC) sí se produjo un incremento significativo de la misma ( $p < 0.05$ ). Todos estos resultados se muestran en la figura 6.7.

Las células Caco-2, procedentes de una línea celular de carcinoma de colon humano, se utilizan habitualmente en ensayos de diferenciación y proliferación celular (Tanaka *et al*, 1996). La diferenciación epitelial puede afectar a la expresión de proteínas estructurales, proteínas de secreción y también de actividades enzimáticas

del borde en cepillo intestinal, como es el caso de las actividades fosfatasa alcalina, leucín-aminopeptidasa y disacaridasas (Sanderson *et al*, 1996). Así, ha sido descrito que estas actividades enzimáticas, que juegan un papel importante en la digestión y absorción de nutrientes, pueden ser alteradas por una serie de factores como la maduración intestinal, procesos de malnutrición, malabsorción, inflamación intestinal, así como por determinados nutrientes (Boza *et al*, 1995 y 1996). De hecho, un aumento en cualquiera de estas actividades enzimáticas se correlaciona con una mayor maduración-diferenciación de la células del epitelio intestinal.



**Figura 6.7.** Efecto de la adición de oligosacáridos purificados de leche de cabra (OC) o de un extracto rico en oligosacáridos obtenido por filtración tangencial a partir de leche de cabra (EC) al medio de cultivo sobre las actividades enzimáticas fosfatasa alcalina, leucín-aminopeptidasa y disacaridasas de células Caco-2. Los resultados son Medias  $\pm$  EEM (n=6). \*:  $p < 0.05$  vs Control.

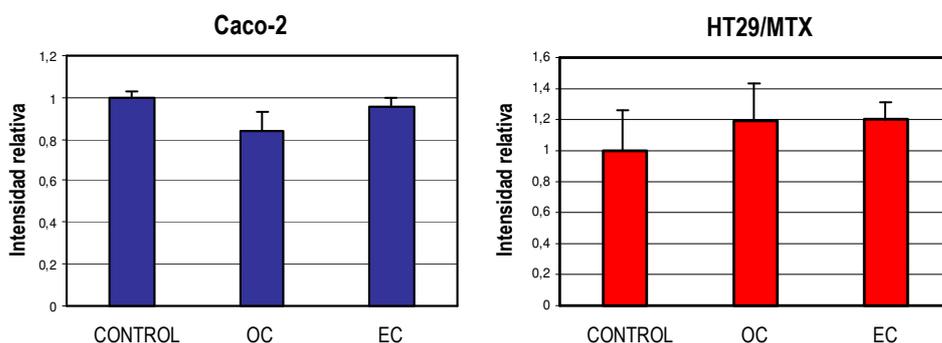
En este sentido, nuestros resultados, en su conjunto, irían en la dirección de que los oligosacáridos de la leche de cabra inducirían la maduración intestinal, ya que su adición al medio de cultivo de células Caco-2 aumenta la mayoría de las actividades enzimáticas ensayadas.

Hasta ahora, el interés de los oligosacáridos estaba centrado en su papel como receptores de patógenos, protegiendo la mucosa intestinal del ataque de bacterias patógenas (Kunz *et al*, 2000; Newburg, 2000) o como factores de crecimiento para *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Dai & Walker, 1999) más que como factores tróficos del epitelio intestinal propiamente dichos. Asimismo, se ha sugerido que los procesos de glicosilación a nivel de las microvellosidades intestinales es un proceso que se regula a través del desarrollo, en el que pueden influir bacterias probióticas y factores tróficos presentes en la dieta (Dai *et al*, 2000). Esa inmadurez del intestino delgado puede ser un factor determinante en la colonización microbiana y su relación directa con las infecciones intestinales en niños. Así, esa inmadurez en los sistemas de glicosilación se ha relacionado con una mayor sensibilidad y respuesta a la toxina termoestable de *E. coli* en ratas (Cohen *et al*, 1986), cerdos (Mezoff *et al*, 1991) y niños (Cohen *et al*, 1988), debido a un mecanismo receptor-dependiente. De esa forma, los oligosacáridos procedentes de la leche humana y otros rumiantes, ricos en ácido siálico, fucosa, manosa, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina, etc., podrían influenciar los patrones de glicosilación de las células epiteliales hacia un mayor grado de diferenciación (maduración) que permitiría una mayor producción de glicoconjugados fucosilados, que aparecen más tarde en la vida postnatal y que permitirían una mayor resistencia a la adhesión de patógenos en la superficie epitelial.

#### **6.1.2.1.2. Determinación del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en células Caco-2 y HT29-MTX.**

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es un marcador de proliferación celular que se utiliza habitualmente para estudiar el efecto de diferentes nutrientes presentes en el lumen intestinal sobre el mantenimiento y la proliferación del epitelio del colon (Jenab y Thompson, 2000). La adición de oligosacáridos purificados de leche de cabra (OC) o de un extracto rico en oligosacáridos obtenido por filtración tangencial a partir de leche de cabra (EC) al medio de cultivo no produjo ninguna alteración significativa en los niveles del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) tanto en células Caco-2 como en HT29/MTX (Figura 6.8).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos cuando se estudiaron las actividades enzimáticas de borde en cepillo intestinal, podríamos concluir que los oligosacáridos procedentes de leche de cabra añadidos al medio de cultivo de células Caco-2 y HT29/MTX cultivadas hasta confluencia estimulan la diferenciación celular (actividades fosfatasa alcalina, leucín-aminopeptidasa y disacaridasas), pero no estimulan la proliferación celular, tomando como marcador el PCNA.



**Figura 6.8.** Efecto de la adición de oligosacáridos purificados de leche de cabra (OC) o de un extracto rico en oligosacáridos obtenido por filtración tangencial a partir de leche de cabra (EC) al medio de cultivo sobre la concentración del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) de células Caco-2 y HT29/MTX. Los resultados son Medias  $\pm$  EEM (n = 6).

#### 6.1.2.1.3. Determinación de la expresión de mucoproteínas y “trefoil factors” en células Caco-2 y HT29-MTX.

El mucus gastrointestinal es una compleja mezcla de glicoproteínas, agua, macromoléculas celulares, electrolitos, microorganismos y células descamadas. Su consistencia, así como su capacidad de proteger la superficie epitelial se debe principalmente a las glicoproteínas llamadas mucinas o mucoproteínas (Neutra y Forstner, 1987).

Las mucoproteínas son glicoproteínas de muy alto peso molecular, cuya parte proteica representa el 10-20% de la estructura, siendo particularmente rica en treonina, serina y prolina. Las cadenas de oligosacáridos (80-90%) están principalmente formadas por N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa y manosa, que se unen a la parte peptídica a través de enlaces O-glicosílicos a treonina y serina (Faure *et al*, 2002).

La capa de mucus juega un papel relevante en varias funciones gastrointestinales muy importantes incluyendo protección, lubricación y eliminación de bacterias intestinales. Constituye una barrera física entre el epitelio y el lumen intestinal (bacterias, virus, toxinas, enzimas digestivos, proteasas bacterianas, etc). Por tanto, la cantidad y calidad de ese mucus juega un papel importante en la propia salud intestinal. De hecho, se sabe que en procesos inflamatorios como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn se produce una alteración de la capa de mucus, a nivel de la expresión de mucoproteínas y “trefoil factors” aumentando así la permeabilidad intestinal a bacterias, toxinas, etc (Hollander, 1999; Makkink *et al*, 2002; Faure *et al*, 2003).

Hoy día se sabe que el estatus nutricional del individuo es crucial para la integridad de la capa de mucus. Estados de malnutrición o ayuno afectan a su composición, disminuyendo su capacidad de protección, haciendo al

epitelio más susceptible a la acción de bacterias y endotoxinas (Boza *et al*, 1999). Sin embargo, muy pocos estudios se han hecho para comprobar el efecto de determinados nutrientes en la composición de mucoproteínas y en su funcionalidad. Así, ha sido descrito que diferentes fibras dietarias han sido capaces de estimular la producción de mucoproteínas a nivel de colon en ratas (Vahouny *et al*, 1985; Satchithanadam *et al*, 1990). Asimismo, se ha demostrado que la fuente proteica de la dieta también influye en la producción de mucoproteínas en intestino delgado de vacas (Montagne *et al*, 2000 a y b). Faure y Boza (2001, resultados no publicados) estudiaron en células HT29-MTX el efecto de la adición de treonina al medio de cultivo sobre la síntesis de mucoproteínas siguiendo la incorporación de L- (<sup>3</sup>H) treonina, viendo que ésta aumenta significativamente incrementando el nivel de treonina del medio de cultivo de 0.2 a 0.8 mM.

La familia de péptidos conocida como “trefoil factors” es un grupo de péptidos expresada en una región selectiva del tracto gastrointestinal. Se caracterizan por tener en su estructura un dominio de 6 residuos de cisteína que se creen que resultan de la formación de tres “loops” entrecadenas. Los principales son los TFF1, TFF2 y TFF3 y se suelen expresar por las células caliciformes (Dignass y Sturm, 2001). Estos péptidos juegan un importante papel en el restablecimiento de la mucosa intestinal tras un período de agresión (Mashimo *et al*, 1996), sugiriéndose que la modulación de estos mecanismos de reparación intestinal la harían a través de la función del complejo E-caderina/catenina (Liu *et al*, 1997). Aunque los receptores para los “trefoil factors” no se han identificado todavía de forma definitiva, se asume que son secretados en la superficie del lumen intestinal por la parte apical a través de mecanismos que son diferentes a los que actúan en la parte basolateral de estas células.

El objetivo de este experimento fue comprobar cual era el efecto de la adición de oligosacáridos de leche de cabra al medio de cultivo de células Caco-2 y HT-29/MTX sobre la expresión de mucoproteínas y trefoil factors.

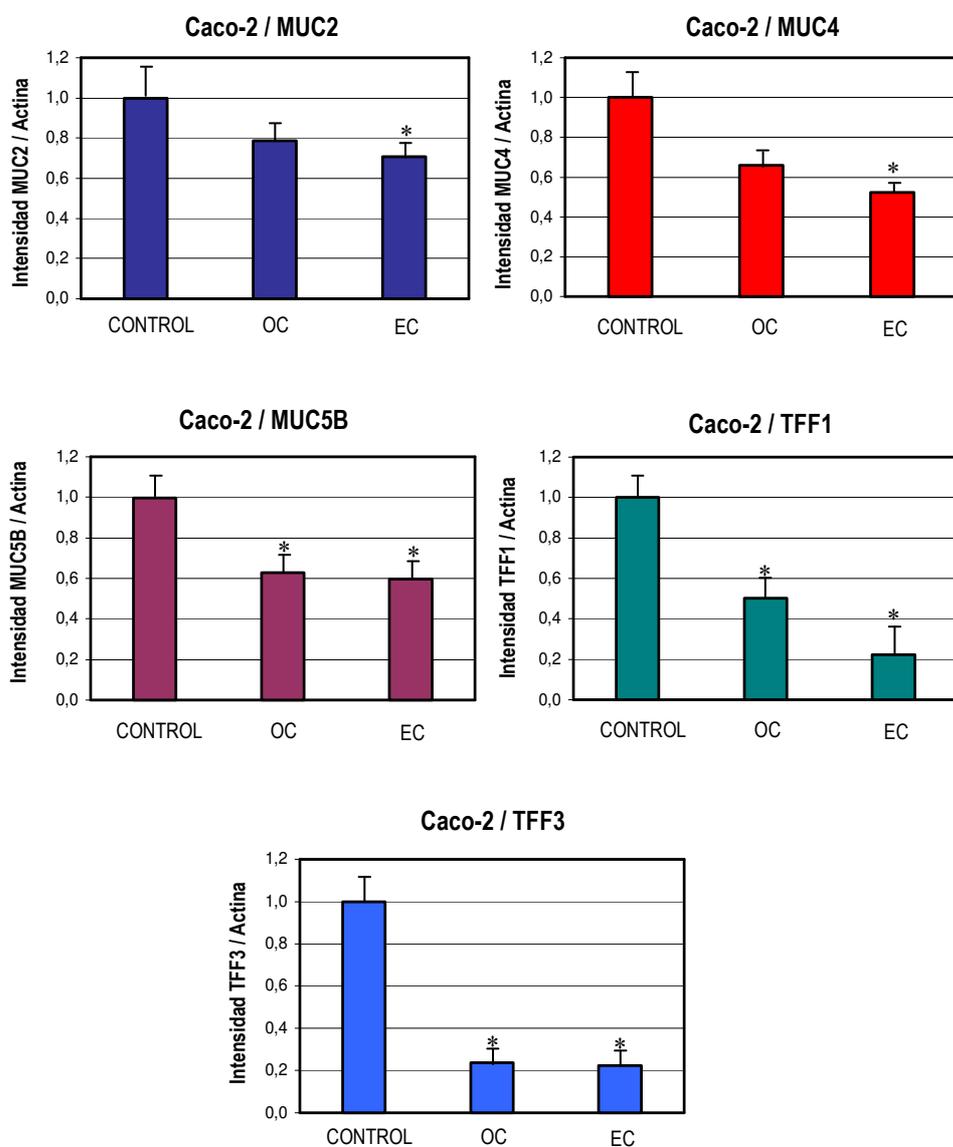
Las figuras 6.9 (a y b) y 6.10 (a y b) muestran el efecto de la adición de oligosacáridos purificados de leche de cabra (OC) o de un extracto rico en oligosacáridos obtenido por filtración tangencial a partir de leche de cabra (EC) al medio de cultivo sobre la expresión génica de mucoproteínas y “trefoil factors” en células Caco-2 y HT-29/MTX, respectivamente. De los resultados obtenidos podría deducirse que la fracción EC produce una disminución significativa y específica en la expresión de MUC2, MUC4 y MUC 5B en células Caco-2 y HT29/MTX. La fracción OC podría ser en parte responsable de los efectos observados en el caso de la expresión de MUC5B y de MUC2, ya que se observa una disminución significativa en las células HT-29/MTX en ambos casos y en las células Caco-2 en el caso de la expresión de MUC5B.

Por otra parte, la expresión de TFF1 y TFF3 se vio significativamente disminuida en células Caco-2, en todos los grupos ensayados, mientras que en las células HT29/MTX no se produjo efecto alguno debido a la adición de las fracciones OC o EC al medio de cultivo.

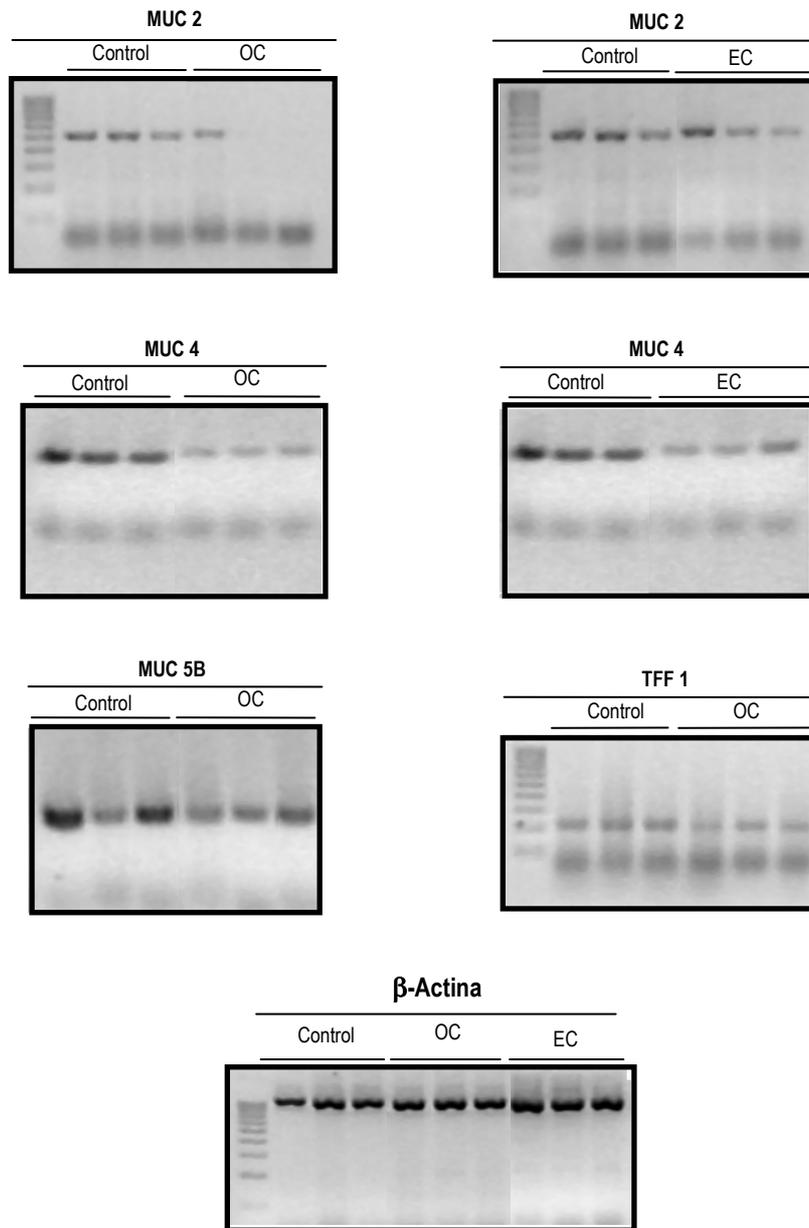
Huet *et al* (1998) y Gouyer *et al* (2001a), trabajando con células Caco-2 y HT29-MTX, sugirieron que la  $\alpha$ 2,3 sialilación juega un papel muy importante en el transporte intracelular de las glicoproteínas asociadas al borde de cepillo intestinal y también en la secreción de mucus y que este proceso podría ser modificado por las especies oligosacáridicas asociadas a la glicoproteínas de la parte apical de la superficie epitelial. Dai *et al* (2000) señalan que la secuencia terminal de carbohidratos en las glicoproteínas es crítica para la adhesión de bacterias y toxinas bacterianas y que, por tanto, la disponibilidad de glicosiltransferasas en el aparato de Golgi de las células epiteliales es crítica en la respuesta celular frente a bacterias y sus toxinas. Estos mismos autores postulan que la presencia de algunos factores tróficos procedentes de la dieta en las células epiteliales, señales hormonales, bacterias probióticas, etc pudiesen proteger el tracto gastrointestinal a través de una regulación en los procesos de glicosilación.

Nuestros resultados, tanto en células Caco-2 como en HT29-MTX, sugieren que los oligosacáridos de leche de cabra pueden alterar la expresión génica de la síntesis de mucoproteínas y "trefoil factors", si bien la implicación de estos cambios en los procesos de glicosilación celular, su posible efecto beneficioso en los procesos de adhesión bacteriana y su extrapolación a los efectos que esta suplementación podría tener en un organismo vivo no han sido objeto de esta memoria de tesis doctoral y, por tanto, permanecen sin ser estudiados.

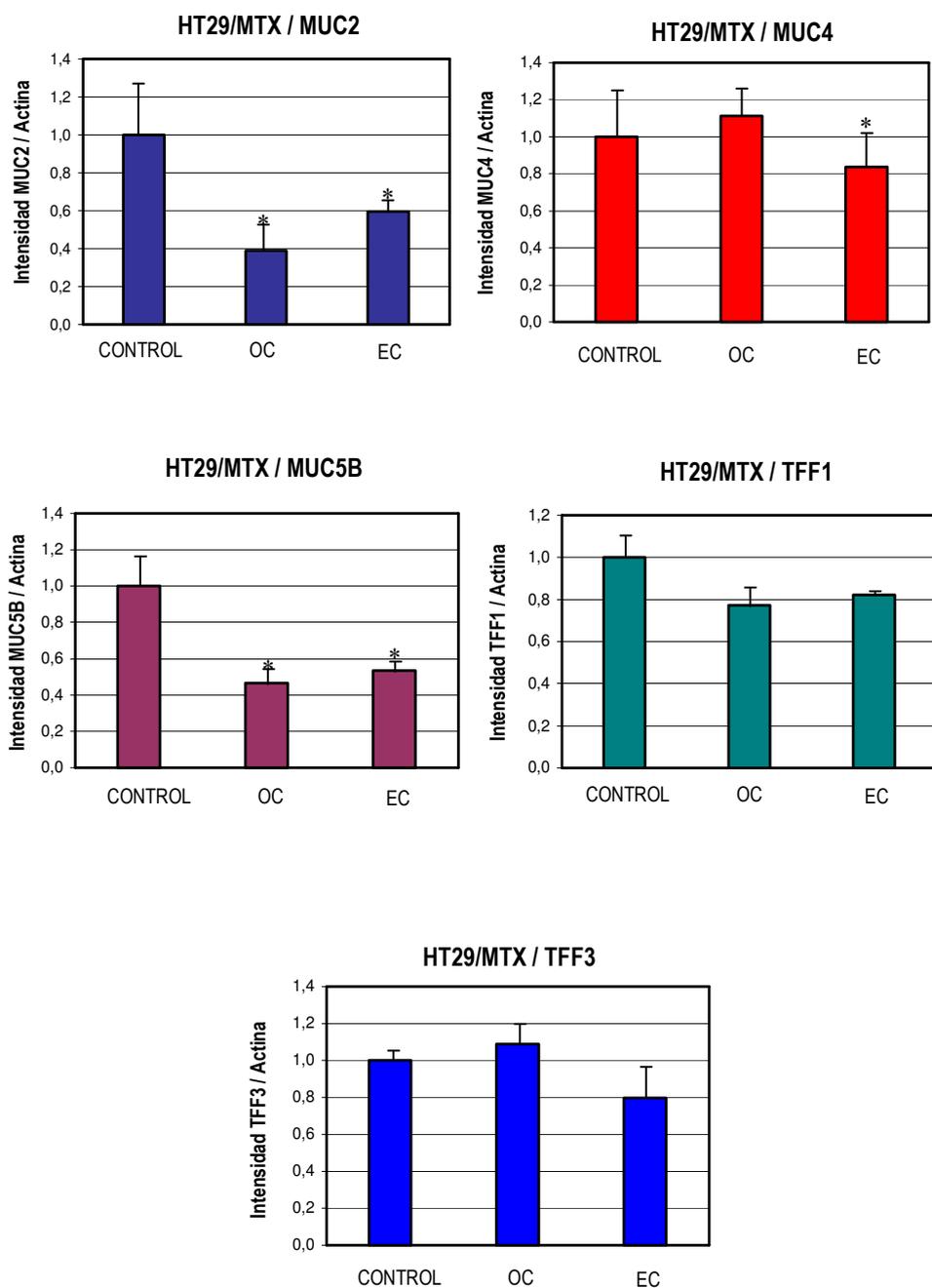
En cualquier caso, los resultados obtenidos tanto en Caco-2 como en HT29-MTX, para los genes que codifican la expresión de MUC 2, MUC 3 y MUC 5B son muy claros en el sentido de una inhibición de su expresión en presencia de oligosacáridos en el medio de cultivo. En el mismo sentido, la expresión de TFF1 y TFF3, también se vio disminuida en células Caco-2 en presencia de oligosacáridos de leche de cabra, cosa que no ocurrió en células HT29-MTX. Se ha descrito por Gouyer *et al* (2001b) que la secreción de péptidos TFF o "trefoil factors" es un proceso coordinado que tan solo ocurre después de la diferenciación de estas células en un fenotipo de células secretoras de mucus, momento que ocurre a los 9-11 días de cultivo donde se observa la máxima producción de mucus (Gouyer *et al*, 2001c) o por su inducción como es el caso cuando se adicionan al medio de cultivo agentes secretagogos. En este caso, las células se cultivaron 7 días con lo que ese cambio en la expresión fenotípica todavía no había ocurrido y podría explicar el hecho de que no se alterase la expresión de TFF1 y TFF3 en células HT29-MTX.



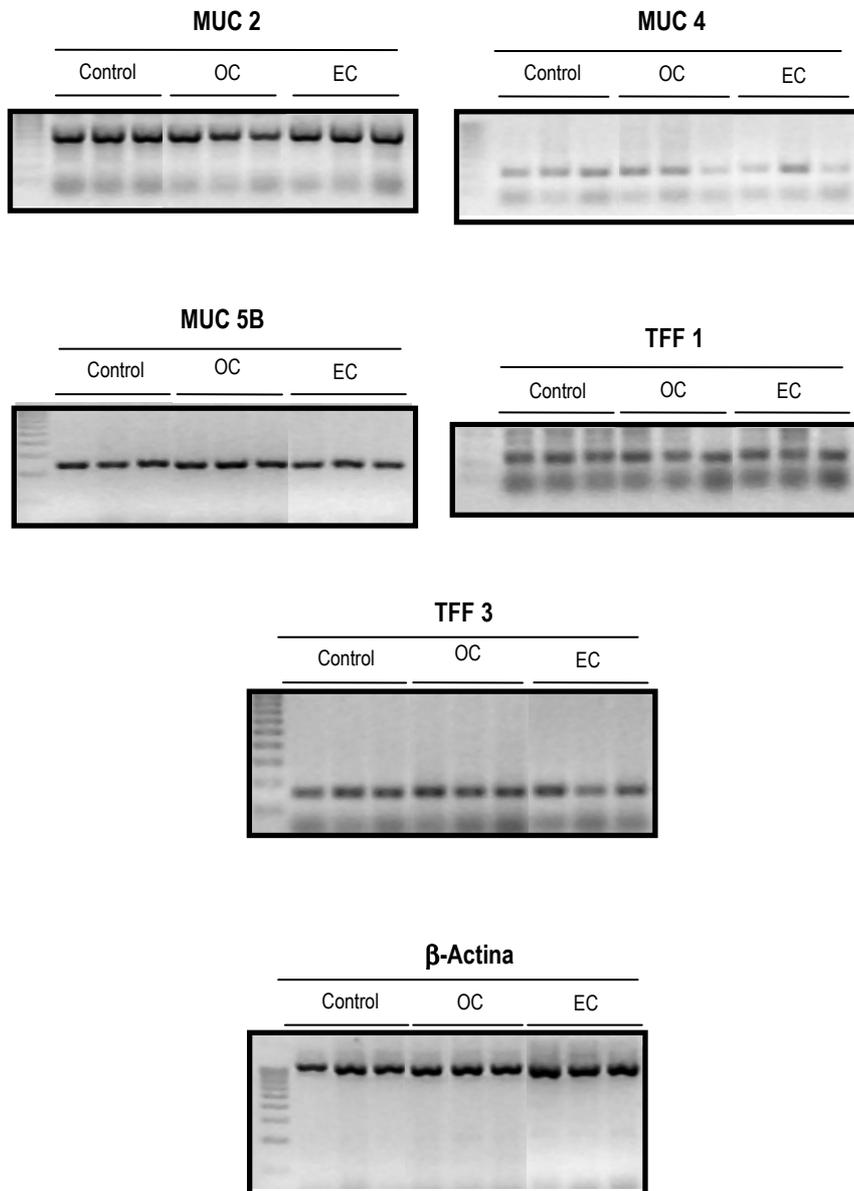
**Figura 6.9. A.** Efecto de la adición de oligosacáridos purificados de leche de cabra (OC) o de un extracto rico en oligosacáridos obtenido por filtración tangencial a partir de leche de cabra (EC) al medio de cultivo sobre la expresión génica de mucoproteínas y “trefoil factors” en células Caco-2. Los resultados son Medias  $\pm$  EEM (n = 6). \*: p < 0.05 vs Control.



**Figura 6.9. B.** Fotografías de la RT-PCR del ensayo para la determinación del efecto de la adición de oligosacáridos purificados de leche de cabra (OC) o de un extracto rico en oligosacáridos obtenido por filtración tangencial a partir de leche de cabra (EC) al medio de cultivo sobre la expresión génica de mucoproteínas y “trefoil factors” en células Caco-2. Los resultados son Medias  $\pm$  EEM (n = 6). \*: p < 0.05 vs Control.



**Figura 6.10. A.** Efecto de la adición de oligosacáridos purificados de leche de cabra (OC) o de un extracto rico en oligosacáridos obtenido por filtración tangencial a partir de leche de cabra (EC) al medio de cultivo sobre la expresión génica de mucoproteínas y “trefoil factors” en células HT29-MTX. Los resultados son Medias  $\pm$  EEM (n = 6). \*: p < 0.05 vs Control.

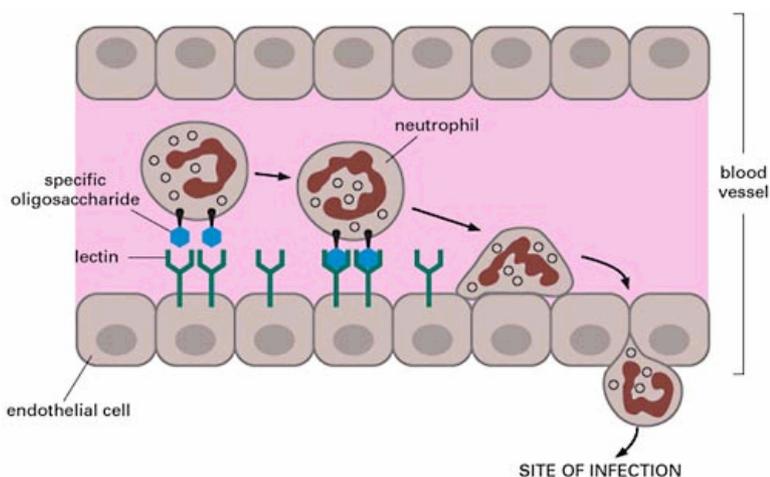


**Figura 6.10. B.** Fotografías de la RT-PCR del ensayo para la determinación del efecto de la adición de oligosacáridos purificados de leche de cabra (OC) o de un extracto rico en oligosacáridos obtenido por filtración tangencial a partir de leche de cabra (EC) al medio de cultivo sobre la expresión génica de mucoproteínas y “trefoil factors” en células HT29-MTX. Los resultados son Medias  $\pm$  EEM (n = 6). \*: p < 0.05 vs Control.

### 6.1.2.2. Estudio de la adhesión de monocitos sobre células HUVEC bajo condiciones de flujo.

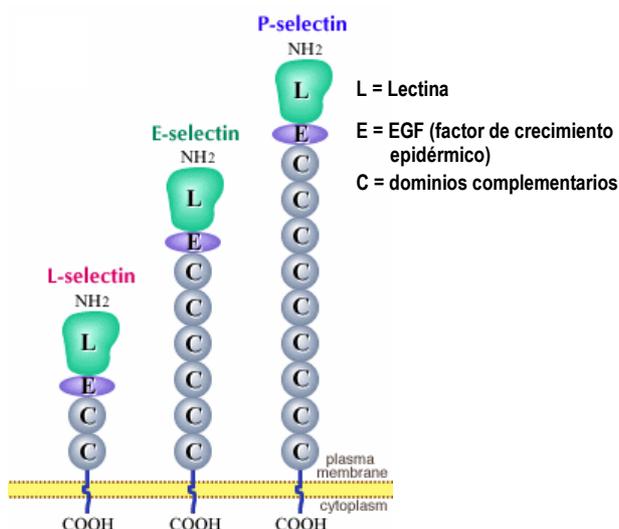
El ensayo de adhesión dinámico se realizó tal como se describe en el apartado 5.1.2.2. de la sección de Materiales y Métodos. Se fundamenta en que los oligosacáridos de la leche humana son mínimamente digeridos en el tracto gastrointestinal del neonato (Gnoth *et al*, 2000) y son parcialmente absorbidos en niños alimentados con leche materna (Kunz *et al*, 2000), por lo que podrían no solo tener funciones en el intestino, sino también ejercer efectos a nivel sistémico, como por ejemplo, en procesos inflamatorios.

La etapa inicial en el proceso de adhesión leucocitaria sobre células endoteliales (figura 6.11) está mediada por moléculas de adhesión celular de la familia de las selectinas (CD62) y ligandos específicos que son moléculas de oligosacáridos.



**Figura 6.11.** Proceso de adhesión leucocitaria sobre células endoteliales.

Las selectinas (figura 6.12), un grupo de moléculas de adhesión celular, se expresan en la superficie celular de leucocitos, plaquetas, así como células endoteliales y tienen un importante papel en la cascada de adhesión celular que conduce a la extravasación de células de la sangre en los tejidos durante los procesos de inflamación. A través de la unión a ligandos-carbohidratos situados en la superficie de las células endoteliales, los leucocitos son retirados de la circulación sanguínea y comienzan a rodar en la pared endotelial hasta que quedan perfectamente unidos a la pared, proceso que es mediado por otro tipo de moléculas de activación endotelial denominadas integrinas (Varki, 1994).



**Figura 6.12.** Tipos de selectinas (L-, E- y P-selectina).

Nuestro objetivo fue investigar si los oligosacáridos de leche de cabra son capaces de actuar como análogos de los ligandos de las selectinas y por tanto inhibir la adhesión de monocitos sobre células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) bajo condiciones de flujo. Para ello se realizaron 3 tipos de ensayos en diferentes condiciones para comprobar la influencia de la suplementación con oligosacáridos de leche de cabra sobre la adhesión de monocitos en células endoteliales. Se utilizó el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) para estimular las células HUVEC, pues es una citoquina proinflamatoria y un potente agonista en la activación de células endoteliales (Imaizumi *et al*, 2000).

Los 3 tipos de ensayos realizados son los siguientes:

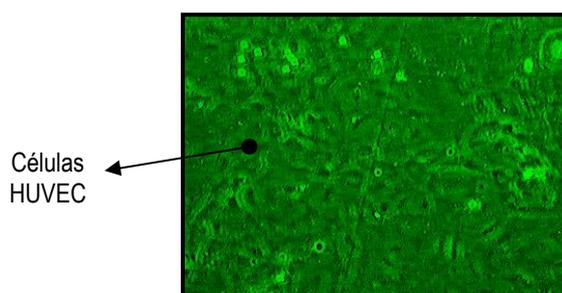
1. Sin estimulación previa de las células con TNF- $\alpha$  y sin suplementación con oligosacáridos (control 1).
2. Con estimulación previa de las células con TNF- $\alpha$  y sin suplementación con oligosacáridos (control 2).
3. Con estimulación previa de las células con TNF- $\alpha$  y con suplementación con oligosacáridos de leche de cabra.

En total se realizaron 9 experimentos independientes, 3 de cada tipo de ensayo. En los ensayos con estimulación previa de las células endoteliales, ésta se realizó con TNF- $\alpha$  a una concentración de 10 ng/mL y 4 horas antes de la realización de los mismos. Por su parte, la suplementación del medio de cultivo celular con oligosacáridos se realizó una hora antes y con una concentración final de 125  $\mu$ g/mL.

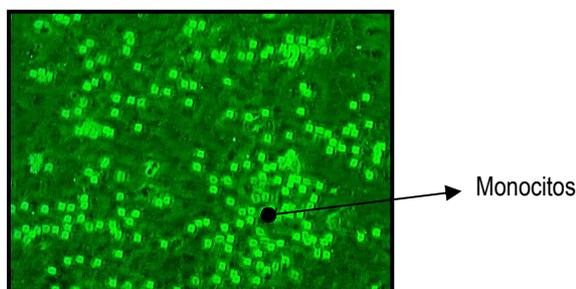
Los monocitos se aplicaron sobre las células endoteliales a un flujo de 6.7 mL/min, que fue calculado para generar una presión fisiológica de 1 dina/cm<sup>2</sup>. El recuento de monocitos adheridos se realizó a los diez minutos de

aplicar el flujo de monocitos, resultando que la suplementación del medio de cultivo celular con oligosacáridos de leche de cabra redujo la adhesión de monocitos en un  $21.1\% \pm 11.4$  (valor dado como media  $\pm$  SD). Comparada con el control 2 sin suplementación con oligosacáridos, el efecto fue altamente significativo:  $P = 0.00074$ .

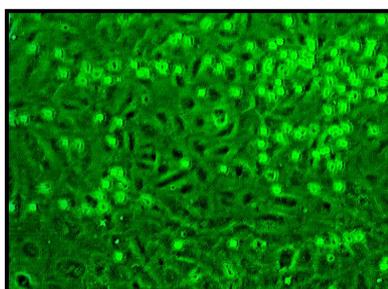
Las figuras 6.13, 6.14 y 6.15 (cedidas por el departamento de Nutrición Humana de la Universidad Justus Liebig de Giessen, Alemania) muestran la adhesión de los monocitos sobre las células endoteliales para cada uno de los ensayos realizados; en particular, en las figuras 6.13 y 6.14 (controles 1 y 2) se puede observar la influencia de la activación de las células HUVEC con  $\text{TNF-}\alpha$ , mientras que en las figuras 6.14 y 6.15 se puede observar la influencia de la adición de oligosacáridos de leche de cabra sobre la adhesión en células endoteliales activadas.



**Figura 6.13.** Adhesión de monocitos en células HUVEC no estimuladas (control 1).



**Figura 6.14.** Adhesión de monocitos en células HUVEC estimuladas con  $\text{TNF-}\alpha$  (control 2).



**Figura 6.15.** Adhesión de monocitos en células HUVEC estimuladas con  $\text{TNF-}\alpha$  tras incubación con oligosacáridos de leche de cabra.

Los tetrasacáridos sialilados y fucosilados sialil-Lewis-x y sialil-Lewis-a han sido identificados como estructuras esenciales y determinantes de la unión con selectinas (Chhabra *et al*, 2003). Entre los oligosacáridos que existen en la leche humana, existen varias estructuras que tienen epítomos muy similares a los ligandos para las selectinas (Grönberg *et al*. 1992). Rudloff *et al* (2002) estudiaron si los oligosacáridos de la leche humana contenían o no estos epítomos ligandos para estas selectinas que median en las etapas iniciales de la extravasación de leucocitos en los procesos inflamatorios. Estos autores encontraron estructuras ligandos sialil- Lewis y sugirieron la posibilidad de su función fisiológica en procesos inflamatorios.

Nelson *et al* (1993) y Tyrell *et al* (1991) en estudios *in vitro* de inhibición de la adhesión celular, comprobaron que los oligosacáridos prevenían esta adhesión por lo que pensaban que los oligosacáridos de la leche humana también serían efectivos. Bode y Rudloff (2002) comprobaron que los oligosacáridos de leche humana eran capaces de inhibir la adhesión celular de monocitos sobre células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) estimuladas con TNF- $\alpha$ . En tanto que los oligosacáridos de la leche humana no se digieren en el tracto gastrointestinal (Gnoth *et al* 2001), uno podría pensar que tras el paso por estómago e intestino, todavía conservarían esos epítomos para selectinas. Además, se ha comprobado en niños que algunos lacto-oligosacáridos son absorbidos y encontrados posteriormente en orina. Así, algunos epítomos existentes en los oligosacáridos de la leche humana podrían circular por la sangre algún tiempo antes de ser excretados por orina. En cualquier caso, su principal punto de actuación sería a nivel de intestino delgado y grueso, ayudando en la prevención de enfermedades inflamatorias intestinales por unión a leucocitos presentes en la mucosa.

En definitiva, nuestros resultados demuestran que los oligosacáridos de la leche de cabra, al igual que los de leche materna, son capaces de inhibir *in vitro* la adhesión de monocitos sobre células HUVEC estimuladas con TNF- $\alpha$ . Asimismo y como esta memoria describe, las principales estructuras de oligosacáridos encontradas en leche de cabra también están presentes en leche humana, por lo que unido a estos resultados sobre inhibición de adhesión celular, podríamos postular que los oligosacáridos de leche de cabra podrían tener esta misma acción protectora que se les confiere a los de leche humana. En cualquier caso, para confirmar estos resultados, en nuestro laboratorio estamos llevando a cabo estudios que permitan discernir si estas estructuras oligosacáridicas pueden también actuar como inmunomoduladores *in vivo*.

## 6.2. OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS POR ULTRAFILTRACIÓN.

El objetivo perseguido en este apartado es la puesta a punto del proceso de membranas que permitiera el fraccionamiento de la leche de cabra en un concentrado proteico y en otra fracción que contuviera al menos el 95% de los oligosacáridos sin modificar sus propiedades biológicas ni su biodisponibilidad.

## **6.2.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL.**

Los ensayos de ultrafiltración se llevaron a cabo en el dispositivo experimental descrito en el apartado 5.2.3 de la sección de Materiales y Métodos. Previamente a la realización de los ensayos se preseleccionaron el módulo de membrana: material, configuración y tamaño de poro, y las condiciones de operación: temperatura, velocidad de recirculación y presión transmembrana.

### **6.2.1.1. Selección del módulo de membrana.**

#### ***Material del módulo de membrana.***

El criterio más importante a la hora de seleccionar el material del módulo de membrana es que éste debe estar autorizado para el contacto con alimentos. Además, se tuvieron en cuenta otras cualidades, como la capacidad de limpieza, la durabilidad, la escalabilidad y su resistencia frente a condiciones de operación extremas. En base a los criterios citados, se seleccionaron las membranas cerámicas de última generación fabricadas de óxido de aluminio, titanio y zirconio por sus mejores propiedades, ya que son fácilmente escalables, soportan temperaturas de esterilización de hasta 350°C, pHs comprendidos entre 0 y 14 y presiones de hasta 10 bar, lo que les confiere una resistencia mecánica superior en comparación con el resto de membranas orgánicas utilizadas tanto a nivel industrial como a escala de laboratorio. Esta mayor resistencia se traduce experimentalmente en una mayor vida media, lo que le confiere la posibilidad de tener largos tiempos de operación, pudiendo trabajar hasta 10-14 años tras su instalación y tolerando frecuentes limpiezas agresivas.

#### ***Configuración del módulo de membrana.***

Según se describió en el apartado 3.2.1 de la sección de Antecedentes bibliográficos, las membranas se pueden disponer en diferentes configuraciones, que son: tubular, fibra hueca, plana y espiral. La elección de una u otra depende de diferentes criterios, entre ellos el sanitario, que es esencial para todas las aplicaciones en la industria agroalimentaria, la compacidad (definida como la relación entre superficie filtrante con respecto al volumen del equipo), el tipo de régimen de flujo, la facilidad de desmontado y sustitución de membranas defectuosas, etc. Además, para satisfacer la legislación, la configuración del módulo de filtración debe evitar la existencia de zonas muertas, susceptibles de colmatarse y de favorecer el desarrollo bacteriano. La evaluación de todos estos criterios condujo a la selección de módulos tubulares por su sencillez en la instalación, limpieza y reemplazamiento de las membranas, y por su mayor facilidad de modelización y escalado.

**Tamaño de poro de la membrana.**

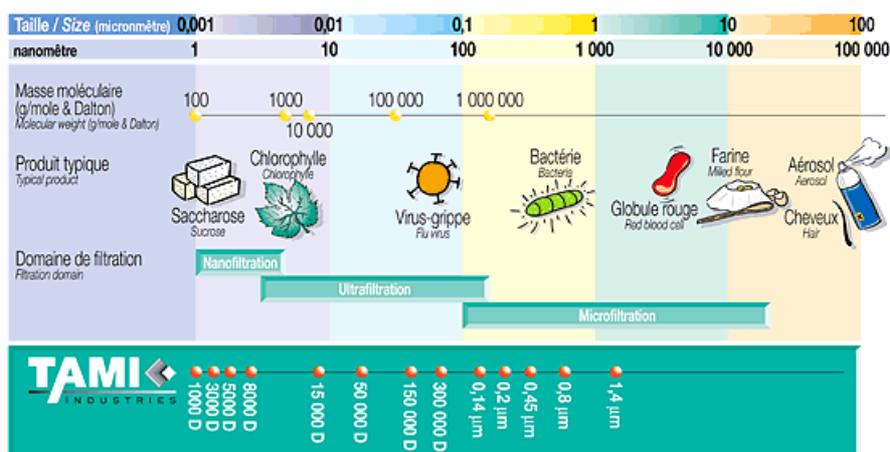
La principal cualidad del tamaño de poro a seleccionar es que debe ser capaz de retener la fracción de proteínas mayoritarias, cuyo peso molecular se muestra en la tabla 6.4, permitiendo en cambio el paso de la fracción de oligosacáridos.

**Tabla 6.4.** Peso molecular de las proteínas mayoritarias de leche de cabra y los oligosacáridos.

Componente	Peso Molecular (Da)
Fracción proteica	
$\alpha_{s1}$ -caseína	23375 <sup>a</sup>
$\alpha_{s2}$ -caseína	25599 <sup>a</sup>
$\beta$ -caseína	23741 <sup>a</sup>
$\kappa$ -caseína	19306 <sup>a</sup>
$\alpha$ -lactalbúmina	14194 <sup>a</sup>
$\beta$ -lactoglobulina	18191 <sup>a</sup>
Oligosacáridos	500-1500

<sup>a</sup> Calculado a partir de la secuencia primaria

Los tamaños de corte existentes para el material y configuración del módulo de membrana previamente seleccionado son los siguientes: 300, 150, 100, 50, 30, 15 y 10 kDa. La figura 6.16 muestra los distintos tamaños de poro suministrados por la casa comercial TAMI Industries S.A. (Nyons, Francia), incluyendo la equivalencia Da – nm y las principales aplicaciones industriales de cada uno de ellos.



**Figura 6.16.** Tamaños de poro suministrados por TAMI Industries (Nyons, Francia).

Si tan solo se tiene en cuenta el factor estérico en la separación, los compuestos capaces de atravesar la membrana son aquellos con un peso molecular entre 5-10 veces inferior al tamaño de corte, debido a la dispersión en el tamaño de los poros de la membrana y al ensuciamiento de la misma (Nyström *et al*, 1998). Por tanto, de acuerdo con los pesos moleculares que aparecen en la tabla 6.4, tan solo serían eficaces para la separación deseada las membranas de 50, 30 y 10 KDa.

Además, el tamaño de poro deberá ser aquél que genere un mayor flujo de permeado a través de la membrana, lo que se traduce en el mayor de los anteriormente detallados, por lo que se seleccionó el tamaño de 50 KDa.

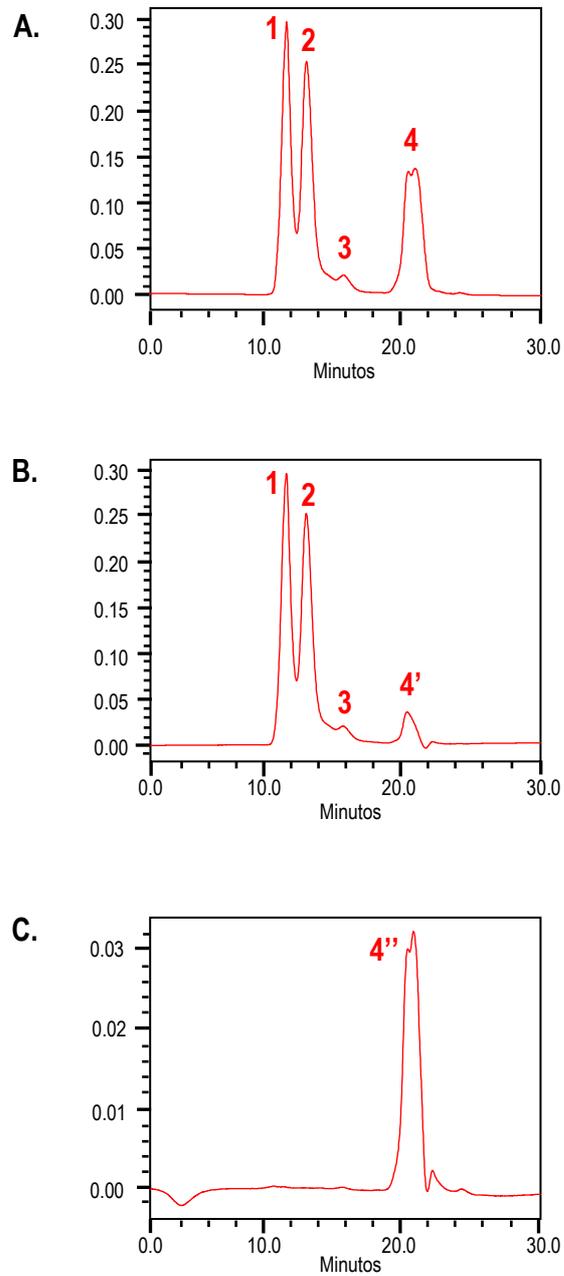
Para comprobar la idoneidad del tamaño de poro seleccionado, se determinó la eficacia de la membrana en la separación determinando la distribución de pesos moleculares de la fracción proteica como se describe en el apartado 5.2.4.2 de la sección de Materiales y Métodos. Este análisis se realizó por los métodos de:

- cromatografía de exclusión por tamaño (figura 6.17);
- electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS o SDS-PAGE (figura 6.18).

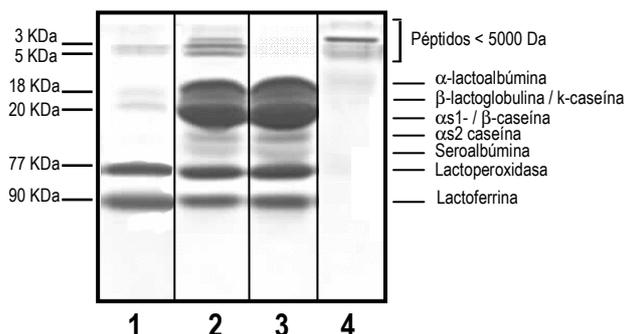
La figura 6.17 representa la distribución de pesos moleculares por cromatografía de exclusión por tamaño de la fracción proteica de la leche caprina (A), y en las corrientes de retenido (B) y permeado (C) tras el proceso de ultrafiltración a través de la membrana de 50 KDa. El pico 1 corresponde a las proteínas séricas de mayor peso molecular, entre ellas la lactoferrina, lactoperoxidasa y seroalbúmina, de peso molecular aproximadamente igual a 90000, 77500 y 66000 Da, respectivamente. El pico 2 engloba la fracción de caseínas, de peso molecular comprendido entre 19000 y 26000 (tabla 6.4), mientras que el pico 3 representa la  $\alpha$ -lactalbúmina y la  $\beta$ -lactoglobulina, de peso molecular 14194 y 18191 (tabla 6.4), respectivamente. Los picos 4, 4' y 4'' se corresponde con las estructuras de bajo peso molecular, en concreto con proteínas menores de 5000 Da.

El cromatograma de la figura 6.17 B, que representa la fracción proteica en la corriente de retenido, muestra como la membrana de 50 KDa es capaz de retener de forma eficaz la fracción de proteínas de peso molecular superior a 14000 Da (correspondiente a los picos 1, 2 y 3), observándose el pico residual de péptidos inferiores a 5000 Da que no atraviesan la misma (pico 4').

Del mismo modo, el cromatograma de la figura 6.17 C revela que la fracción de proteínas mayoritarias, incluyendo caseínas y proteínas séricas, no atraviesan el tamaño de poro seleccionado, pues no aparecen en el cromatograma mencionado.



**Figura 6.17.** Distribución de pesos moleculares de la fracción proteica de leche de cabra por cromatografía de exclusión por tamaño en las distintas fracciones obtenidas: A. Leche de cabra inicial; B. Retenido de 50 KDa; C. Permeado de 50 KDa.



**Figura 6.18.** Distribución de pesos moleculares de la fracción proteica por electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE).

De forma similar, la figura 6.18 muestra la distribución de la fracción proteica por SDS-PAGE tras el proceso de ultrafiltración por la membrana de 50000 Da. En el carril 1 se cargaron algunos patrones de pesos moleculares conocidos, y en los carriles 2, 3 y 4 se cargaron alícuotas de leche de cabra, retenido y permeado, respectivamente, tras el proceso de ultrafiltración. En el carril 4, correspondiente a la corriente de permeado, solo aparecen las bandas correspondientes a proteínas de peso molecular inferior a 5000 Da, lo que revela nuevamente la idoneidad del tamaño de corte seleccionado para la separación de la fracción de proteínas mayoritarias.

#### 6.2.1.2. Selección de las condiciones de operación.

##### *Temperatura de filtración.*

La temperatura de filtración se fijó en base a las evidencias descritas en la literatura y a ensayos previos. La temperatura de filtración debe ser la máxima posible, ya que un aumento de la temperatura conlleva una disminución de la densidad y la viscosidad del fluido, lo que se traduce en el consiguiente aumento de la velocidad de filtración. No obstante, existe un límite impuesto por el material de la membrana y el sustrato a filtrar. Dado que el material cerámico soporta temperaturas muy elevadas, en este caso el límite lo impone el sustrato, en concreto la desnaturalización y/o dimerización de la fracción proteica de la leche de cabra durante el tiempo de operación. En este sentido, numerosos estudios han puesto de manifiesto que en el fraccionamiento de proteínas lácteas, la temperatura debe permanecer por debajo de 50°C a fin de evitar la agregación térmica de la  $\alpha$ -lactoalbúmina (Zydney, 1998), lo que supondría un mayor fouling de la membrana.

Por tanto, tomando como margen superior éste valor, se realizaron varios ensayos de ultrafiltración de leche de cabra desnatada con el módulo de membrana seleccionado en el modo de diafiltración continua (a volumen constante) a varias temperaturas: 45, 35 y 30°C, observándose que, a pesar de no ser temperaturas demasiado

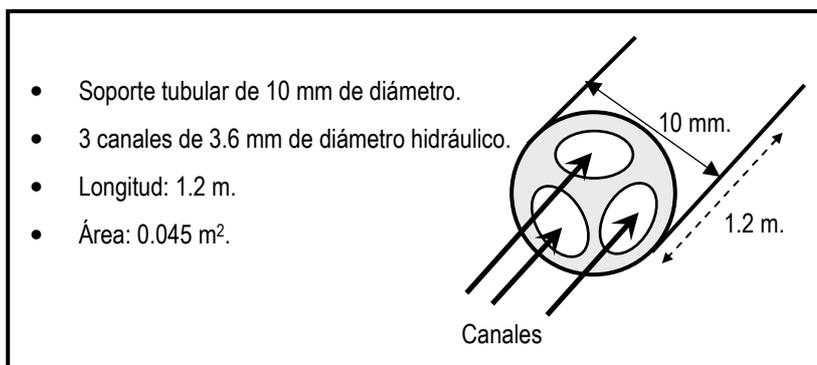
agresivas, valores superiores a 30°C conducían a la desnaturalización de la fracción caseínica por la extremada duración de los ensayos, que superaba las 12-14 horas.

En base a todo ello se determinó 30°C como temperatura de filtración.

**Velocidad de recirculación.**

La capa de polarización se produce por un aumento de la concentración de soluto en las inmediaciones de la pared de la membrana, formándose incluso en ocasiones un gel que interfiere en el proceso global de transferencia de materia. La velocidad de recirculación debe ser tal que sea capaz de generar un régimen de flujo ligeramente turbulento en el interior de los canales de la membrana, de manera que minimice la capa de polarización pero manteniendo el sustrato a filtrar en las proximidades de la pared de la membrana, facilitando de esta forma su paso a través de la misma.

Para la selección de esta velocidad, a continuación, en la figura 6.19, se esquematiza el módulo de membrana tubular seleccionado y se señalan las dimensiones más significativas.



**Figura 6.19.** Esquema y dimensiones del módulo de membrana seleccionado.

Como se observa en la figura anterior, los canales del módulo de membrana no son circulares, con lo que para calcular el módulo de Reynolds deberemos aplicar las ecuaciones correspondientes a conducciones no circulares:

$$Re_h = \frac{d_h \cdot v \cdot \rho}{\mu} = \frac{4 \cdot F_R \cdot \rho}{w_p \cdot \mu} \quad [6.1]$$

donde  $Re_h$  es el módulo adimensional de Reynolds hidráulico,  $v$  la velocidad media de recirculación,  $d_h$  el diámetro hidráulico,  $\rho$  la densidad,  $\mu$  la viscosidad del fluido,  $F_R$  el caudal de retenido y  $w_p$  el perímetro mojado.

Por tanto, de la ecuación anterior resulta:

$$d_h \cdot v = \frac{4 \cdot F_R}{w_p} \quad [6.2]$$

Dado que el área de membrana puede calcularse por:

$$A = w_p \cdot L \quad [6.3]$$

donde A es el área y L la longitud de la membrana, despejando el caudal de retenido de la ecuación [6.2] se obtiene:

$$F_R = \frac{d_h \cdot w_p \cdot v}{4} = \frac{d_h \cdot A \cdot v}{4L} = 121.5 \cdot v \quad (\text{L/h}) \quad [6.4]$$

por lo que dando valores a la velocidad media de recirculación  $v$ , podemos calcular el caudal de retenido  $F_R$  (ecuación 6.4) y el módulo de Reynolds hidráulico (ecuación 6.1). Los valores de la densidad y viscosidad de la leche de cabra a 30°C son 1030 g/L y 1,186 cP respectivamente, con lo que  $Re_h$  se calcularía por:

$$Re_h = 3126.5 \cdot v \quad [6.5]$$

**Tabla 6.5.** Valores del caudal de retenido,  $F_R$ , y el módulo de Reynolds hidráulico,  $Re_h$ , en función de la velocidad media de recirculación,  $v$ .

Velocidad media de recirculación $v$ , m/s	Caudal de retenido $F_R$ , L/h	$Re_h$
0.5	60.8	1563.3
1.0	121.5	3126.5
1.5	182.25	4689.8
2.0	243.0	6253.0
2.5	303.8	7816.3
3.0	364.5	9379.5
3.5	425.3	10942.8
4.0	486.0	12506.0
4.5	546.8	14069.3
5.0	607.5	15632.5

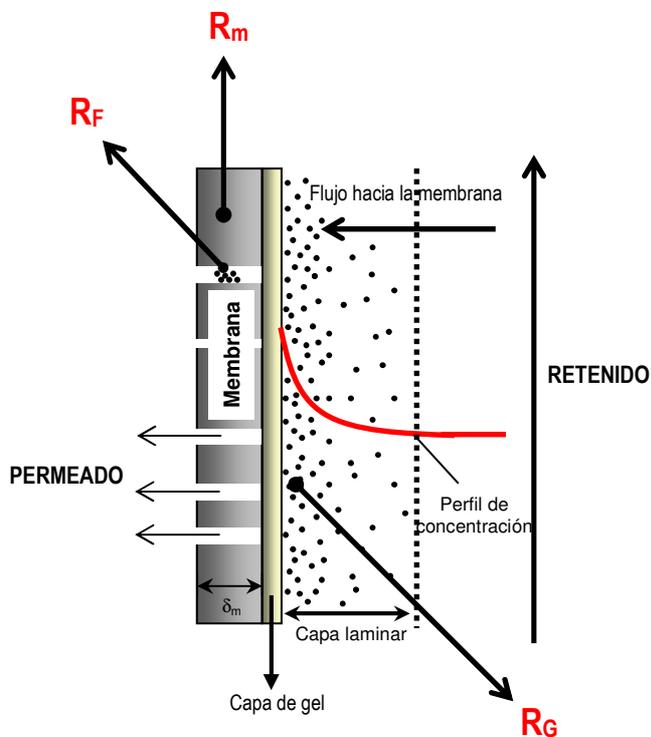
A la vista de los datos calculados, se seleccionó un caudal de retenido de 400 L/h, lo que supone una velocidad media de recirculación de 3.3 m/s y un valor de  $Re_h = 10293.0$ , es decir, un régimen de flujo ligeramente turbulento.

**Presión transmembrana.**

En el proceso de filtración por membranas se puede considerar que el flujo de permeado,  $J$ , es proporcional a la presión transmembrana,  $P_{TM}$ , e inversamente proporcional a un conjunto de resistencias que son las siguientes: la resistencia intrínseca de la propia membrana ( $R_M$ ), la resistencia de fouling o ensuciamiento ( $R_F$ ) y la resistencia de polarización ( $R_G$ ).

$$J = \frac{P_{TM}}{R_M + R_F + R_G} \quad [6.6]$$

Éstas resistencias se representan en la figura 6.20.

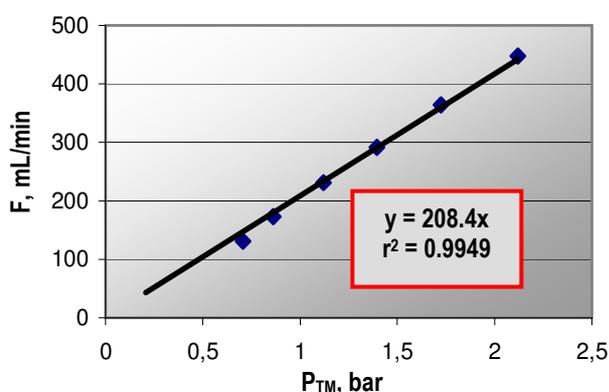


**Figura 6.20.** Conjunto de resistencias que rigen el proceso de filtración tangencial.

La resistencia de membrana es fija y no se puede actuar sobre ella, ya que es intrínseca a la propia membrana.  $R_M$  sirve de referencia para saber si la membrana tras su utilización y limpieza ha recuperado las condiciones originales. Para calcular su valor, se determina la influencia de la presión transmembrana ( $P_{TM}$ ) en el caudal de filtrado ( $F$ ) en la filtración de agua milli-Q a la temperatura de trabajo. En la tabla 6.6 se recogen los datos obtenidos con la membrana de 50 KDa, que se representan en la figura 6.21.

**Tabla 6.6.** Valores de la presión de entrada (Pe), presión de salida (Ps), presión transmembrana (P<sub>TM</sub>), temperatura (T) y caudal de filtrado (F) en la filtración de agua milli-Q a 30°C con la membrana de 50 KDa.

Pe, bar	Ps, bar	P <sub>TM</sub> , bar	T, °C	F, mL/min
1.172	0.241	0.707	29.9	131.2
1.310	0.414	0.862	30.1	173.1
1.551	0.689	1.120	30.0	231.2
1.827	0.965	1.396	30.0	291.2
2.137	1.310	1.724	30.0	363.9
2.517	1.724	2.121	30.0	447.3



**Figura 6.21.** Representación gráfica del caudal de filtrado (F) frente a la presión transmembrana (P<sub>TM</sub>) con agua milli-Q.

En este caso, las resistencias de fouling, R<sub>F</sub>, y de polarización, R<sub>G</sub>, son nulas, por lo que la ecuación [6.6] queda como sigue:

$$J = \frac{P_{TM}}{R_M} \quad [6.7]$$

así, la inversa de la pendiente de la gráfica 6.21, teniendo en cuenta el área de la membrana, nos dará el valor de la resistencia de membrana, R<sub>M</sub>:

$$R_M = 3.599 \times 10^{-3} \text{ bar}/(\text{L}/\text{m}^2\text{h}),$$

valor que se toma como referencia y que se debe alcanzar tras cada ciclo de trabajo y limpieza, y con el que se establece el protocolo de limpieza del módulo de membrana descrito en el apartado 5.2.2 de la sección de Materiales y Métodos.

Por su parte, la resistencia de fouling  $R_F$ , es una medida del ensuciamiento de la membrana a consecuencia de la oclusión de los poros. Esta resistencia es específica de la suspensión a filtrar y se afecta relativamente poco por los parámetros de operación, por lo que en muchas ocasiones  $R_F$  y  $R_M$  se engloban como  $R_{FM}$ .

El único factor que es función de las condiciones de operación y de las propiedades físicas es la resistencia de polarización,  $R_G$ , que generalmente se considera dependiente de la permeabilidad del gel formado y su espesor, es decir, de la presión transmembrana,  $P_{TM}$ , aplicada:

$$R_G = \phi P_{TM} \quad [6.8]$$

siendo  $\phi$  un coeficiente de proporcionalidad.

Por tanto, la ecuación del flujo queda de la siguiente forma:

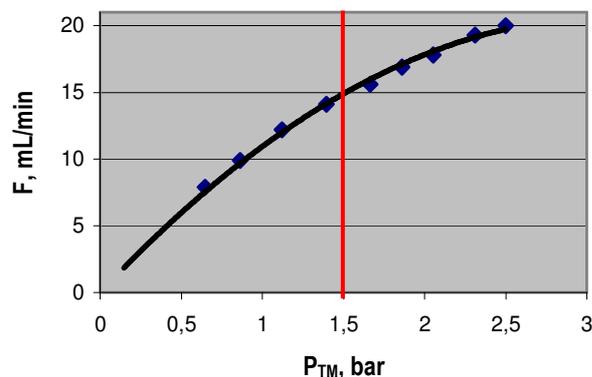
$$J = \frac{P_{TM}}{R_{FM} + \phi P_{TM}} \quad [6.9]$$

Esta ecuación representa los datos típicos de una curva de flujo,  $J$ , frente a presión transmembrana,  $P_{TM}$ , distinguiéndose 2 zonas en función de la presión aplicada. Así, a bajas presiones  $R_G$  es pequeña comparada con  $R_{FM}$  y el flujo será función de la presión. A altas presiones,  $R_G$  se hace relativamente mayor y el flujo es cada vez menos dependiente de la presión.

Por tanto, para establecer la presión transmembrana de trabajo, se determina la influencia de la presión transmembrana,  $P_{TM}$ , en el flujo de filtrado,  $J$ , con la alimentación a filtrar, leche de cabra desnatada a 30°C. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 6.7 y se representan en la figura 6.22.

**Tabla 6.7.** Valores de la presión de entrada ( $P_e$ ), presión de salida ( $P_s$ ), presión transmembrana ( $P_{TM}$ ), temperatura ( $T^a$ ) y caudal de filtrado ( $F$ ) durante la filtración de leche desnatada caprina a 30°C con la membrana de 50 KDa.

Pe, bar	Ps, bar	P <sub>TM</sub> , bar	T <sup>a</sup> , °C	F, mL/min
1.103	0.190	0.647	30.0	7.9
1.310	0.414	0.862	30.1	9.9
1.551	0.689	1.120	29.9	12.2
1.827	0.965	1.396	30.1	14.1
2.086	1.241	1.664	30.0	15.6
2.275	1.448	1.862	30.0	16.9
2.448	1.655	2.052	30.1	17.8
2.689	1.931	2.310	30.0	19.3
2.861	2.137	2.499	29.9	20.0



**Figura 6.22.** Representación del caudal de filtrado ( $F$ ) frente a la presión transmembrana ( $P_{TM}$ ) con leche desnatada caprina a 30°C.

Como puede verse en la figura 6.22, se observan perfectamente diferenciadas las 2 zonas descritas anteriormente, separadas por la línea vertical: la primera, a presiones inferiores a 1.5 bar, donde el proceso está controlado por la presión, y la segunda, a presiones superiores a 1.5 bar, donde es la transferencia de materia la que regula el proceso. En este sentido, se fijó como presión de trabajo 0.90 bar, un valor conservativo dentro de la zona controlada por la presión que nos permitió que el proceso estuviese en todo momento controlado por la misma.

### 6.2.1.3. Proceso de separación.

Para el estudio del proceso se realizaron una serie de experimentos en el modo de diafiltración continua, a volumen constante, hasta un total de 4 ciclos de diafiltración con las condiciones de operación seleccionadas,  $T^a = 30^\circ\text{C}$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s, que se monitorizaron mediante el seguimiento de:

- el volumen y el caudal de filtrado con el tiempo (tablas 6.8 y 6.9);
- la concentración en las corrientes de alimentación, retenido y permeado acumulado cada medio ciclo de diafiltración de cada componente: oligosacáridos, lactosa, calcio, caseína, proteína soluble y proteína total (tablas 6.10 a 6.15).

**Tabla 6.8.** Evolución del volumen de filtrado ( $V_F$ ) con el tiempo para el ensayo de diafiltración continua de leche de cabra a  $T^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s con la membrana de 50 KDa.

t, min	$V_F$ , L	t, min	$V_F$ , L						
0.000	0.00	181.317	1.75	390.683	3.50	626.400	5.25	894.250	7.00
4.383	0.05	186.933	1.80	396.433	3.55	633.550	5.30	902.583	7.05
8.783	0.10	192.550	1.85	402.750	3.60	640.733	5.35	910.950	7.10
13.500	0.15	198.200	1.90	409.100	3.65	647.933	5.40	919.367	7.15
18.267	0.20	203.883	1.95	415.450	3.70	655.167	5.45	927.817	7.20
23.050	0.25	209.567	2.00	421.850	3.75	662.433	5.50	936.283	7.25
27.867	0.30	215.283	2.05	428.267	3.80	669.733	5.55	944.883	7.30
32.717	0.35	221.017	2.10	434.750	3.85	677.033	5.60	953.517	7.35
37.617	0.40	226.750	2.15	441.267	3.90	684.383	5.65	962.217	7.40
42.517	0.45	232.533	2.20	447.817	3.95	691.717	5.70	970.967	7.45
47.517	0.50	238.350	2.25	454.400	4.00	699.117	5.75	979.750	7.50
52.550	0.55	244.200	2.30	461.000	4.05	706.550	5.80	988.533	7.55
57.600	0.60	250.067	2.35	467.650	4.10	714.000	5.85	997.317	7.60
62.683	0.65	255.950	2.40	474.333	4.15	721.483	5.90	1006.067	7.65
67.767	0.70	261.833	2.45	481.050	4.20	728.983	5.95	1014.783	7.70
72.917	0.75	267.733	2.50	487.767	4.25	736.517	6.00	1023.650	7.75
78.050	0.80	273.700	2.55	494.500	4.30	745.600	6.06	1032.617	7.80
83.250	0.85	279.683	2.60	501.283	4.35	751.650	6.10	1041.650	7.85
88.500	0.90	285.683	2.65	508.050	4.40	759.250	6.15	1050.717	7.90
93.750	0.95	291.750	2.70	514.833	4.45	766.900	6.20	1059.783	7.95
99.117	1.00	297.750	2.75	521.650	4.50	774.583	6.25	1068.900	8.00
105.033	1.06	303.800	2.80	528.483	4.55	782.317	6.30		
109.900	1.10	309.867	2.85	535.867	4.60	790.067	6.35		
115.300	1.15	315.950	2.90	542.233	4.65	797.867	6.40		
120.767	1.20	322.050	2.95	549.100	4.70	805.683	6.45		
126.250	1.25	328.183	3.00	556.017	4.75	813.533	6.50		
131.583	1.30	334.383	3.05	562.950	4.80	821.433	6.55		
136.967	1.35	340.600	3.10	569.917	4.85	829.350	6.60		
142.383	1.40	346.817	3.15	576.883	4.90	837.300	6.65		
147.867	1.45	353.067	3.20	583.900	4.95	845.283	6.70		
153.350	1.50	359.217	3.25	590.917	5.00	853.383	6.75		
158.917	1.55	365.383	3.30	598.000	5.05	861.467	6.80		
164.567	1.60	371.550	3.35	605.083	5.10	869.600	6.85		
170.117	1.65	377.750	3.40	612.167	5.15	877.783	6.90		
175.717	1.70	383.950	3.45	619.267	5.20	886.000	6.95		

**Tabla 6.9** Evolución del caudal de filtrado (F) con el tiempo para el ensayo de diafiltración continua de leche de cabra a  $T^a = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s con la membrana de 50 KDa.

t, min	F, mL/min	t, min	F, mL/min						
0.000	-	181.317	8.929	390.683	8.020	626.400	7.009	894.250	6.061
4.383	11.407	186.933	8.902	396.433	8.000	633.550	6.993	902.583	6.000
8.783	11.364	192.550	8.902	402.750	7.916	640.733	6.961	910.950	5.976
13.500	10.601	198.200	8.850	409.100	7.874	647.933	6.944	919.367	5.941
18.267	10.490	203.883	8.798	415.450	7.874	655.167	6.912	927.817	5.917
23.050	10.453	209.567	8.798	421.850	7.813	662.433	6.881	936.283	5.906
27.867	10.381	215.283	8.746	428.267	7.792	669.733	6.849	944.883	5.814
32.717	10.309	221.017	8.721	434.750	7.712	677.033	6.849	953.517	5.792
37.617	10.204	226.750	8.721	441.267	7.673	684.383	6.803	962.217	5.747
42.517	10.204	232.533	8.646	447.817	7.634	691.717	6.818	970.967	5.714
47.517	10.000	238.350	8.596	454.400	7.595	699.117	6.757	979.750	5.693
52.550	9.934	244.200	8.547	461.000	7.576	706.550	6.726	988.533	5.693
57.600	9.901	250.067	8.523	467.650	7.519	714.000	6.711	997.317	5.693
62.683	9.836	255.950	8.499	474.333	7.481	721.483	6.682	1006.067	5.714
67.767	9.836	261.833	8.499	481.050	7.444	728.983	6.667	1014.783	5.736
72.917	9.709	267.733	8.475	487.767	7.444	736.517	6.637	1023.650	5.639
78.050	9.740	273.700	8.380	494.500	7.426	745.600	6.606	1032.617	5.576
83.250	9.615	279.683	8.357	501.283	7.371	751.650	6.612	1041.650	5.535
88.500	9.524	285.683	8.333	508.050	7.389	759.250	6.579	1050.717	5.515
93.750	9.524	291.750	8.242	514.833	7.371	766.900	6.536	1059.783	5.515
99.117	9.317	297.750	8.333	521.650	7.335	774.583	6.508	1068.900	5.484
105.033	9.296	303.800	8.264	528.483	7.317	782.317	6.466		
109.900	9.247	309.867	8.242	535.867	7.314	790.067	6.452		
115.300	9.259	315.950	8.219	542.233	7.225	797.867	6.410		
120.767	9.146	322.050	8.197	549.100	7.282	805.683	6.397		
126.250	9.118	328.183	8.152	556.017	7.229	813.533	6.369		
131.583	9.375	334.383	8.065	562.950	7.212	821.433	6.329		
136.967	9.288	340.600	8.043	569.917	7.177	829.350	6.316		
142.383	9.231	346.817	8.043	576.883	7.177	837.300	6.289		
147.867	9.119	353.067	8.000	583.900	7.126	845.283	6.263		
153.350	9.119	359.217	8.130	590.917	7.126	853.383	6.173		
158.917	8.982	365.383	8.108	598.000	7.059	861.467	6.186		
164.567	8.850	371.550	8.108	605.083	7.059	869.600	6.148		
170.117	9.009	377.750	8.065	612.167	7.059	877.783	6.110		
175.717	8.929	383.950	8.065	619.267	7.042	886.000	6.085		

**Tabla 6.10.** Evolución del contenido en oligosacáridos, balance y % de recuperación (REC) en el ensayo de diafiltración continua de leche de cabra a  $T^a = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s con la membrana de 50 KDa.

$T_D$	Retenido			Permeado			Balance	% REC
	Masa Kg	[OS] mg/Kg	OS total, mg	Masa Kg	[OS] mg/Kg	OS total, mg	Cantidad total OS, mg	
0	2.0	240.0	480.0	0.0	0.0	0.0	480.0	0.00
½	2.0	143.3	286.6	1.0	193.4	193.4	480.0	40.29
1	2.0	87.5	175.0	2.0	152.5	305.0	480.0	63.54
1.5	2.0	61.2	122.4	3.0	119.2	357.6	480.0	74.50
2	2.0	28.3	56.6	4.0	105.9	423.6	480.2	88.25
2.5	2.0	20.4	40.8	5.0	87.8	439.0	479.8	91.46
3	2.0	12.0	24.0	6.0	76.0	456.0	480.0	95.00
3.5	2.0	4.5	9.0	7.0	67.3	471.1	480.1	98.15
4	2.0	1.9	3.8	8.0	59.5	476.0	479.8	99.17

**Tabla 6.11.** Evolución del contenido en lactosa, balance y % de recuperación (REC) en el ensayo de diafiltración continua de leche de cabra a  $T^a = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s con la membrana de 50 KDa.

$T_D$	Retenido			Permeado			Balance	% REC
	Masa Kg	[Lac] g/Kg	Lactosa total, g	Masa Kg	[Lac] g/Kg	Lactosa total, g	Cantidad total Lactosa, g	
0	2.0	44.26	88.52	0.0	0.00	0.0	88.52	0.00
½	2.0	25.96	51.92	1.0	36.59	36.59	88.51	41.34
1	2.0	15.77	31.54	2.0	28.49	56.98	88.52	64.37
1.5	2.0	9.05	18.10	3.0	23.48	70.44	88.54	79.58
2	2.0	4.87	9.74	4.0	19.69	78.76	88.50	88.97
2.5	2.0	3.28	6.56	5.0	16.39	81.95	88.51	92.58
3	2.0	2.03	4.06	6.0	14.08	84.48	88.54	95.41
3.5	2.0	1.16	2.32	7.0	12.32	86.24	88.56	97.42
4	2.0	0.05	0.10	8.0	11.05	88.40	88.50	99.86

**Tabla 6.12.** Evolución del contenido en calcio, balance y % de recuperación (REC) en el ensayo de diafiltración continua de leche de cabra a  $T^a = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s con la membrana de 50 KDa.

$T_D$	Retenido			Permeado			Balance	% REC
	Masa Kg	[Ca] mg/Kg	Calcio total, mg	Masa Kg	[Ca] mg/Kg	Calcio total, mg	Cantidad total Calcio, mg	
0	2.0	1299.83	2599.66	0.0	0.00	0.00	2599.66	0.00
½	2.0	1175.96	2351.92	1.0	247.75	247.75	2599.67	9.53
1	2.0	1118.24	2236.48	2.0	181.59	363.18	2599.66	13.97
1.5	2.0	1074.31	2148.62	3.0	150.35	451.05	2599.67	17.35
2	2.0	1018.29	2036.58	4.0	140.77	563.08	2599.66	21.66
2.5	2.0	1013.35	2026.70	5.0	114.59	572.95	2599.65	22.04
3	2.0	1005.29	2010.58	6.0	98.18	589.08	2599.66	22.66
3.5	2.0	994.50	1989.00	7.0	87.24	610.68	2599.68	23.49
4	2.0	990.60	1981.20	8.0	77.31	618.48	2599.68	23.79

**Tabla 6.13.** Evolución del contenido en proteína total, balance y % de recuperación (REC) en el ensayo de diafiltración continua de leche de cabra a  $T^a = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s con la membrana de 50 KDa.

$T_D$	Retenido			Permeado			Balance	% REC
	Masa Kg	[Prot] g/Kg	Proteína total, g	Masa Kg	[Prot] g/Kg	Proteína total, g	Cantidad total Proteína, g	
0	2.0	32.82	65.64	0.0	0.00	0.00	65.64	0.00
½	2.0	32.01	64.02	1.0	1.61	1.61	65.63	2.45
1	2.0	31.53	63.06	2.0	1.29	2.58	65.64	3.93
1.5	2.0	31.35	62.70	3.0	0.98	2.94	65.64	4.48
2	2.0	31.19	62.38	4.0	0.82	3.28	65.66	5.00
2.5	2.0	31.09	62.18	5.0	0.69	3.45	65.63	5.26
3	2.0	30.99	61.98	6.0	0.61	3.66	65.64	5.58
3.5	2.0	30.97	61.94	7.0	0.53	3.71	65.65	5.65
4	2.0	30.95	61.90	8.0	0.47	3.76	65.66	5.73

**Tabla 6.14.** Evolución del contenido en caseína, balance y % de recuperación (REC) en el ensayo de diafiltración continua de leche de cabra a  $T^a = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s con la membrana de 50 KDa.

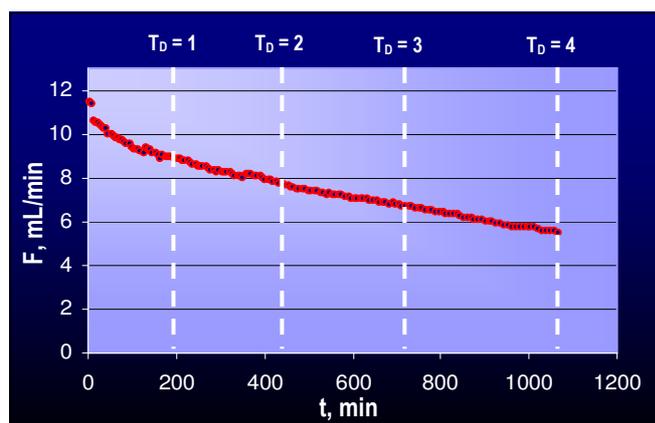
$T_D$	Retenido			Permeado			Balance	% REC
	Masa Kg	[Cas] g/Kg	Caseína total, g	Masa Kg	[Cas] g/Kg	Caseína total, g	Cantidad total Caseína, g	
0	2.0	24.84	49.68	0.0	0.00	0.00	49.68	0.00
½	2.0	24.84	49.68	1.0	0.00	0.00	49.68	0.00
1	2.0	24.84	49.68	2.0	0.00	0.00	49.68	0.00
1.5	2.0	24.84	49.68	3.0	0.00	0.00	49.68	0.00
2	2.0	24.84	49.68	4.0	0.00	0.00	49.68	0.00
2.5	2.0	24.84	49.68	5.0	0.00	0.00	49.68	0.00
3	2.0	24.84	49.68	6.0	0.00	0.00	49.68	0.00
3.5	2.0	24.84	49.68	7.0	0.00	0.00	49.68	0.00
4	2.0	24.84	49.68	8.0	0.00	0.00	49.68	0.00

**Tabla 6.15.** Evolución del contenido en proteína soluble, balance y % de recuperación (REC) en el ensayo de diafiltración continua de leche de cabra a  $T^a = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s con la membrana de 50 KDa.

$T_D$	Retenido			Permeado			Balance	% REC
	Masa Kg	[PSL] g/Kg	PSL total, g	Masa Kg	[PSL] g/Kg	PSL total, g	Cantidad total PSL, g	
0	2.0	2.14	4.28	0.0	0.00	0.00	4.28	0.00
½	2.0	1.20	2.40	1.0	1.87	1.87	4.27	43.69
1	2.0	0.72	1.44	2.0	1.42	2.84	4.28	66.36
1.5	2.0	0.49	0.98	3.0	1.10	3.30	4.28	77.10
2	2.0	0.24	0.48	4.0	0.95	3.80	4.28	88.79
2.5	2.0	0.18	0.36	5.0	0.78	3.90	4.26	91.12
3	2.0	0.09	0.18	6.0	0.68	4.08	4.26	95.33
3.5	2.0	0.09	0.18	7.0	0.59	4.13	4.31	96.50
4	2.0	0.08	0.16	8.0	0.51	4.14	4.24	96.73

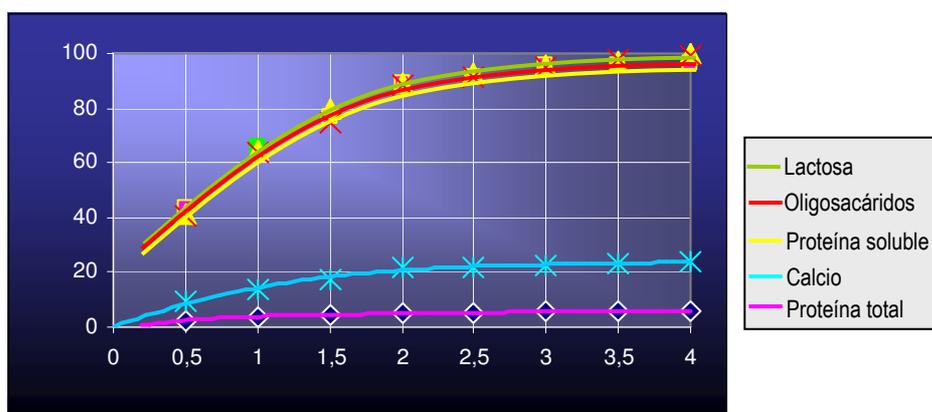
Los resultados obtenidos se discuten a continuación.

En la figura 6.23 se representa el caudal de filtrado  $F$  frente al tiempo de acuerdo con los valores recogidos en la tabla 6.9. Se observa una caída progresiva del caudal de filtrado a medida que transcurre el proceso. Esta caída puede ser debida a la disminución del tamaño de poro por efecto del ensuciamiento de la membrana. En este sentido, el calcio ha sido identificado como una de las mayores causas de fouling en productos lácteos (Cheryan, 1998), no solamente debido a la precipitación en forma de fosfato tricálcico sino también a que en forma iónica puede actuar como puente salino entre la membrana y las proteínas.



**Figura 6.23.** Evolución del caudal de filtrado ( $F$ ) frente al tiempo para el ensayo de diafiltración continua de leche de cabra a  $T^a = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s con la membrana de 50 KDa.

En las tablas 6.10 a 6.15 se resumen las composiciones de las corrientes de retenido y filtrado acumulado cada medio ciclo de diafiltración. Para comprobar el comportamiento de cada componente a medida que transcurre el proceso, se puede representar el porcentaje de recuperación (REC) en la corriente de permeado de cada uno de ellos frente al número de diavolumenes o tasa de diafiltración  $T_D$  (figura 6.24).



**Figura 6.24.** Evolución del porcentaje recuperado (REC) vs.  $T_D$ .

En la figura 6.24 se observa que en los 4 ciclos de diafiltración el 5.73% de la proteína total atraviesa la membrana, lo que se corresponde con la fracción de proteína soluble filtrada, confirmándose el hecho de que ni la fracción caseínica ni las proteínas séricas mayoritarias,  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina, han atravesado la membrana.

En cambio, con respecto al calcio, en los 4 ciclos de diafiltración el 23.79 % atraviesa la membrana, lo que concuerda con el hecho de que aproximadamente el 34% del calcio presente en leche de cabra es soluble y no está asociado a las caseínas.

Por su parte, en el tercer ciclo de diafiltración más del 95% de la lactosa, oligosacáridos y proteína soluble, han atravesado la membrana. Estas tres fracciones muestran un comportamiento similar debido a que el peso molecular de todos ellos es significativamente inferior al tamaño de poro de la membrana, lo que se traduce en un índice de rechazo muy próximo a cero.

A continuación se procede al cálculo del índice de rechazo (IR) de cada uno de los componentes analizados.

#### 6.2.1.4. Cálculo de los índices de rechazo (IR).

En síntesis, la diafiltración continua se puede definir como el proceso de filtración en el que se añade agua al retenido a la misma velocidad que tiene lugar el flujo de filtrado hacia el exterior. Por tanto, la concentración de soluto en el retenido ( $C_R$ ) vendrá dada por el balance correspondiente al retenido:

$$\text{Entrada de soluto} + \text{Generación de soluto} = \text{Salida de soluto} + \text{Acumulación de soluto} \quad [6.10]$$

La entrada es nula, ya que solo introducimos agua y no soluto. En lo que se refiere a la generación, también es nula, ya que no hay ninguna reacción química que origine ni consuma soluto. Por tanto, el balance queda como sigue:

$$0 = \text{Salida de soluto} + \text{Acumulación de soluto} \quad [6.11]$$

o lo que es lo mismo:

$$0 = F \cdot C_F + V_o \cdot \frac{dC_R}{dt} \quad [6.12]$$

donde F es el caudal de filtrado,  $V_o$  el volumen inicial de sustrato y  $C_F$  y  $C_R$  la concentración instantánea de soluto en el filtrado y retenido, respectivamente. Si introducimos el índice o coeficiente de rechazo IR, que se define como:

$$IR = 1 - \frac{C_F}{C_R} \quad [6.13]$$

sustituyendo en la ecuación anterior nos queda:

$$F \cdot C_R \cdot (1 - IR) = -V_o \cdot \frac{dC_R}{dt} \quad [6.14]$$

Separando variables e integrando:

$$\int_{C_{RO}}^{C_R} \frac{dC_R}{C_R} = -\int_0^t \frac{F \cdot (1 - IR)}{V_o} \cdot dt \quad [6.15]$$

se llega a:

$$\ln \frac{C_{RO}}{C_R} = \frac{F \cdot (1 - IR)}{V_o} \cdot t \quad [6.16]$$

donde  $C_R$  es la concentración de soluto en el retenido en el instante  $t$  y  $C_{RO}$  es la concentración inicial de soluto en el retenido en el instante  $t = 0$ .

Si aplicamos la definición de la tasa de diafiltración o número de diavolumenes  $T_D$ :

$$T_D = \frac{V_{FA}}{V_o} \quad [6.17]$$

donde  $V_{FA}$  es el volumen de filtrado acumulado, se obtiene:

$$\ln \frac{C_{RO}}{C_R} = \frac{F \cdot (1 - IR) \cdot t}{V_o} = \frac{V_{FA} \cdot (1 - IR)}{V_o} = T_D \cdot (1 - IR) \quad [6.18]$$

Finalmente, se obtiene la expresión de la concentración de soluto en el retenido:

$$C_R = C_{RO} \cdot \exp[-T_D \cdot (1 - IR)] \quad [6.19]$$

Por otro lado, la concentración de soluto en el filtrado acumulado  $C_{FA}$  vendrá dada por:

$$V_o \cdot C_{RO} = V_o \cdot C_R + V_{FA} \cdot C_{FA} \quad [6.20]$$

de donde:

$$C_{FA} = \frac{V_o \cdot (C_{RO} - C_R)}{V_{FA}} = \frac{C_{RO} \cdot (1 - \exp[-T_D \cdot (1 - IR)])}{T_D} \quad [6.21]$$

Por tanto, para la estimación del índice de rechazo IR se puede proceder de 3 formas diferentes:

- A partir de valores de la concentración de soluto en el retenido frente al número de diavolumenes, utilizando la siguiente expresión:

$$\ln \frac{C_{RO}}{C_R} = T_D \cdot (1 - IR) \quad [6.22]$$

de manera que representando el  $\ln [C_{RO}/C_R]$  frente a  $T_D$ , se obtiene una recta que pasa por el origen de pendiente  $(1 - IR)$ .

- Mediante la expresión:

$$\ln C_R = \ln C_{RO} - T_D \cdot (1 - IR) \quad [6.23]$$

con lo que representando  $\ln C_R$  frente a  $T_D$ , obtendríamos una recta de ordenada en el origen  $\ln C_{RO}$  y pendiente  $-(1 - IR)$ .

- Y por último, también se podría obtener el valor del índice de rechazo a partir de valores de la concentración de soluto en el filtrado acumulado frente al número de diavolumenes, haciendo uso de la siguiente expresión:

$$\ln \left[ 1 - \frac{T_D \cdot C_{FA}}{C_{RO}} \right] = -T_D \cdot (1 - IR) \quad [6.24]$$

luego, representando  $\ln[1 - T_D \cdot C_{FA}/C_{RO}]$  frente a  $T_D$ , se obtiene una recta que pasa por el origen de pendiente  $-(1 - IR)$ .

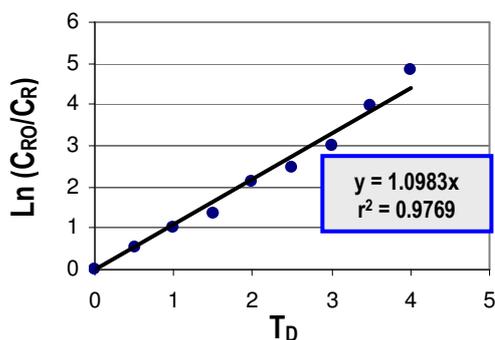
A continuación se procede al cálculo del índice de rechazo para cada uno de los componentes:

- **Oligosacáridos:**

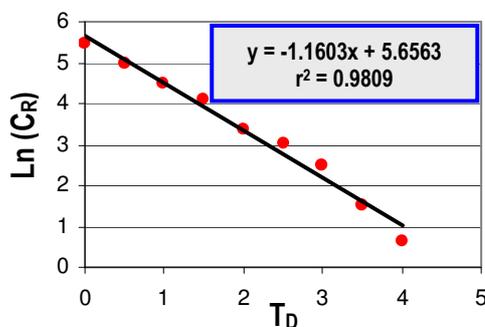
Los valores calculados, tabla 6.16, se representan en las figuras 6.25 a 6.27.

**Tabla 6.16.** Valores obtenidos para el cálculo del índice de rechazo para los oligosacáridos.

$T_D$	$C_R$ , mg/Kg	$C_{FA}$ , mg/Kg	$\ln (C_{RO}/C_R)$	$\ln C_R$	$\ln [1-(T_D \cdot C_{FA}/C_{RO})]$
0	240.0	0.0	0.0000	5.4806	0.0000
½	143.3	193.4	0.5157	4.9649	-0.5157
1.0	87.5	152.5	1.0090	4.4716	-1.0090
1.5	61.2	119.2	1.3665	4.1141	-1.3665
2.0	28.3	105.9	2.1378	3.3429	-2.1413
2.5	20.4	87.8	2.4651	3.0155	-2.4602
3.0	12.0	76.0	2.9957	2.4849	-2.9957
3.5	4.5	67.3	3.9766	1.5041	-3.9877
4.0	1.9	59.5	4.8388	0.6419	-4.7875



**Figura 6.25.**  $\ln (C_{RO}/C_R)$  vs.  $T_D$  para los oligosacáridos.



**Figura 6.26.**  $\ln (C_R)$  vs.  $T_D$  para los oligosacáridos.

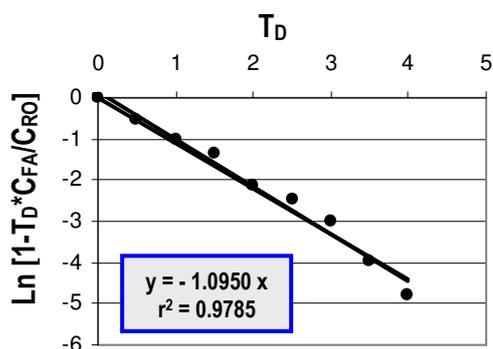


Figura 6.27. Ln [1-T<sub>D</sub>\*C<sub>FA</sub>/C<sub>RO</sub>] vs. T<sub>D</sub> para los oligosacáridos.

Por tanto, las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

1.  $\text{Ln} (C_{RO}/C_R) = 1.0983 T_D$
2.  $\text{Ln} (C_R) = -1.1603 T_D + 5.6563$
3.  $\text{Ln} [1-T_D*C_{FA}/C_{RO}] = -1.0950 T_D$

con lo que el índice de rechazo para los oligosacáridos es IR = 0.

- **Lactosa:**

Los datos obtenidos se resumen en la tabla 6.17 y en las figuras 6.28 a 6.30.

Tabla 6.17. Valores obtenidos para el cálculo del índice de rechazo para la lactosa.

T <sub>D</sub>	C <sub>R</sub> , g/Kg	C <sub>FA</sub> , g/Kg	Ln (C <sub>RO</sub> /C <sub>R</sub> )	Ln C <sub>R</sub>	Ln [1-(T <sub>D</sub> *C <sub>FA</sub> /C <sub>RO</sub> )]
0	44.26	0.00	0.0000	3.7901	0.0000
½	25.96	36.59	0.5335	3.2566	-0.5333
1.0	15.77	28.49	1.0320	2.7581	-1.0320
1.5	9.05	23.48	1.5873	2.2028	-1.5884
2.0	4.87	19.69	2.2070	1.5831	-2.2049
2.5	3.28	16.39	2.6022	1.1878	-2.6007
3.0	2.03	14.08	3.0820	0.7080	-3.0870
3.5	1.16	12.32	3.6417	0.1484	-3.6591
4.0	0.05	11.05	6.7858	-2.9957	-6.6035

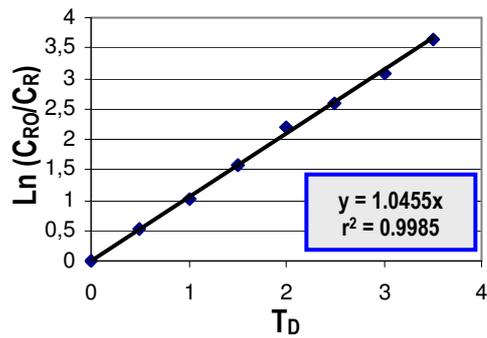


Figura 6.28.  $\ln(C_{RO}/C_R)$  vs.  $T_D$  para la lactosa.

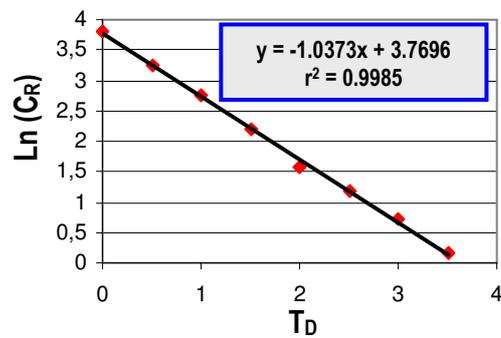


Figura 6.29.  $\ln(C_{RO})$  vs.  $T_D$  para la lactosa.

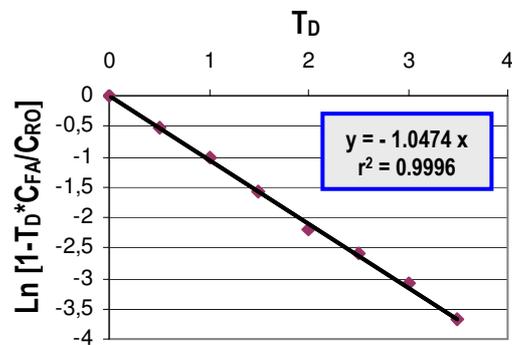


Figura 6.30.  $\ln[1-T_D \cdot C_{FA}/C_{RO}]$  vs.  $T_D$  para la lactosa.

Las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

1.  $\ln(C_{RO}/C_R) = 1.0455 T_D$
2.  $\ln(C_R) = -1.0373 T_D + 3.7696$
3.  $\ln[1-T_D \cdot C_{FA}/C_{RO}] = -1.0474 T_D$

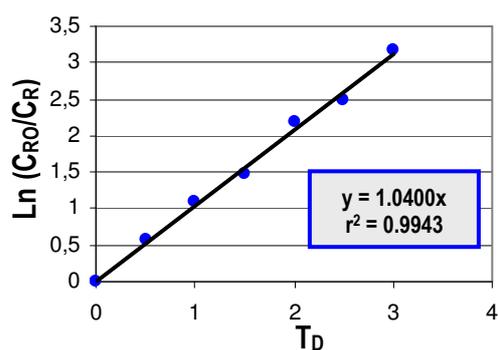
con lo que se comprueba que el índice de rechazo para la lactosa es  $IR = 0$ .

- **Proteína soluble.**

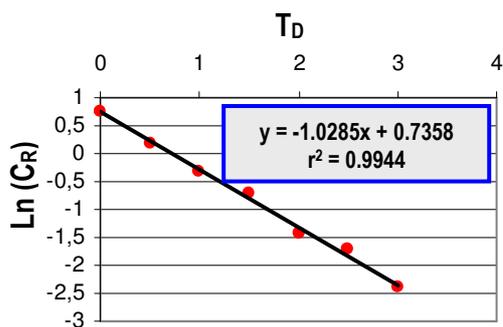
Para la proteína soluble se han obtenido los siguientes valores:

**Tabla 6.18.** Valores obtenidos para el cálculo del índice de rechazo para la proteína soluble.

$T_D$	$C_R$ , g/Kg	$C_{FA}$ , g/Kg	$\ln(C_{RO}/C_R)$	$\ln C_R$	$\ln [1-(T_D \cdot C_{FA}/C_{RO})]$
0	2.14	0.00	0.0000	0.7608	0.0000
½	1.20	1.87	0.5785	0.1823	-0.5743
1.0	0.72	1.42	1.0893	-0.3285	-1.0893
1.5	0.49	1.10	1.4742	-0.7133	-1.4742
2.0	0.24	0.95	2.1879	-1.4271	-2.1879
2.5	0.18	0.78	2.4756	-1.7148	-2.4215
3.0	0.09	0.68	3.1688	-2.4079	-3.0634
3.5	0.09	0.59	3.1688	-2.4079	-3.3511
4.0	0.08	0.51	3.2865	-2.5257	-3.0634



**Figura 6.31.**  $\ln(C_{RO}/C_R)$  vs.  $T_D$  para la proteína soluble.



**Figura 6.32.**  $\ln(C_R)$  vs.  $T_D$  para la proteína soluble.

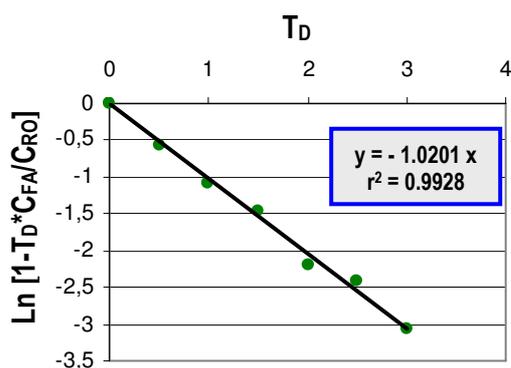


Figura 6.33. Ln [1-T<sub>D</sub>\*C<sub>F<sub>A</sub>]/C<sub>R<sub>O</sub>]</sub> vs. T<sub>D</sub> para la proteína soluble.</sub>

Así, las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

1.  $\text{Ln} (C_{RO}/C_R) = 1.0400 T_D$
2.  $\text{Ln} (C_R) = -1.0285 T_D + 0.7358$
3.  $\text{Ln} [1-T_D*C_{FA}/C_{RO}] = -1.0201 T_D$

con lo que el índice de rechazo para la proteína soluble es IR = 0.

- **Caseína.**

De acuerdo con los datos de la tabla 6.14 correspondiente al balance de caseína, se observa que no aparece caseína en el filtrado en ningún momento del proceso, por lo que su índice de rechazo es IR = 1.

- **Calcio.**

Para el cálculo del índice de rechazo del calcio, se tiene en cuenta la existencia de dos tipos de calcio, el soluble, que es el que atraviesa la membrana, y el asociado a la caseína, que supone aproximadamente el 66 % y cuyo índice de rechazo es 1, al igual que el de la caseína, como se ha demostrado anteriormente. Por tanto, el valor del índice de rechazo para el calcio se ha calculado corrigiendo los valores de calcio total determinado en retenido (tabla 6.12) con el porcentaje que se encuentra unido a la caseína. Los valores y gráficas obtenidos se recogen en la tabla 6.19 y se representan en las figuras 6.34 y 6.35:

Tabla 6.19. Valores obtenidos para el cálculo del índice de rechazo para el calcio.

T <sub>D</sub>	C <sub>R</sub> corregido, mg/Kg	C <sub>FA</sub> , g/Kg	Ln (C <sub>RO</sub> /C <sub>R</sub> )	Ln C <sub>R</sub>
0	883.88	0.00	0.0000	6.7843
½	551.91	247.75	0.4709	6.3134
1.0	397.22	181.59	0.7998	5.9845

1.5	279.49	150.35	1.1514	5.6330
2.0	129.36	140.77	1.9217	4.8626
2.5	116.12	114.59	2.0297	4.7546
3.0	94.52	98.10	2.2355	4.5488
3.5	65.60	87.24	2.6008	4.1836
4.0	55.15	77.31	2.7743	4.0100

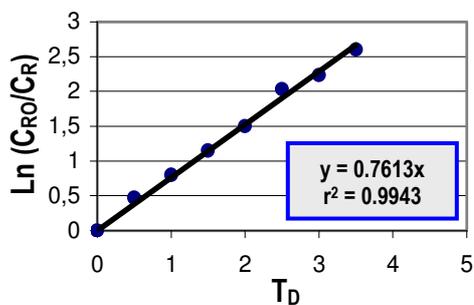


Figura 6.34.  $\ln(C_{RO}/C_R)$  vs.  $T_D$  para el calcio.

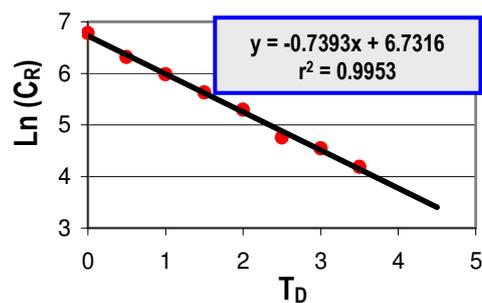


Figura 6.35.  $\ln(C_R)$  vs.  $T_D$  para el calcio.

Por tanto, las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

1.  $\ln(C_{RO}/C_R) = 0.7613 T_D$
2.  $\ln(C_R) = -0.7393 T_D + 6.7316$

con lo que el índice de rechazo para el calcio es  $IR = 0.26$ .

## 6.2.2. MODELIZACIÓN.

En este apartado se va a desarrollar un modelo dinámico que permita la predicción de la variación temporal del volumen de filtrado y de la concentración de oligosacáridos en el tanque de retenido. Dicho modelo consistirá en un sistema de ecuaciones diferenciales y algebraicas que engloben balances de materia, ecuaciones para el cálculo del flujo a través de la membrana, del fouling y de la transmisión de diferentes especies.

En primer lugar, el balance volumétrico resulta:

$$\frac{dV_F}{dt} = F \quad [6.25]$$

donde  $V_F$  es el volumen de filtrado y  $F$  el caudal de filtrado.

El flujo a través de la membrana ( $J$ ) se define como el caudal por unidad de área:

$$J = \frac{F}{A} \quad [6.26]$$

donde  $A$  es el área de la membrana.

Suponiendo régimen de circulación laminar a través de los poros de la membrana, el flujo a través de los poros puede calcularse mediante la ecuación de Hagen-Poiseuille:

$$J = \frac{P_{TM} \cdot \pi R^4}{8\mu L_p} \quad [6.27]$$

donde  $P_{TM}$  es la presión transmembrana,  $R$  es el radio de poro,  $\mu$  es la viscosidad del filtrado y  $L_p$  es la longitud de poro.

Manteniendo constante la presión transmembrana, definimos el coeficiente de flujo  $\alpha$  como:

$$\alpha = \frac{P_{TM} \cdot \pi}{8\mu L_p} \quad [6.28]$$

De esta forma, se puede expresar el flujo como:

$$J = \alpha R^4 \quad [6.29]$$

Para el cálculo de la influencia del fouling, se asume el modelo de bloqueo interno de poros (Jaffrin *et al*, 1997):

$$2\pi NLR \frac{dR}{dt} = -\gamma \cdot J \quad [6.30]$$

donde N es el número de poros por unidad de área y  $\gamma$  es un factor de fouling que depende de la composición del retenido. Como ya se ha indicado, el calcio ha sido identificado como una de las mayores causas de fouling en productos lácteos (Cheryan, 1998), no solamente debido a la precipitación en forma de fosfato tricálcico sino también a que en forma iónica puede actuar como puente salino entre la membrana y las proteínas. Por tanto, el factor de fouling se considera proporcional a la concentración de calcio en el retenido:

$$\gamma = C \cdot C_R^{Ca} \quad [6.31]$$

siendo C un coeficiente de proporcionalidad y  $C_R^{Ca}$  la concentración de calcio en la corriente de retenido. Por lo que:

$$\frac{dR}{dt} = -\frac{C \cdot C_R^{Ca} \cdot J}{2\pi NLR} \quad [6.32]$$

Definiendo el coeficiente de fouling,  $\beta$ , como:

$$\beta = \frac{C}{2\pi NL} \quad [6.33]$$

la ecuación anterior queda como sigue:

$$\frac{dR}{dt} = -\beta \frac{C_R^{Ca} \cdot J}{R} \quad [6.34]$$

Por otra parte, de un balance de oligosacáridos en el retenido resulta:

$$\frac{dC_R^{OS}}{dt} = -\frac{F \cdot S_{OS} \cdot C_R^{OS}}{V_R} \quad [6.35]$$

donde  $C_R^{OS}$  es la concentración de oligosacáridos en el retenido,  $V_R$  es el volumen de retenido y  $S_{OS}$  es el coeficiente de transmisión para los oligosacáridos, definido como:

$$S_{OS} = \frac{C_F^{OS}}{C_R^{OS}} \quad [6.36]$$

donde  $C_F^{OS}$  es la concentración de oligosacáridos en el filtrado.

Análogamente, un balance para el calcio da:

$$\frac{dC_R^{Ca}}{dt} = -\frac{F \cdot S_{Ca} \cdot C_R^{Ca}}{V_R} \quad [6.37]$$

siendo  $S_{Ca}$  el coeficiente de transmisión para el calcio, definido como:

$$S_{Ca} = \frac{C_F^{Ca}}{C_R^{Ca}} \quad [6.38]$$

Definiendo  $\lambda_{OS}$  y  $\lambda_{Ca}$  como el cociente entre el radio efectivo y el radio de poro para oligosacáridos y calcio, respectivamente:

$$\lambda_{OS} = \frac{R_{OS}}{R} \quad [6.39]$$

$$\lambda_{Ca} = \frac{R_{Ca}}{R} \quad [6.40]$$

se calcula el coeficiente de transmisión para cada especie por la expresión (Membrane Handbook, 1992):

$$S_{OS} = (1 - \lambda_{OS} \cdot (2 - \lambda_{OS})^2) \exp(-0.7146 \lambda_{OS}^2) \quad [6.41]$$

$$S_{Ca} = (1 - \lambda_{Ca} \cdot (2 - \lambda_{Ca})^2) \exp(-0.7146 \lambda_{Ca}^2) \quad [6.42]$$

Por tanto, el modelo dinámico del proceso de ultrafiltración de leche de cabra consta de 10 ecuaciones independientes, 4 diferenciales y 6 algebraicas. Fijados los valores del volumen de retenido ( $V_R$ ) y área de membrana ( $A$ ), y determinados experimentalmente la variación del volumen de filtrado ( $V_F$ ) y de las concentraciones de oligosacáridos ( $C_R^{OS}$ ) y calcio ( $C_R^{Ca}$ ) en el retenido con el tiempo, se pueden estimar los valores de los siguientes parámetros del modelo:

- coeficiente de flujo,  $\alpha$
- coeficiente de fouling,  $\beta$
- radio efectivo de la molécula de oligosacáridos,  $R_{OS}$
- radio efectivo para el calcio,  $R_{Ca}$

- y el radio inicial de poro, R

Para ello, con el software Berkeley Madonna (Modelling and Analysis of Dynamic Systems, versión 8.0.1 para Windows, 2003) se minimiza la raíz cuadrática media, rms:

$$rms = \sqrt{\frac{\sum_j \sum_i p_j (x_{exp_i} - x_{cal_i})^2}{n}} \quad [6.43]$$

donde el índice  $j$  representa las variables experimentales y el índice  $i$ , las parejas de datos. Por su parte,  $p_j$  son los pesos para cada serie. En este caso, se han tomado  $P_{VF} = 25$ ,  $P_C = 5$  y  $P_{Ca} = 1$  atendiendo al orden de magnitud de los datos experimentales.

Los valores obtenidos para los parámetros han sido:

- $\alpha = 4.98 \times 10^{-2} \text{ L}/(\text{h m}^2 \text{ nm}^4)$
- $\beta = 2.15 \times 10^{-5} (\text{nm}^2 \text{ m}^2) / \text{mg Ca}$
- $R_{OS} = 0.562 \text{ nm}$
- $R_{Ca} = 2.884 \text{ nm}$
- $R = 4.299 \text{ nm}$

con un valor mínimo de rms = 43.12.

Los valores obtenidos por simulación de volumen de filtrado ( $V_F$ ) y concentración de oligosacáridos y calcio en la corriente de retenido se recogen en los apéndices 11.7 y 11.8 y se representan, junto con los datos experimentales, en las figuras 6.36 a 6.38.

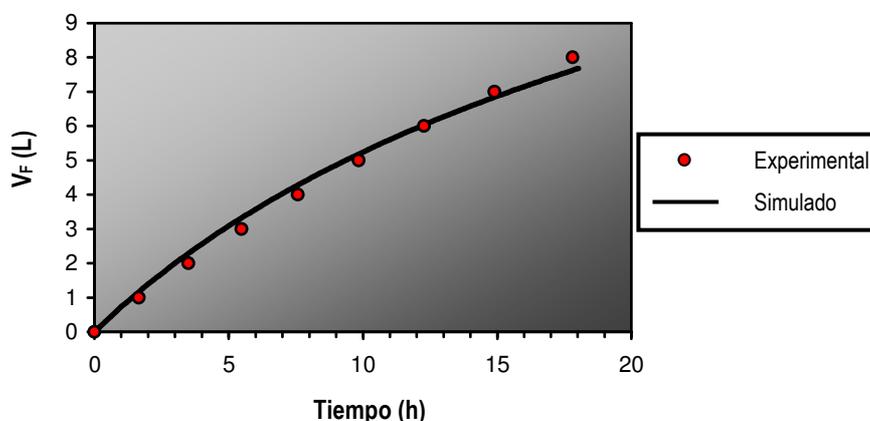


Figura 6.36. Valores de  $V_F$  simulados y experimentales.

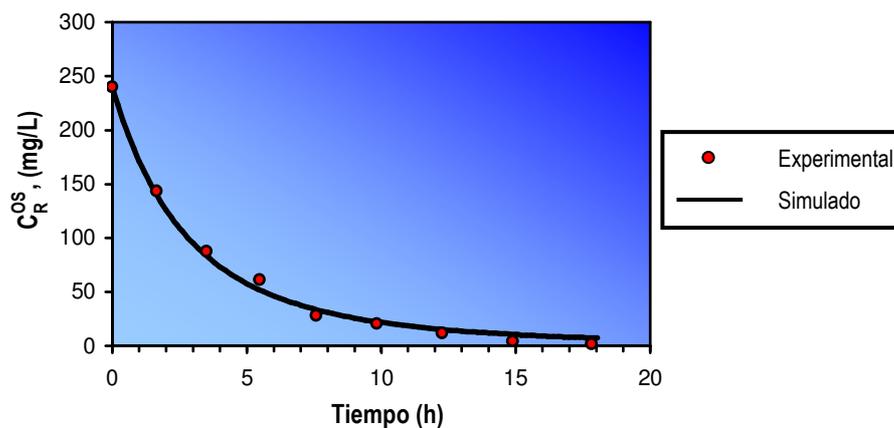


Figura 6.37. Valores de concentración de oligosacáridos en el retenido,  $C_R^{OS}$ , simulados y experimentales.

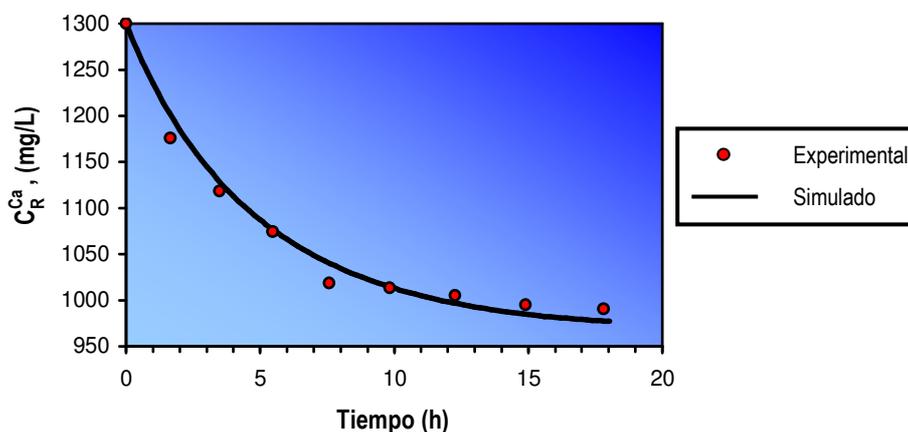


Figura 6.38. Valores de concentración de calcio en el retenido,  $C_R^{Ca}$ , simulados y experimentales.

Como puede observarse en estas tres figuras, existe una buena concordancia entre datos experimentales y valores simulados por el modelo teórico desarrollado, lo que valida el modelo propuesto para el proceso de ultrafiltración de leche de cabra.

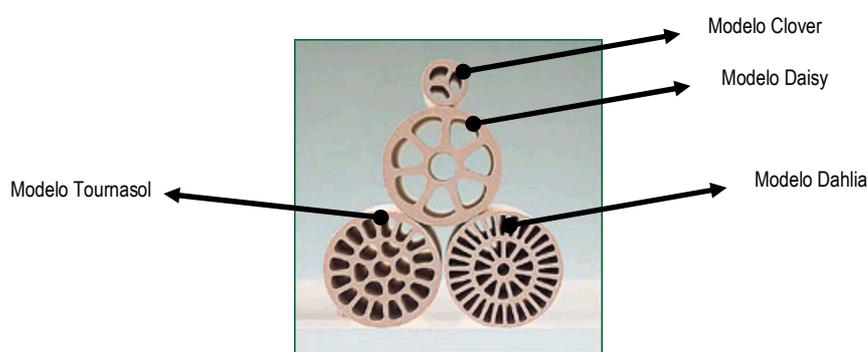
### 6.2.3. SIMULACIÓN Y OPTIMIZACIÓN.

Una vez determinados los parámetros del modelo, se realiza la simulación de un caso industrial de obtención de oligosacáridos de leche de cabra. Para ello se considera:

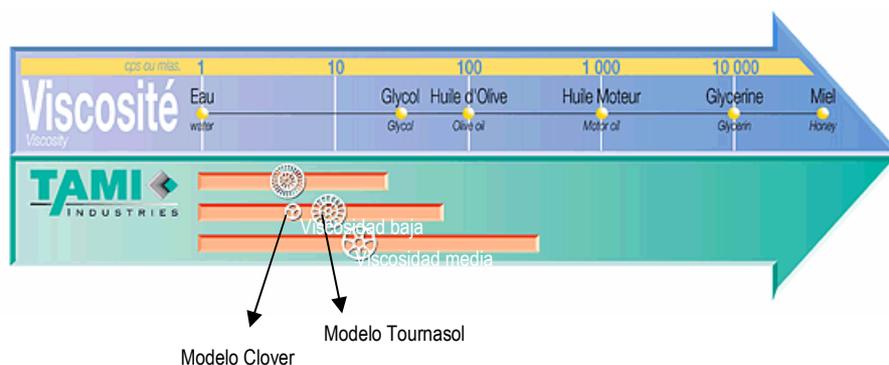
- Un volumen de leche de cabra inicial a tratar de 1000 L.

- La recuperación de oligosacáridos en el filtrado no debe ser inferior al 95%, libre de caseínas y proteínas séricas.
- La utilización de módulos de membrana industriales disponibles en el mercado.

Las siguientes figuras muestran los diferentes módulos cerámicos tubulares suministrados por la casa comercial TAMI Industries S.A. (figura 6.39), así como la equivalencia entre el módulo de membrana a escala de laboratorio utilizado en esta investigación, modelo Clover, y el correspondiente a nivel industrial para fluidos de viscosidad media como la leche, modelo Tournasol (figura 6.40).



**Figura 6.39.** Módulos de membrana cerámicos tubulares suministrados por TAMI Industries S.A. (Nyons, Francia).



**Figura 6.40.** Equivalencia entre el módulo de membrana de laboratorio utilizado y el correspondiente a nivel industrial para fluidos de viscosidad media.

Por tanto, el módulo industrial para la membrana utilizada en esta investigación es el módulo de membrana cerámico Tournasol, con capacidad para trabajar con soluciones de amplio rango de viscosidades, 25 mm de diámetro exterior, 23 canales de 3.5 mm de diámetro hidráulico, 0.35 m<sup>2</sup> de superficie de membrana y 1.2 m de longitud. El

número de módulos que componen las carcasas comercialmente disponibles y su superficie de filtración se muestran en la tabla 6.20.

**Tabla 6.20.** Número de módulos y superficie de filtración de las carcasas comercialmente disponibles.

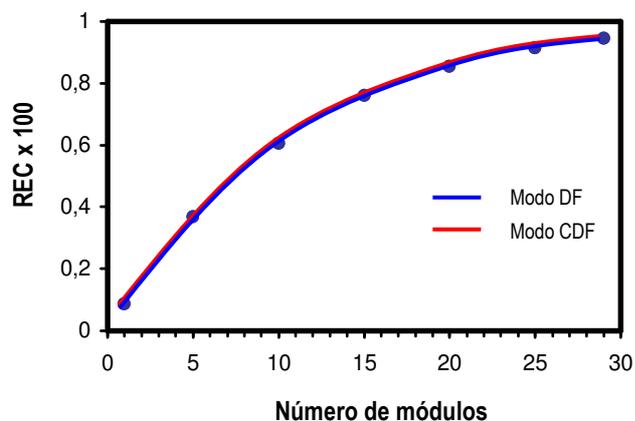
Número de módulos	Área de filtración, m <sup>2</sup>
1	0.35
3	1.05
7	2.45
19	6.65
37	12.95
55	19.25
99	34.65

Para la simulación del proceso se ha empleado el software gPROMS (Introductory User Guide, Process Systems Engineering Ltd., 2003).

Mediante simulaciones sucesivas, se comprueba que para obtener la recuperación deseada, es necesario emplear un área mínima de membrana de 10.5 m<sup>2</sup> correspondiente a 30 módulos. En la tabla 6.21 y en la figura 6.41 se recoge la máxima recuperación alcanzable (REC) con áreas menores a la mínima para los dos casos extremos de operación: diafiltración continua desde el inicio (modo DF) y concentración hasta el máximo factor que permita las condiciones fluidodinámicas del sistema, seguida de diafiltración continua (modo CDF). Experimentaciones previas pusieron de manifiesto que el máximo factor de concentración permisible es 4 para la filtración de leche de cabra desnatada a 30°C. Por encima de este factor se observó la desestabilización de la fracción caseínica, que modifica extremadamente las propiedades fluidodinámicas del sistema dando lugar a una caída drástica de la velocidad de filtración y a un ensuciamiento irreversible de la membrana.

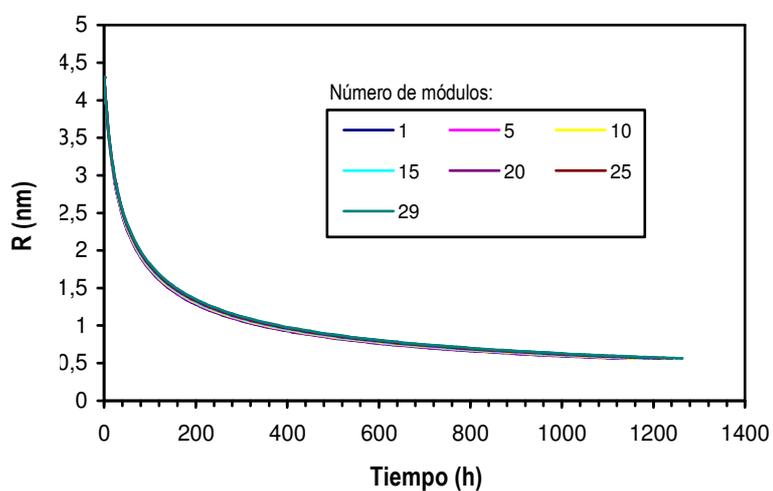
**Tabla 6.21.** Máxima recuperación alcanzable de oligosacáridos para áreas inferiores a la mínima para los dos modos extremos de operación: DF y CDF.

Número de módulos	Área de filtración, m <sup>2</sup>	% de recuperación (REC)	
		Modo DF	Modo CDF
1	0.35	8.6625	8.6626
5	1.75	36.8065	36.8064
10	3.50	60.6716	60.6719
15	5.25	75.9178	75.9154
20	7.00	85.5035	85.5018
25	8.75	91.4305	91.4275
29	10.15	94.4494	94.4455

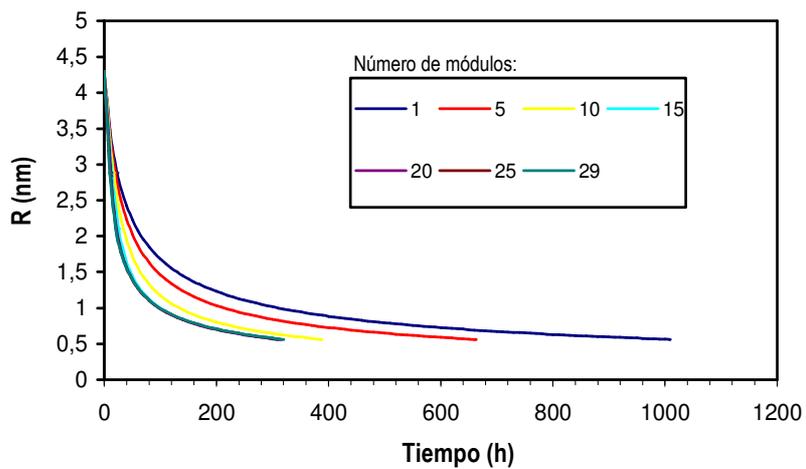


**Figura 6.41.** Máxima recuperación alcanzable de oligosacáridos para áreas inferiores a la mínima para los dos modos extremos de operación: DF y CDF.

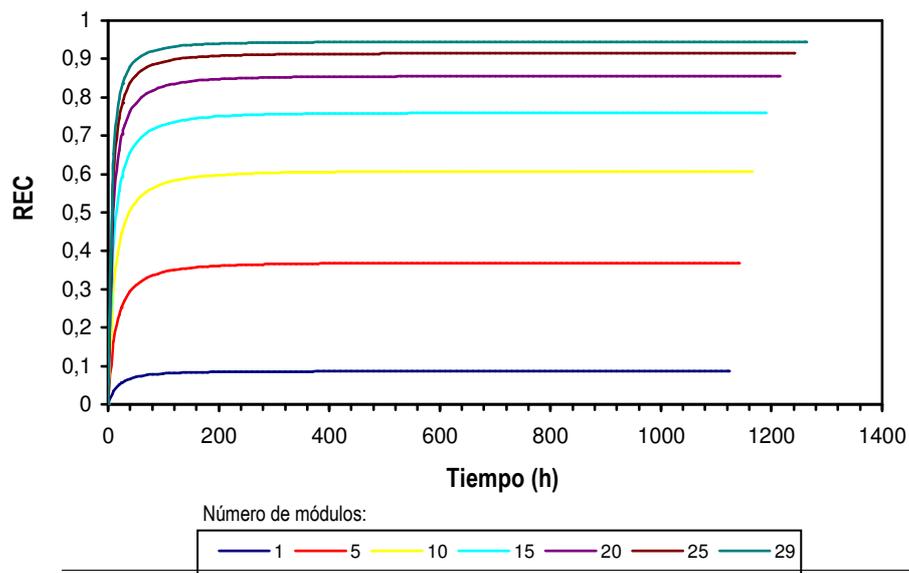
La existencia de este área mínima es debida a la disminución que experimenta el radio de poro de la membrana por efecto del fouling, que llega a ser menor que el radio efectivo de los oligosacáridos. En los apéndices 11.9 y 11.10 se recoge la evolución con el tiempo de los valores simulados del radio de poro y el porcentaje de recuperación máximo alcanzable (REC) de oligosacáridos para 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos en ambos modos extremos de operación, DF y CDF, respectivamente. Estos valores se representan en las figuras 6.42 a 6.45.



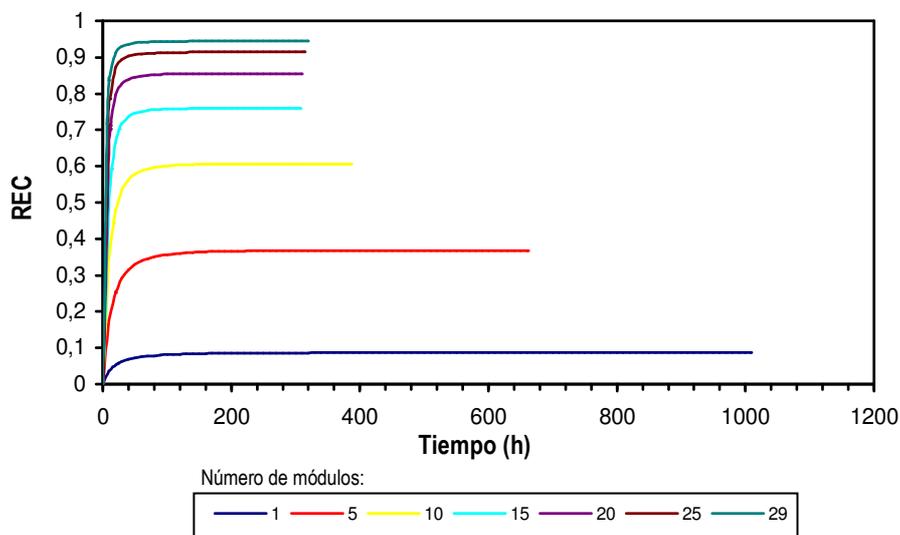
**Figura 6.42.** Evolución del radio de poro con el tiempo para 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos en el modo de operación DF.



**Figura 6.43.** Evolución del radio de poro con el tiempo para 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos en el modo de operación CDF.



**Figura 6.44.** Evolución del porcentaje recuperado de oligosacáridos (REC) para 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos en el modo de operación DF.



**Figura 6.45.** Evolución del porcentaje recuperado de oligosacáridos (REC) para 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos en el modo de operación CDF.

Se pone de manifiesto que previamente a la consecución de las especificaciones del producto,  $REC \geq 95\%$ , el radio de poro se ha hecho inferior por efecto del fouling al radio efectivo de los oligosacáridos  $R_{os} = 0.562$  nm, impidiendo su paso a través de la membrana tanto en el modo de operación DF como en el CDF. Así, por ejemplo, para 25 módulos con un área de  $8.75$  m<sup>2</sup>, en el modo CDF, según las gráficas 6.43 y 6.45 y los datos recogidos en el apéndice 11.10, a las 306 horas aproximadamente el radio de poro empieza a ser inferior al radio efectivo de los oligosacáridos, alcanzando una recuperación máxima del 91.4% aproximadamente. Por su parte, en el modo DF, según las figura 6.42 y 6.44 y los datos mostrados en el apéndice 11.9, esto ocurre a las a las 1142 h de proceso aproximadamente, alcanzando un porcentaje similar de recuperación del 91.4%, inferior a las especificaciones requeridas del 95%.

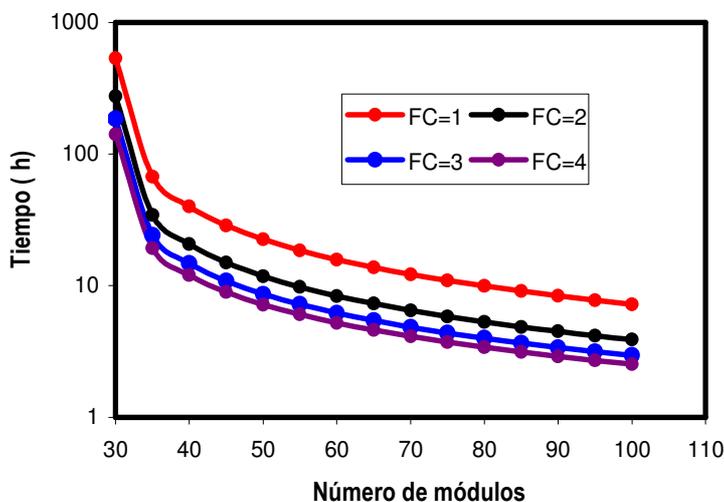
Por tanto, como se ha indicado, una recuperación de oligosacáridos del 95% requiere para el caso simulado un área de membrana mínima de  $10.5$  m<sup>2</sup>, correspondiente a 30 módulos.

A continuación, en la tabla 6.22 se recogen los tiempos de filtración para diferentes factores de concentración (FC: 1, 2, 3 y 4) y número de módulos comprendido entre 30 y 100.

**Tabla 6.22.** Tiempo de filtración para diferentes factores de concentración y número de módulos.

Módulos	Área, m <sup>2</sup>	Tiempo (h)			
		FC = 1	FC = 2	FC = 3	FC = 4
30	10.50	533.471	274.683	185.098	140.663
35	12.25	67.342	34.530	24.193	19.270
40	14.00	39.943	20.695	14.792	12.042
45	15.75	28.707	14.982	10.855	8.959
50	17.50	22.495	11.808	8.639	7.198
55	19.25	18.527	9.769	7.200	6.042
60	21.00	15.768	8.344	6.186	5.218
65	22.75	13.735	7.289	5.429	4.600
70	24.50	12.169	6.474	4.841	4.116
75	26.25	10.927	5.826	4.370	3.729
80	28.00	9.916	5.297	3.985	3.401
85	29.75	9.079	4.857	3.662	3.137
90	31.50	8.372	4.485	3.389	2.908
95	33.25	7.768	4.167	3.154	2.711
100	35.00	7.240	3.891	2.950	2.539

Estos valores se representan en la figura 6.46.



**Figura 6.46.** Evolución del tiempo de operación con el número de módulos.

Se comprueba que el tiempo de filtración disminuye gradualmente con el factor de concentración y el número de módulos.

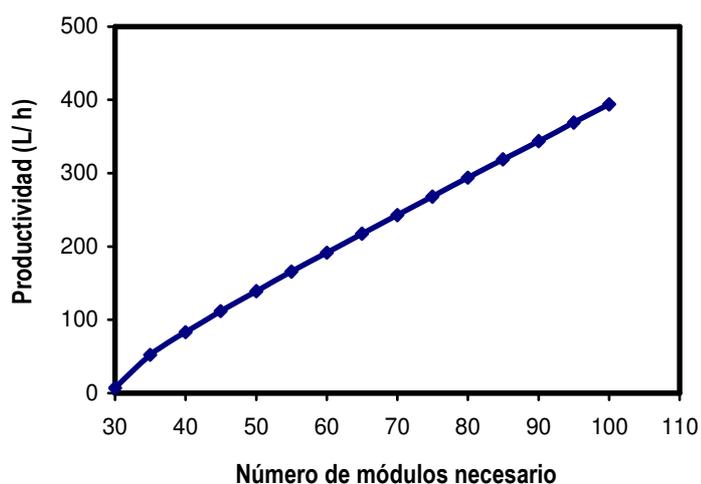
En procesos de membrana, el área de la instalación determina regularmente los costes tanto de capital (el coste de los módulos de membrana es sensiblemente mayor que el de tanques y bombas) como de operación (fundamentalmente debidos a ciclos de limpieza). De esta forma, la optimización del proceso pasa por minimizar el área

de membrana para una productividad dada. Según se observa en la figura 6.46, los resultados de la simulación revelan que el modo de operación óptimo es concentrar hasta el factor máximo permitido y diafiltrar posteriormente hasta obtener la recuperación requerida.

En la tabla 6.23 aparecen los valores de productividad, definida como el volumen procesado por unidad de tiempo para el caso estudiado,  $V_0 = 1000$  L y  $FC = 4$ , valores que se representan en la figura 6.47 frente al número de módulos a partir del mínimo necesario para el caso simulado.

**Tabla 6.23.** Valores de productividad para  $FC = 4$  y  $V_0 = 1000$ L en función del número de módulos.

Módulos	Área, m <sup>2</sup>	Tiempo, h (FC = 4)	Productividad, (L/h)
30	10.50	140.663	7.10919
35	12.25	19.270	51.89414
40	14.00	12.042	83.04268
45	15.75	8.959	111.61960
50	17.50	7.198	138.92748
55	19.25	6.042	165.50811
60	21.00	5.218	191.64431
65	22.75	4.600	217.39130
70	24.50	4.116	242.95432
75	26.25	3.729	268.16841
80	28.00	3.401	294.06575
85	29.75	3.137	318.77590
90	31.50	2.908	343.87895
95	33.25	2.711	368.86758
100	35.00	2.539	393.85585



**Figura 6.47.** Evolución de la productividad para  $V_0 = 1000$  L y  $FC = 4$  con el número de módulos .

Como ejemplo ilustrativo, para una productividad de 250 L/h, de acuerdo con los datos calculados, tabla 6.23, esta productividad se obtendría en aproximadamente 4 h de proceso y un número óptimo de módulos comprendido entre 70 y 75.

En la tabla 6.24 se recogen los valores de área mínima, tiempo y productividad simulados para un número de módulos intermedio comprendido en este rango.

**Tabla 6.24.** Valores de área, tiempo y productividad para un número de módulos entre 70 y 75.

Módulos	Área, m <sup>2</sup>	Tiempo, h	Productividad, L/h
70	24.50	4.116	242.954
71	24.85	4.031	248.077
72	25.20	3.950	253.165
73	25.55	3.873	258.198
74	25.90	3.798	263.296
75	26.25	3.726	168.384

Por tanto, el área de membrana óptima necesaria para la productividad especificada de 250 L/h sería de 25.20 m<sup>2</sup>, correspondiente a 72 módulos.

En las gráficas que se muestran a continuación se representa la evolución de las variables más significativas del proceso para este caso (datos en apéndice 11.11), como son:

- tiempo de filtración (tiempo de concentración y tiempo de diafiltración)
- radio de poro, R
- cociente radio efectivo/radio de poro para los oligosacáridos,  $\lambda_{os}$
- concentración de oligosacáridos en las corrientes de retenido y filtrado,  $C_R^{OS}$  y  $C_F^{OS}$
- porcentaje de recuperación de oligosacáridos, REC.

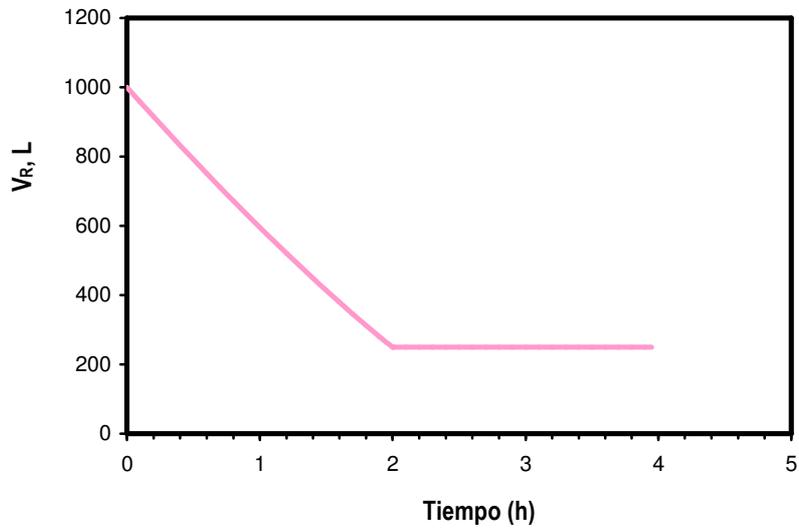


Figura 6.48. Evolución del volumen de retenido con el tiempo.

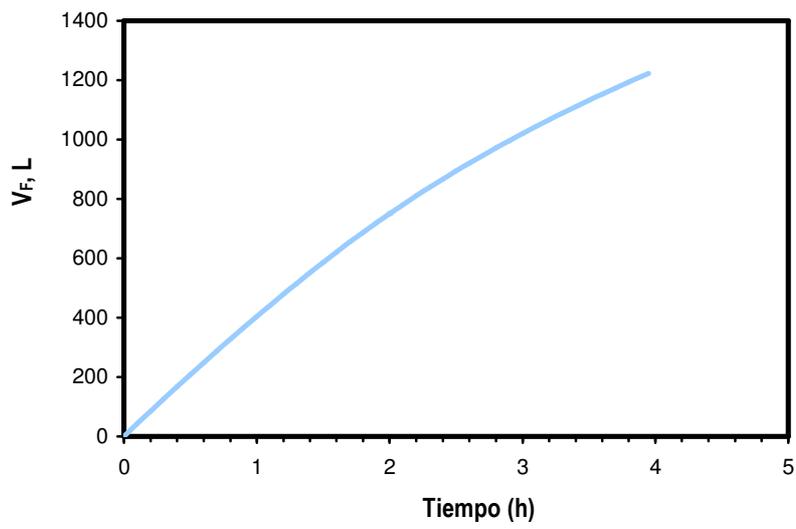


Figura 6.49. Evolución del volumen de filtrado con el tiempo.

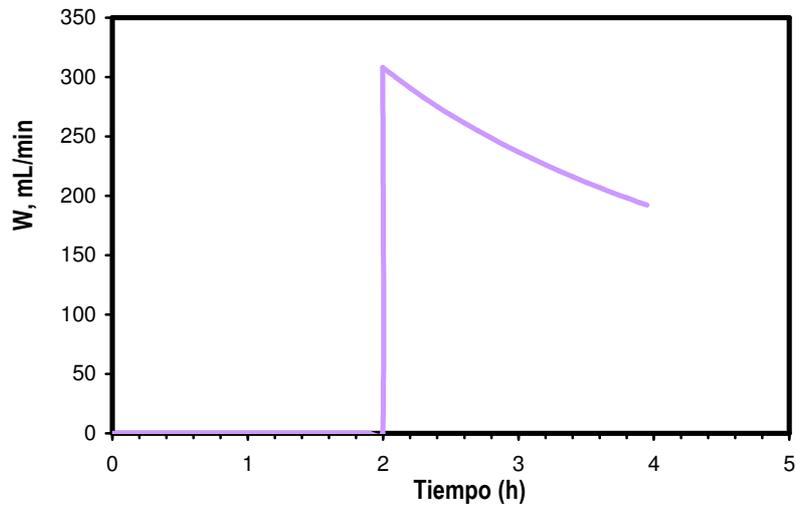


Figura 6.50. Evolución del caudal de agua de diafiltración adicionado con el tiempo.

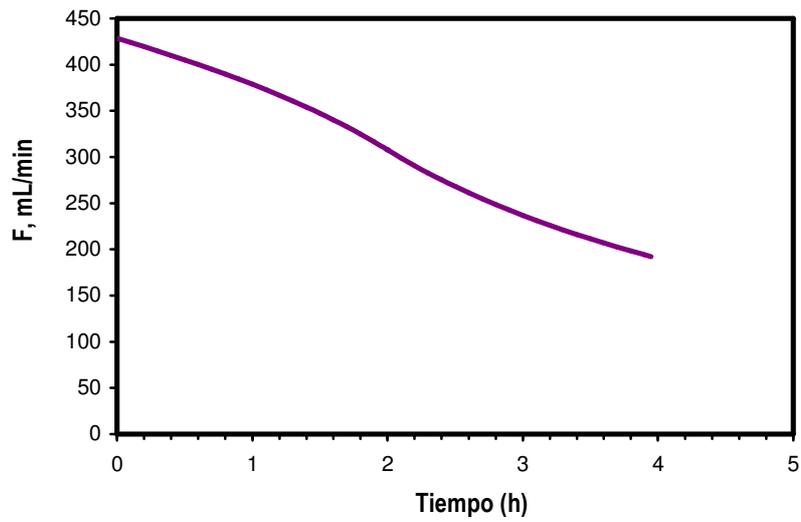


Figura 6.51. Evolución del caudal de filtrado con el tiempo.

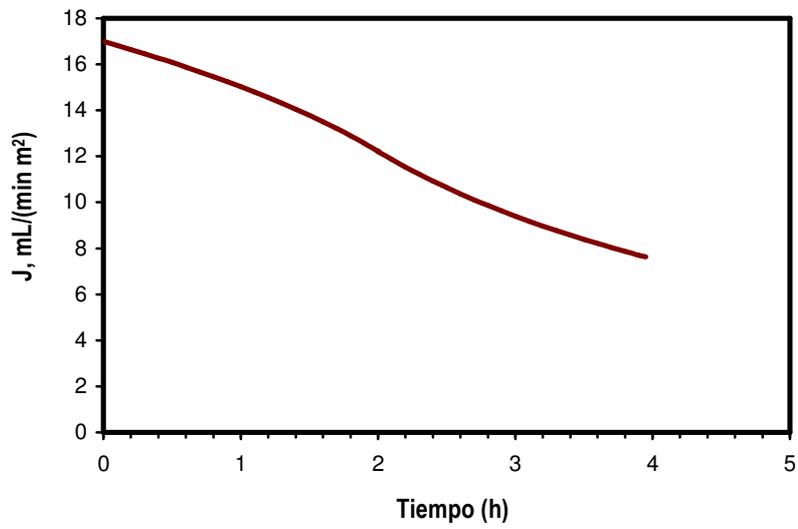


Figura 6.52. Evolución del flujo de filtrado con el tiempo.

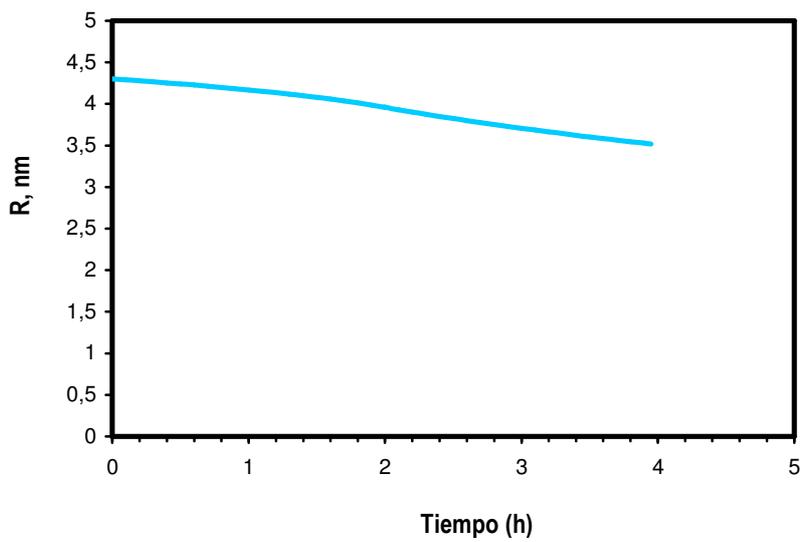
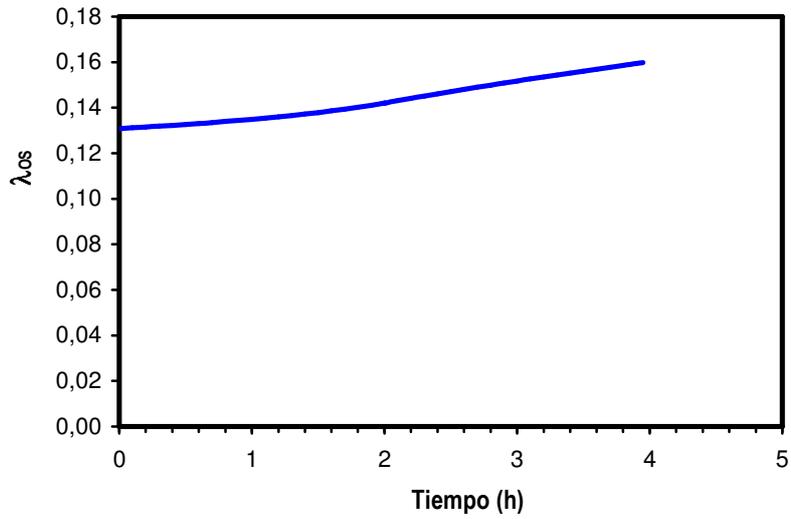
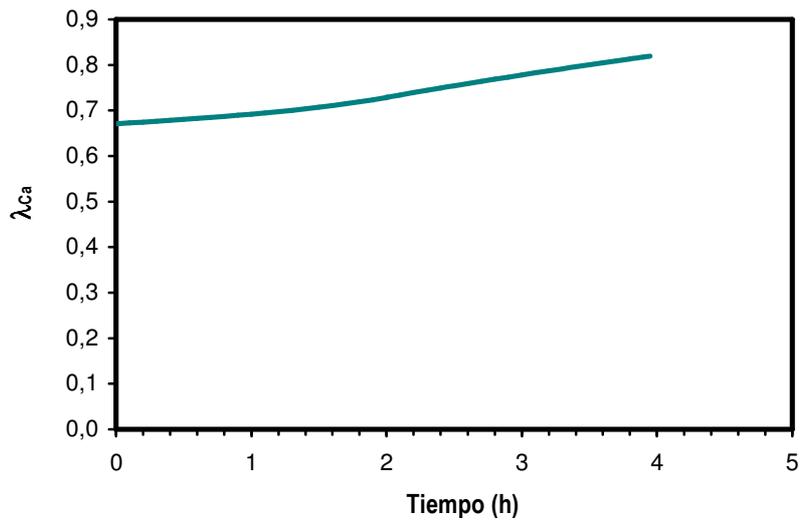


Figura 6.53. Evolución del radio de poro con el tiempo.



**Figura 6.54.** Evolución del cociente radio efectivo/radio de poro para los oligosacáridos con el tiempo.



**Figura 6.55.** Evolución del cociente radio efectivo/radio de poro para el calcio con el tiempo.

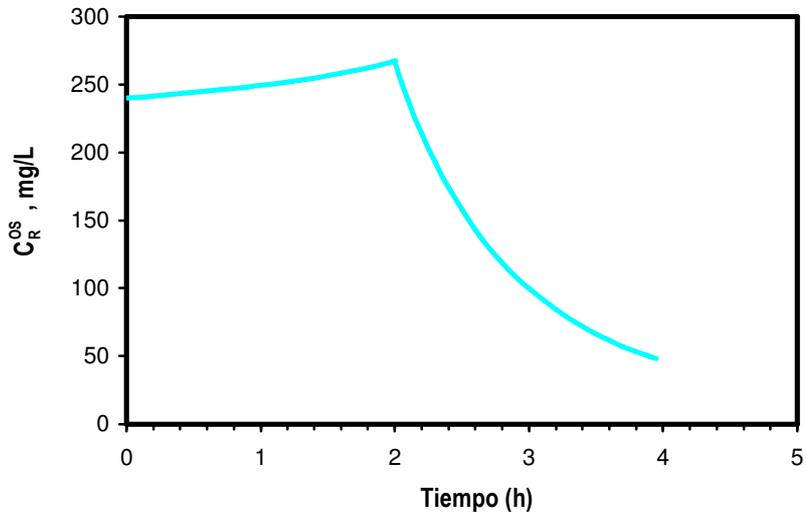


Figura 6.56. Evolución de la concentración de oligosacáridos en el retenido con el tiempo.

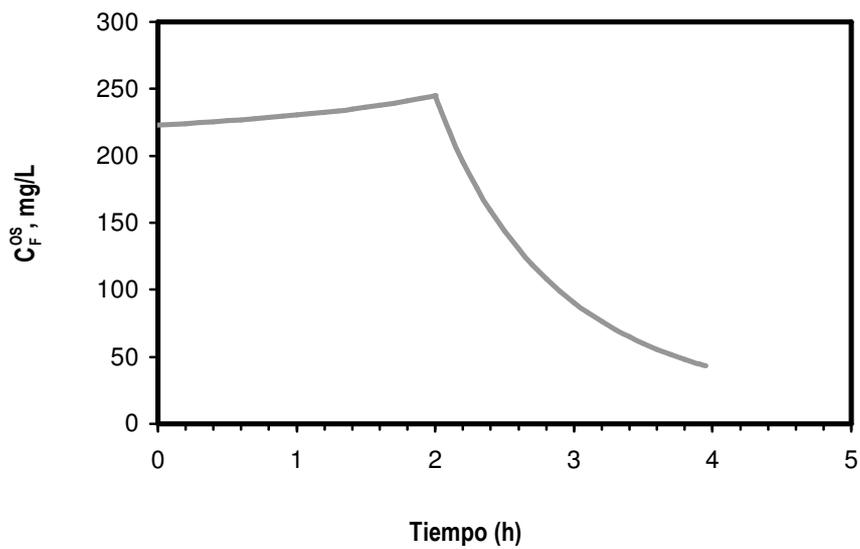


Figura 6.57. Evolución de la concentración de oligosacáridos en el filtrado con el tiempo.

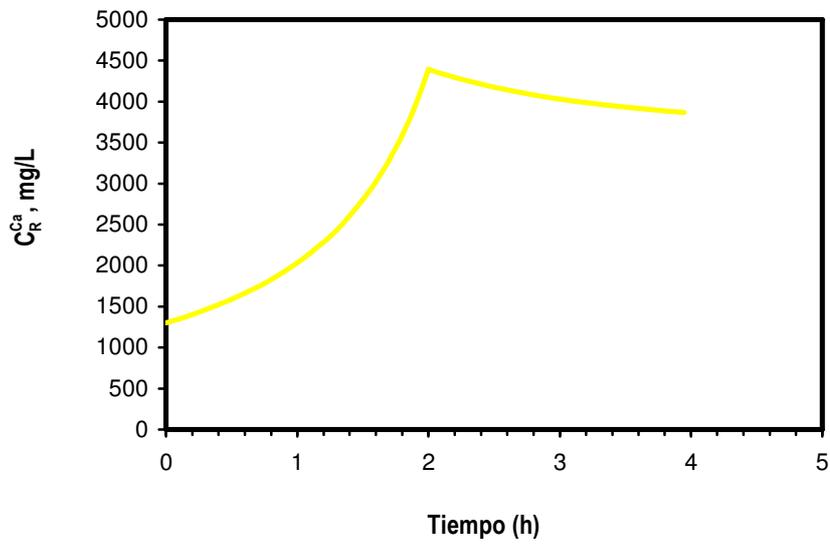


Figura 6.58. Evolución de la concentración de calcio en el retenido con el tiempo.

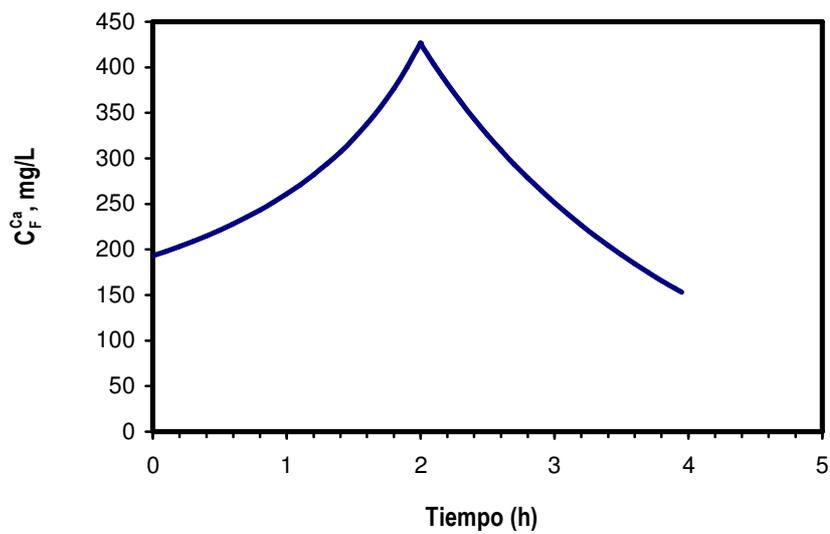
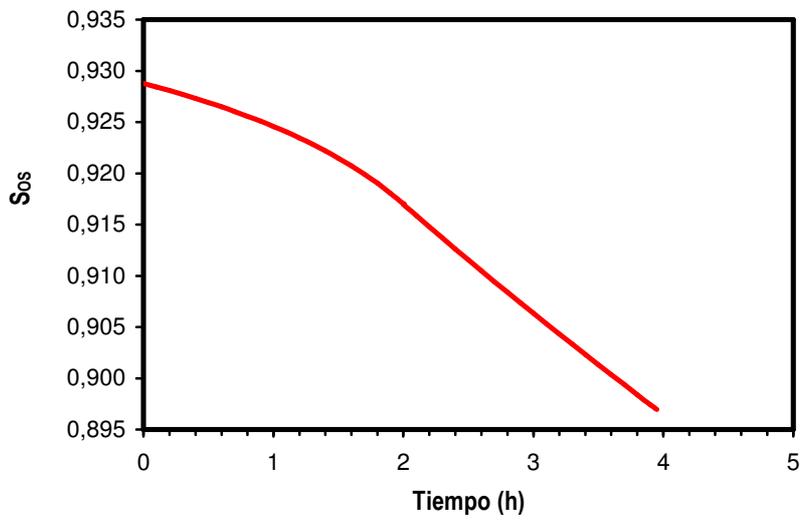
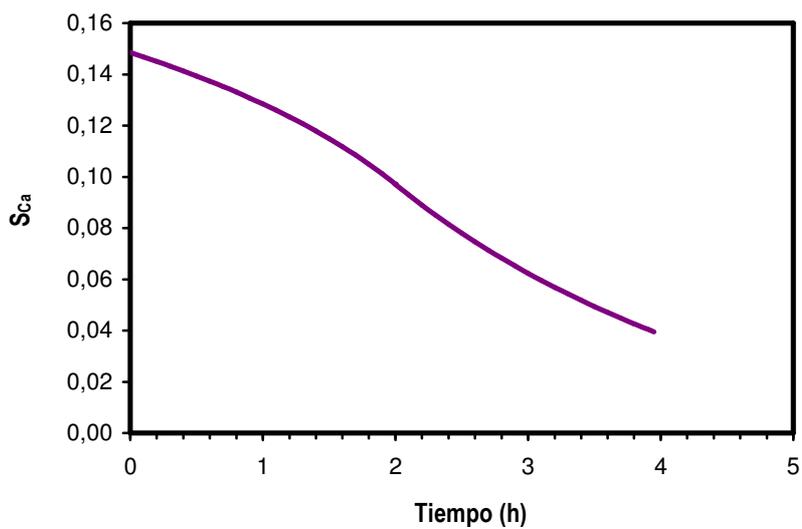


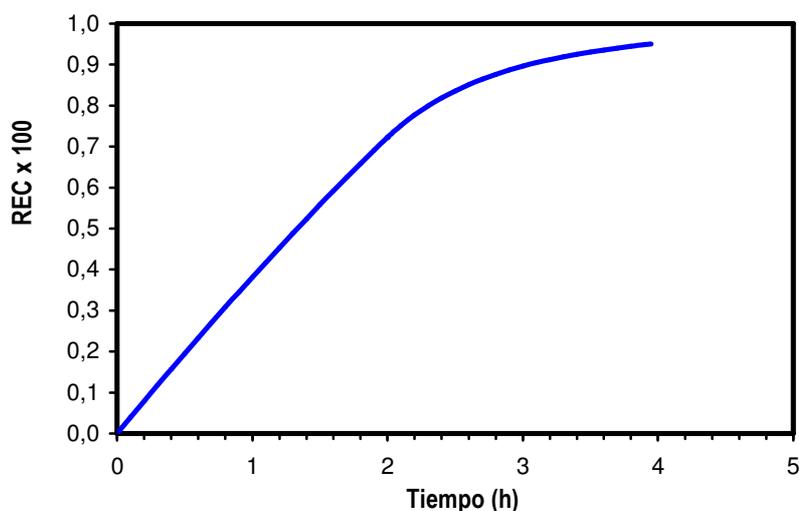
Figura 6.59. Evolución de la concentración de calcio en el filtrado con el tiempo.



**Figura 6.60.** Evolución del coeficiente de transmisión para los oligosacáridos con el tiempo.



**Figura 6.61.** Evolución del coeficiente de transmisión para el calcio con el tiempo.



**Figura 6.62.** Evolución del porcentaje de recuperación de oligosacáridos con el tiempo.

En las figuras 6.48 y 6.50 correspondientes a la evolución del volumen de retenido y del agua de diafiltración con el tiempo, se observa que el tiempo total del proceso son aproximadamente 4 horas, que se dividen en 1.90 h de concentración y 2.10 h de diafiltración continua.

Por otra parte, cabe destacar la disminución del radio de poro con el tiempo, recogida en el apéndice 11.11 y en la figura 6.53, así durante el proceso el radio pasa de 4.30 nm a 3.52 nm, lo que supone una disminución de área del 32.99%. No obstante, se observa que durante todo el proceso la relación radio efectivo/radio de poro para los oligosacáridos,  $\lambda_{os}$ , es inferior a 0.2 (figura 6.54), lo que implica que el radio de poro de la membrana es superior en más de 5 veces al radio efectivo de los oligosacáridos, lo que garantiza la no influencia de los efectos estéricos y que el índice de rechazo para los oligosacáridos IR sea 0.

En cuanto al porcentaje de recuperación (REC), en la figura 6.62 se muestra su evolución con el tiempo, observándose que a las 4 h de proceso se alcanza el 95% de recuperación de los oligosacáridos, un tiempo 3 veces inferior en comparación con las aproximadamente 12 horas necesarias en el modo de operación DF (tabla 6.22, FC = 1) para el caso estudiado.

## **7. CONCLUSIONES.**

Como resultado de la investigación que se describe en esta Memoria, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. La leche de cabra es una óptima fuente de oligosacáridos tanto por su composición como por su concentración, y la mejor en comparación con las leches comercialmente disponibles (vaca y oveja), conteniendo una gran variedad de oligosacáridos ácidos y N-acetil-glucosaminil-lactosa junto con galactosil-lactosa como oligosacáridos neutros mayoritarios.
2. El contenido de oligosacáridos de la leche de cabra es significativamente menor en comparación con el de la leche humana, aunque las similitudes estructurales encontradas entre los oligosacáridos y otros glicoconjugados de leche de cabra y los de leche materna sugieren que podrían desarrollar una bioactividad similar, pudiendo ser utilizados en productos para nutrición humana.
3. Los oligosacáridos de la leche de cabra inducen la maduración del epitelio intestinal, ya que estimulan la diferenciación celular, pero no la proliferación celular. Su suplementación al medio de cultivo de células del epitelio intestinal aumenta la mayoría de las actividades enzimáticas ensayadas, entre ellas fosfatasa alcalina, lactasa, maltasa y sacarasa, generando a su vez una tendencia al aumento de la actividad leucín-aminopeptidasa. Sin embargo, esta suplementación no produce ninguna alteración significativa en los niveles del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).
4. La suplementación del medio de cultivo celular con oligosacáridos de leche de cabra inhibe *in vitro* la adhesión de monocitos sobre células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) estimuladas con TNF- $\alpha$  bajo condiciones de flujo en un 21.1%, lo que sugiere la existencia de epítopos similares a los ligandos de las selectinas, ejerciendo una importante acción sobre la cascada de adhesión celular que conduce a la extravasación de células de la sangre a los tejidos durante los procesos de inflamación.
5. El proceso de ultrafiltración tangencial de leche de cabra desnatada con módulos de membrana cerámicos tubulares de tamaño de corte 50 KDa en las siguientes condiciones de operación:  $T^a = 30^{\circ}\text{C}$ , velocidad de recirculación  $v = 3.30 \text{ m/s}$  y  $P_{TM} = 0.90 \text{ bar}$ , permite la separación de la fracción proteica mayoritaria de la fracción de oligosacáridos, permitiendo la recuperación de más del 95% de los mismos sin alterar sus propiedades biológicas ni su biodisponibilidad.
6. En las condiciones de operación ensayadas, el módulo de membrana cerámico tubular de 50 KDa presenta los siguientes índices de rechazo: IR = 0, Oligosacáridos: IR = 0, Proteína soluble: IR = 0, Caseína: IR = 1 y Calcio: IR = 0.26.

7. El modelo dinámico desarrollado para el proceso de ultrafiltración de leche de cabra reproduce fielmente los datos experimentales y consta de 10 ecuaciones independientes:

$$\begin{aligned} \frac{dV_F}{dt} &= F & [1] & & J &= \frac{F}{A} & [2] \\ J &= \alpha R^4 & [3] & & \frac{dR}{dt} &= -\beta \frac{C_R^{Ca} \cdot J}{R} & [4] \\ \frac{dC_R^{OS}}{dt} &= -\frac{F \cdot S_{OS} \cdot C_R^{OS}}{V_R} & [5] & & \frac{dC_R^{Ca}}{dt} &= -\frac{F \cdot S_{Ca} \cdot C_R^{Ca}}{V_R} & [6] \\ S_{OS} &= \frac{C_F^{OS}}{C_R^{OS}} & [7] & & S_{Ca} &= \frac{C_F^{Ca}}{C_R^{Ca}} & [8] \\ \lambda_{OS} &= \frac{R_{OS}}{R} & [9] & & \lambda_{Ca} &= \frac{R_{Ca}}{R} & [10] \end{aligned}$$

*Modelo dinámico del proceso de ultrafiltración de leche de cabra.*

cuyos parámetros son los siguientes:

- coeficiente de flujo,  $\alpha = 4.98 \times 10^{-2} \text{ L}/(\text{h m}^2 \text{ nm}^4)$
- coeficiente de fouling,  $\beta = 2.15 \times 10^{-5} (\text{nm}^2 \text{ m}^2) / \text{mg Ca}$
- radio efectivo de la molécula de oligosacáridos,  $R_{OS} = 0.562 \text{ nm}$
- radio efectivo para el calcio,  $R_{Ca} = 2.884 \text{ nm}$
- y el radio inicial de poro,  $R = 4.299 \text{ nm}$ .

8. El tiempo de operación del proceso de ultrafiltración de leche de cabra a través de membranas cerámicas tubulares, disminuye gradualmente con el factor de concentración y el número de módulos.
9. El modo de operación óptimo para obtener a nivel industrial la fracción de oligosacáridos de leche de cabra por filtración tangencial a través de módulos cerámicos tubulares es concentrar hasta factor 4, máximo permisible por la fluidodinámica del sistema, y posteriormente realizar diafiltración continua hasta alcanzar la recuperación requerida.

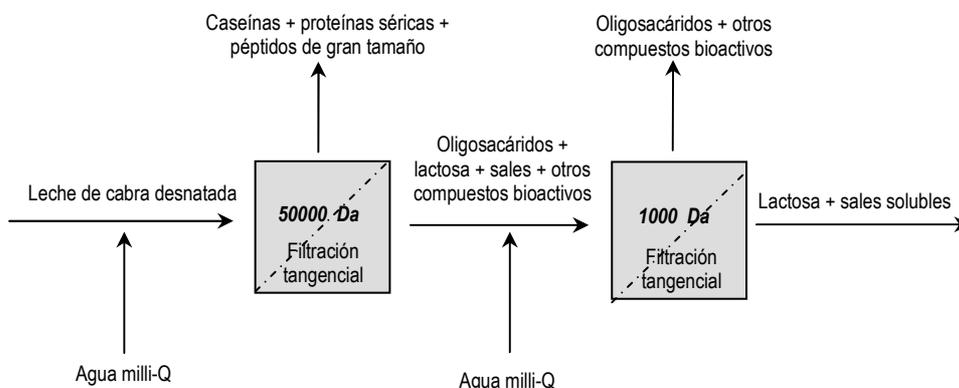
10. Para un caso práctico, partiendo de 1000 L de leche de cabra y especificando una recuperación de oligosacáridos superior al 95% y una productividad de 250 L/h, se comprueba que existe un área mínima de filtración de 25.20 m<sup>2</sup> y un tiempo óptimo de operación de 3.95 h, dividido en aproximadamente 1.90 h de concentración y 2.10 h de diafiltración continua.

## **8. INVESTIGACIÓN FUTURA.**

Las futuras actividades de investigación irán dirigidas básicamente en dos direcciones: la primera de ellas, hacia la reducción de los niveles de lactosa del producto final, y la segunda, hacia la comprobación de la capacidad de los oligosacáridos de leche de cabra de actuar como inmunomoduladores *in vivo*.

Con respecto al primero de los objetivos marcados, éste se abordará con dos diseños experimentales diferentes que consisten en:

- La utilización de un reactor de membrana, en el que se hidrolicen continuamente las moléculas de lactosa y se separe la fracción de oligosacáridos de los monosacáridos generados, glucosa y galactosa. La hidrólisis se deberá realizar con una enzima de tales características que no afecte a la estructura original de los oligosacáridos.
- La utilización de una segunda membrana en serie con la membrana de 50 KDa de tamaño molecular de corte alrededor de 1000 Da, capaz de filtrar las moléculas de lactosa, sales solubles y otros componentes de menor peso molecular, reteniendo en cambio la fracción de oligosacáridos. La figura 8.1 muestra la secuencia de filtración sugerida.



**Figura 8.1.** Secuencia de filtración para reducir los niveles de lactosa.

La secuencia de filtración en dos etapas generará dos valiosos productos: la corriente de retenido procedente de la primera de ellas compuesta por la casi totalidad de la fracción proteica de la leche de cabra, de gran aplicación en la formulación de alimentos funcionales, fermentados, etc y el retenido de la segunda etapa, incluyendo la fracción de oligosacáridos y algunos otros compuestos bioactivos de similar peso molecular, libre de sales y lactosa. En este caso, se han realizado ya algunos ensayos preliminares (Martínez-Férez *et al*, 2003).

En cuanto al segundo de los objetivos perseguidos, se estudiarán las propiedades inmunomoduladoras de los oligosacáridos de leche de cabra en dos modelos experimentales, *in vitro* (células Caco-2) e *in vivo* (en ratones). Concretamente, en el primer caso, se cultivarán células Caco-2 hasta confluencia en un medio de cultivo que contenga o no oligosacáridos de leche de cabra al que se le adicionará a día 7 un microorganismo patógeno (*Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, etc). De forma específica, se estudiará el porcentaje de inhibición de la adhesión del microorganismo patógeno a la superficie de las células Caco-2 producido por los oligosacáridos de leche de cabra.

Asimismo, y con objeto de confirmar esta protección que confieren las estructuras oligosacáridicas en la prevención de infecciones por unión específica a receptores de la pared bacteriana, se harán estudios en modelos animales *in vivo*. Para ello, se alimentarán ratones con una dieta que contenga oligosacáridos de leche de cabra o no en una cantidad similar a la existente en leche humana durante 15 días. En ese momento, se inducirá una infección tras la administración de microorganismos patógenos por vía oral (*Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, etc) y se comprobará el efecto de los oligosacáridos de leche de cabra en la incidencia y evolución de la propia infección.

## **9. NOMENCLATURA.**

**NOMENCLATURA**

<b>A</b>	Área de la membrana
<b>C</b>	Coefficiente de proporcionalidad
<b>C<sub>F</sub></b>	Concentración instantánea de soluto en la corriente de filtrado
<b>C<sub>FA</sub></b>	Concentración de soluto en el filtrado acumulado
<b>C<sub>F</sub><sup>Ca</sup></b>	Concentración de calcio en el filtrado
<b>C<sub>F</sub><sup>OS</sup></b>	Concentración de oligosacáridos en el filtrado
<b>C<sub>R</sub></b>	Concentración de soluto en la corriente de retenido
<b>C<sub>Ro</sub></b>	Concentración inicial de soluto en el retenido
<b>C<sub>R</sub><sup>Ca</sup></b>	Concentración de calcio en el retenido
<b>C<sub>R</sub><sup>OS</sup></b>	Concentración de oligosacáridos en el retenido
<b>d<sub>h</sub></b>	Diámetro hidráulico
<b>F</b>	Caudal de filtrado
<b>F<sub>R</sub></b>	Caudal de retenido
<b>J</b>	Flujo a través de la membrana
<b>IR</b>	Índice de rechazo
<b>L</b>	Longitud de la membrana
<b>L<sub>p</sub></b>	Longitud de poro
<b>N</b>	Número de poros por unidad de área
<b>p<sub>j</sub></b>	Pesos de cada serie
<b>P<sub>TM</sub></b>	Presión transmembrana
<b>R</b>	Radio de poro
<b>R<sub>Ca</sub></b>	Radio efectivo para el calcio
<b>Re</b>	Módulo de Reynolds
<b>REC</b>	Porcentaje de recuperación de cada componente
<b>Re<sub>h</sub></b>	Módulo de Reynolds hidráulico
<b>R<sub>F</sub></b>	Resistencia de fouling
<b>R<sub>FM</sub></b>	Resistencia de (fouling + intrínseca de la membrana)
<b>R<sub>G</sub></b>	Resistencia de polarización
<b>r<sub>h</sub></b>	Radio hidráulico de los canales
<b>R<sub>M</sub></b>	Resistencia intrínseca de la membrana
<b>rms</b>	Raíz cuadrática media
<b>R<sub>OS</sub></b>	Radio efectivo para los oligosacáridos
<b>S<sub>Ca</sub></b>	Coefficiente de transmisión para el calcio
<b>S<sub>OS</sub></b>	Coefficiente de transmisión para los oligosacáridos
<b>T<sub>D</sub></b>	Tasa de diafiltración o número de diavolumenes

$v$	Velocidad media de recirculación por los canales
$V_D$	Volumen de diafiltración
$V_F$	Volumen de filtrado
$V_{FA}$	Volumen de filtrado acumulado
$V_R$	Volumen de retenido
$W$	Caudal de agua de diafiltración
$w_p$	Perímetro mojado

### **Letras griegas**

$\alpha$	Coefficiente de flujo
$\beta$	Coefficiente de fouling
$\phi$	Coefficiente de proporcionalidad
$\gamma$	Factor de fouling
$\lambda_{Ca}$	Relación entre radio efectivo y radio de poro para los oligosacáridos
$\lambda_{OS}$	Relación entre radio efectivo y radio de poro para el calcio
$\rho$	Densidad
$\mu$	Viscosidad

### **ABREVIATURAS**

<b>Ca</b>	Calcio
<b>Cas</b>	Caseína
<b>BCA</b>	Ácido bicinconónico
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CDF</b>	Modo concentración seguido de diafiltración continua
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>DF</b>	Modo diafiltración continua
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNAL</b>	Di-N-acetil-glucosaminil-lactosa
<b>DNGHL</b>	Di-N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa
<b>DNGL</b>	Di-N-glicolil-neuraminil-lactosa
<b>DSHL</b>	Disialil-hexosil-lactosa
<b>DSL</b>	Disialil-lactosa

<b>DSLNT</b>	Disialil-lacto-N-tetraosa
<b>EC</b>	Extracto rico en oligosacáridos
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>ELAM</b>	Molécula de adhesión leucocito-endotelial
<b>FAB-MS</b>	Espectrometría de masas de bombardeo atómico rápido
<b>FC</b>	Factor de concentración
<b>2-FL</b>	2-fucosil-lactosa
<b>3-FL</b>	3-fucosil-lactosa
<b>FSE</b>	Fracción de soluto eliminada
<b>Fuc</b>	Fucosa
<b>Gal</b>	Galactosa
<b>GalNAc</b>	N-acetil-galactosamina
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento
<b>GL</b>	Galactosil-lactosa
<b>Glc</b>	Glucosa
<b>GlcNAc</b>	N-acetil-glucosamina
<b>GMP</b>	Glicomacropéptido
<b>HBSS</b>	Solución salina equilibrada de Hank's
<b>HPAEC-PAD</b>	Cromatografía de intercambio aniónico a alto pH con detección amperométrica pulsante
<b>HPTFF</b>	Proceso de filtración tangencial de alta resolución
<b>HP-TLC</b>	Cromatografía de capa fina de alta resolución
<b>HUVEC</b>	Células endoteliales de cordón umbilical humano
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular 1
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento insulínico
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>Lac</b>	Lactosa
<b>Lg</b>	Lactoglobulina
<b>LNDFH I</b>	Lacto-N-difucohexaosa I
<b>LNDFH II</b>	Lacto-N-difucohexaosa II
<b>LNFP I</b>	Lacto-N-fucopentaosa I
<b>LNFP II</b>	Lacto-N-fucopentaosa II
<b>LNFP III</b>	Lacto-N-fucopentaosa III
<b>LNH</b>	Lacto-N-hexaosa
<b>LNnT</b>	Lacto-N-neotetraosa
<b>LNT</b>	Lacto-N-tetraosa
<b>LST a</b>	Sialil-lacto-N-tetraosa a

<b>LST b</b>	Sialil-lacto-N-tetraosa b
<b>LST c</b>	Sialil-lacto-N-tetraosa c
<b>Man</b>	Manosa
<b>MF</b>	Microfiltración
<b>NADHL</b>	N-acetil-glucosaminil-dihexosil-lactosa
<b>NAHL</b>	N-acetil-glucosaminil-hexosil-lactosa
<b>NAL</b>	N-acetil-glucosaminil-lactosa
<b>NALNH</b>	N-acetil-glucosaminil-lacto-N-hexaosa
<b>NeuAc</b>	Ácido N-acetil-neuramínico o ácido siálico
<b>NeuGc</b>	Ácido N-glicolil-neuramínico
<b>NF</b>	Nanofiltración
<b>NGHL</b>	N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa
<b>NGL</b>	N-glicolil-neuraminil-lactosa
<b>NGLNH</b>	N-glicolil-neuraminil-lacto-N-hexaosa
<b>OC</b>	Oligosacáridos puros de leche de cabra
<b>OS</b>	Oligosacáridos
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de proliferación celular
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Pe</b>	Presión de entrada
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>Ps</b>	Presión de salida
<b>PS</b>	Proteína soluble
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>Rad</b>	Radical
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RO</b>	Ósmosis inversa
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>SDHL</b>	Sialil-dihexosil-lactosa
<b>SDS</b>	Dodecil-sulfato de sodio
<b>SDS PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida adicionado de SDS
<b>SHL</b>	Sialil-hexosil-lactosa
<b>3-SL</b>	3-sialil-lactosa
<b>6-SL</b>	6-sialil-lactosa
<b>SLNH</b>	Sialil-lacto-N-hexaosa
<b>SNGHL</b>	Sialil-N-glicolil-neuraminil-hexosil-lactosa
<b>SNGL</b>	Sialil-N-glicolil-neuraminil-lactosa

<b>T<sup>a</sup></b>	Temperatura
<b>TEMED</b>	1,2-Bis-(dimetil-amino)-etano
<b>TFF</b>	Técnicas convencionales de filtración tangencial
<b>TGF</b>	Factor transformador del crecimiento
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>UF</b>	Ultrafiltración
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión celular vascular 1
<b>w-3</b>	Omega 3

## **10. BIBLIOGRAFIA.**

- Abbassi O, Lane C L, Krater S, Kishimoto T K, Anderson D C, McIntire L V y Smith C W (1991). Canine neutrophil margination mediated by lectin adhesion molecule-1 in vitro. *J. Immunol.* 147:2107-2115.
- Abbassi O, Kishimoto T K, McIntire L V, Anderson D C y Smith C W (1993). E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J. Clin. Immunol.* 92:2719-2730.
- Aimar P, Baklouti S y Sanchez V (1986). Membrane-solute interactions: influence on pure solvent transfer during ultrafiltration. *J. Memb. Sci.* 29:207-224.
- Akira K y Ginsburg V (1972). Oligosaccharides of human milk III. Isolation and characterization of a new hexasaccharide, lacto-N-hexaose. *J. Biol. Chem.* 247:1525-1529.
- Alevriadou B R, Moake J L, Turner N A, Ruggeri Z M, Folie B J, Phillips M D, Schreiber A B, Hrinda M E y McIntire L V (1993). Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood.* 81:1263-1276.
- Allescher H D, Store M, Piller C, Brantl V y Schusdziarra V (2000). Effect of opioid active therapeutics on the ascending reflex pathway in the rat ileum. *Neuropeptides.* 34:181-186.
- Amundson C H, Watanawanichakorn S y Hill C G (1982). Production of enriched protein fractions of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin from cheese whey. *J. Food Process and Preserv.* 6:55-71.
- Anderson D C, Abbassi O, Kishimoto T K, Koenig J M, McIntire L V y Smith C W (1991). Diminished lectin-, epidermal growth factor-, complement binding domain-cell adhesion molecule-1 on neonatal neutrophils underlies their impaired CD18-independent adhesion to endothelial cells in vitro. *J. Immunol.* 146:3372-3379.
- Andersson B, Porras O, Hanson L A, Lagergard T y Svanborg-Eden C (1986). Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J. Infect. Dis.* 153:232-237.
- Andersson Y, Lind S, Lagerqvist C y Hernell O (2000). Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. *Early Hum. Dev.* 50:95-105.
- Arathoon W, van Reis R, Builder S, Lubiniecki A S (1991). Patente US5053334. Process for producing biologically active plasminogen activator in recombinant CHO cells using suspension culture and removing detrimental components from medium.

- Balakrishnan M y Agarwal G P (1996). Protein fractionation in a vortex flow filter. II. Separation of simulated mixtures. *J. Memb. Sci.* 112:75-84.
- Beucher S, Levenez F, Yvon M y Corring T (1994). Effects of gastric digestive products from casein and CCK release by intestinal cells in rats. *J. Nutr. Biochem.* 5:578-584.
- Bode L y Rudloff S (2002). Human milk oligosaccharides (HMO) inhibit monocyte adhesion to endothelial cells in a concentration dependent manner. Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB). New Orleans (USA).
- Bohles H, Gebhardt C y Beeg T (1998). Reflections about possible nutritional supplements in infant milk formula. *Z. Ernährungswiss.* 37:132-146.
- Borriello S P, Hammes W P, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M y Valtonen V (2003). Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin. Infect. Dis.* 36(6):775-780.
- Bouhallab S y Henry G (1995). Transmission of a hydrophobic peptide through an inorganic ultrafiltration membrane: effect of membrane support. *J. Memb. Sci.* 104:73-79.
- Bounous G y Kongshavn P A L (1982). Influence of dietary proteins on the immune system of mice. *J. Nutr.* 112:1747-1755.
- Boza J J, Jiménez J, Faus M J y Gil A (1992). Influences of postnatal age and dietary nucleotides on plasma fatty acid in the weanling rat. *JPEN.* 16:322-26.
- Boza J J, Martínez-Augustín O, Baró L, Suárez M D y Gil A (1995). Influence of casein and casein hydrolysate diets on the nutritional recovery of starved rats. *JPEN.* 19:216-221.
- Boza J J, Jiménez J, Baró L, Martínez-Augustín O, Suárez M D y Gil A (1996). Effects of native and hydrolysed whey protein on intestinal repair of malnourished rats at weaning. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 22:186-193.
- Boza J J, Moennoz D, Vuichoud J, Jarret A R, Gaudard-de-Weck D, Fritsche R, Donnet A, Schiffrin E J, Perruisseau G y Balleve O (1999). Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J. Nutr.* 129:1340-1346.
- Brassart D, Woltz A, Golliard M y Neeser J R (1991). In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Gal $\beta$ -bearing complex carbohydrates. *Infect. Immun.* 59:1605-1613.

- Brennan M J, David J L, Kenimer J G y Manclark C R (1988). Lectin-like binding of pertussis toxin to a 165-kilodalton Chinese hamster ovary cell glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 263:4895-4899.
- Brines R D y Brock J H (1983). The effect of trypsin and chymotrypsin on the in vitro antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrums. Unusual resistance of human apolactoferrin to proteolytic digestion. *Biochim. Biophys. Acta.* 759:229-235.
- Buts J P, De Keyser N, Kolanowski J, Sokal E y Nsegiyumba T (1993). Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine: role of dietary polyamines. *Dig. Dis. Sci.* 38:1091-1098.
- Buts J P, De Keyser N, De Raedemaeker L, Collette E y Sokal E M (1995). Polyamine profiles in human milk, infant artificial formulas, and semi-elemental diets. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21(1):44-4.
- Buttrum S M, Hatton R y Nash G B (1993). Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood.* 82:1165-1174.
- Cahan L D y Paulson J C (1980). Polyoma virus adsorbs to specific sialyloligosaccharide receptors on erythrocytes. *Virology.* 103:505-509.
- Capano G, Bloch K J, Carter E A, Dascoli J A, Schoenfeld D y Harmatz P R (1998). Polyamines in human and rat milk influence intestinal cell growth in vitro. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 27:281-286.
- Carver J D, Pimentel B, Cox W I y Barness L A (1991). Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. *Pediatr.* 88:359-363.
- Cervantes L E, Newburg D S y Ruiz-Palacios G M (1995).  $\alpha(1-2)$  Fucosylated chains (H-2 and Lewis<sub>x</sub>) are the main human milk receptor analogs for *Campylobacter*. *Pediatr. Res.* 37:171A.
- Cheryan M (1986). *Ultrafiltration handbook*. Technomic Publishing Company, Lancaster.
- Cheryan M (1998). *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Technomic Publishing Company, Lancaster.
- Chhabra S R, Rahim A S y Kellam B (2003). Recent progress in the design of selectin inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* 3(7):679-687.
- Christy C, Adams G, Kuriyel R, Bolton G y Seilly A (2002). High-performance tangential flow filtration: a highly selective membrane separation process. *Desalination.* 144:133-136.

- Cohen M B, Moyer M S, Luttrell M y Giannella R A (1986). The immature rat small intestine exhibits an increased sensitivity and response to *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Pediatr. Res.* 20:555-560.
- Cohen M B, Guarino A, Shukla R y Giannella R A (1988). Age-related differences in receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in the small and large intestine of children. *Gastroenterology.* 94:367-373.
- Crane J K, Azar S S, Stam A y Newburg D S (1994). Oligosaccharides from human milk block binding and activity of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in T84 intestinal cells. *J. Nutr.* 124:2358-2364.
- Cravioto A, Tello H, Villafan J, Ruiz S y del Vedovo J R (1991). Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrums and breast milk. *J. Infect. Dis.* 153:1247-1255.
- Cummings J H y Macfarlane G T (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 21(6):357-365.
- Cundell D R y Tuomanen E I (1994). Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-II pneumocytes and vascular endothelial cells in vitro. *Microbiol. Pathogenesis.* 17: 361-374.
- Dahlqvist A (1968). Assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* 22:99-107.
- Dai D y Walker W A (1999). Role of bacterial colonization in neonatal necrotizing enterocolitis and its prevention. *Acta Paediatr. Sin.* 39:357-365.
- Dai D, Nanthkumar N N, Newburg D S y Walker W A (2000). Role of oligosaccharides in intestinal host defense. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30 Suppl 2:S23-S33.
- Dandriofosse G, Peulen O, El Kheff N, Deloyer P, Dandriofosse A C y Grandfils C (2000). Are milk polyamines preventive agents against food allergy?. *Proc. Nutr. Soc.* 59(1):81-86.
- Davidson L A y Lonnerdal B (1987). Persistence of human milk proteins in the breast fed infant. *Acta Paediatr. Scand.* 76:733-740.
- Dignass A U y Sturm A (2001). Peptide growth factors in the intestine. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13:763-770.
- DiLeo A J, Allegrezza A E y Builder S E (1992). High resolution removal of virus from protein solutions using a membrane of unique structure. *Bio/Technol.* 10:182-188.

- Duguid J P y Gillies R R (1957). Fimbriae and adhesive properties of dysentery bacilli. *J. Pathol. Bacteriol.* 74:397-411.
- Egge H y Peter-Katalinic J (2002). Fast atom bombardment mass spectrometry for structural elucidation of glycoconjugates. *Mass Spectrum Rev.* 21:108-144.
- Emödy L, Carlsson A, Ljungh A y Wadström T (1988). Mannose-resistant Haemagglutination by *Campylobacter pylori*. *Scand. J. Infect. Dis.* 20:353-354.
- Engfer M B, Stahl B, Finke B, Sawatzki G y Daniel H (2000). Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1589-1596.
- Erney R, Hilty M, Pickering L, Ruiz-Palacios G y Prieto P (2001). Human milk oligosaccharides: a novel method provides insight into human genetics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 501:285-297.
- Evans D G, Evans D J, Moulds J J y Graham D Y (1988). N-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutination of *Campylobacter pylori*: A putative colonization factor antigen. *Infect. Immun.* 56:2896-2906.
- Faure M, Moennoz D, Montigon F, Fay L B, Breuille D, Finot P A, Balleve O and Boza J (2002). Development of a rapid and convenient method to purify mucins and determine their in vivo synthesis rate in rats. *Anal. Biochem.* 307:244-251.
- Faure M, Moennoz D, Montigon F, Mettraux C, Mercier S, Schiffrin E J, Obled C, Breuille D y Boza J (2003). Mucin production and composition is altered in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig. Dis. Sci.* 48:1366-1373.
- Franklin C J, Martínez F, Borroto J, López L y Sánchez R (1989). Patente CU 22269 A1. Recobrado de uranilo de agua de mar y las salmueras.
- Fransson G B y Lonnerdal B (1980). Iron in human milk. *J. Pediatr.* 96:380-384.
- George D E y Defrancesca B A (1989). Human milk in comparison to cow milk. En: Lebenthal, E. (ed.). *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy*, 2th edn. Raven Press, Nueva York, págs 239-260.
- Gésan-Guiziu G, Daufin G, Timmer M, Allersma D y Van der Horst C (1999). Process steps for the preparation of purified fractions of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from whey protein concentrates. *J. Dairy Res.* 66:225-236.
- Ghosh R y Cui Z F (1998). Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: effect of pH and membrane pretreatment. *J. Memb. Sci.* 139:17-28.

- Ghosh R, Li Q y Cui Z (1998). Fractionation of BSA and Lysozyme using ultrafiltration: effect of gas sparging. *AIChE Journal*. 44:61-67.
- Ghosh R y Cui Z (2000a). Purification of lysozyme using ultrafiltration. *Biotechnol. Bioeng.* 68:191-203.
- Ghosh R y Cui Z (2000b). Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membranes. *J. Memb. Sci.* 167:47-53.
- Gil A y Sánchez-Medina F (1982). Acid-soluble nucleotides of human milk at different stages of lactation. *J. Dairy Res.* 49(2):301-307.
- Gil A y Valverde L (1985). Patente US4544559. Nucleotide enriched humanized milk and process for its preparation.
- Gil A, Pita M, Martinez A, Molina J A y Sanchez-Medina F (1986). Effect of dietary nucleotides on the plasma fatty acids in at-term neonates. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* 40(3):185-195.
- Gil A y Uauy R (1995). Nucleotides and related compounds in human and bovine milks. En: Jensen, R.G. (ed). *Handbook of Milk Composition*, Academic Press, Nueva York, pags 436-464.
- Gnoth M J, Kunz C, Kinne-Saffran E y Rudloff S (2000). Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *J. Nutr.* 130:3014-3020.
- Gnoth M J, Rudloff S, Kunz C and Kinne R H K (2001). In vitro transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel HPLC-MS technique. *J. Biol. Chem.* 276(37):34363-70.
- Goldman A S (2000). Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. *J. Nutr.* 130:426S-431S.
- Goldstein R, Klein T, Freier S y Menczel J (1970). Alkaline phosphatase and disaccharidase activities in the rat intestine from birth to weaning. Effect of diet on enzyme development. *Am. J. Clin. Nutr.* 24:1224-1231.
- González-Tello P, Camacho F, Jurado E, Páez M P y Guadix E M (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. *Biotechnol. Bioeng.* 44:523-528.
- Goulas A K, Kapasakalidis P G, Sinclair H R, Rastall R A y Grandison A S (2002). Purification of oligosaccharides by nanofiltration. *J. Memb. Sci.* 209:321-335.

- Gouyer V, Leteurtre E, Delmotte P, Steelant WF, Krzewinski-Recchi M A, Zanetta J P, Lesuffleur T, Trugnan G, Delannoy P y Huet G (2001a). Differential effect of GalNAc- $\alpha$ -O-bn on intracellular trafficking in enterocytic HT-29 and Caco-2 cells: correlation with the glycosyltransferase expression pattern. *J. Cell. Sci.* 114: 1455-1471.
- Gouyer V, Wiede A, Buisine M P, Dekeyser S, Moreau O, Lesuffleur T, Hoffmann W y Huet G (2001b). Specific secretion of gel-forming mucins and TFF peptides in HT-29 cells of mucin-secreting phenotype. *Biochim. Biophys. Acta.* 1539: 71-84.
- Gouyer V, Leteurtre E, Zanetta J P, Lesuffleur T, Delannoy P y Huet G (2001c). Inhibition of the glycosylation and alteration in the intracellular trafficking of mucins and other glycoproteins by GalNAc- $\alpha$ -O-bn in mucosal cell lines: an effect mediated through the intracellular synthesis of complex GalNAc- $\alpha$ -O-bn oligosaccharides. *Front. Biosci.* 6:D1235-1244.
- Grangeon A y Lescoche P (2000). Flat ceramic membranas for the treatment of dairy products: comparison with tubular ceramic membranas. *Lait.* 80:5-14.
- Grönberg G, Lipniunas P, Lunggren T, Lindh F y Nilsson B (1992). Structural analysis of five new monosialylated oligosaccharides from human milk. *Arch. Biochem. Biophys.* 296: 597-610.
- Guadix A (2001). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Guarner F (2002). The colon as an organ: habitat of bacterial flora. *Nutr. Hosp. Suppl* 2:7-10.
- Guarner F y Malagelada J R (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* 361:512-519.
- Haataja S, Tikkanen K, Liukkonen J, Francois-Gerard C y Finne J (1993). Characterization of a novel bacterial adhesion specificity of *Streptococcus suis* recognizing blood group P receptor oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 268:4311-4317.
- Hanson L A y Korotkova M (2002). The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. *Semin. Neonatol.* 7(4):275-281.
- Hirno S, Kelm S, Schauer R, Nilsson B y Wadström T (1996). Adhesion of *Helicobacter pylori* strains to  $\alpha$ -2,3-linked sialic acids. *Glycoconjugate J.* 13:1005-1011.
- Hollander D (1999). Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 1:410-416.

- Holmgren J, Svennerholm A M y Lindblad M (1983). Receptor-like glycoconpounds in human milk that inhibit classical and E1 Tor *Vibrio cholerae* cell adherence (hemagglutination). *Infect. Immun.* 40:563-569.
- Howell J A, Wu D y Field R W (1999). Transmission of bovine albumin under controlled flux ultrafiltration. *J. Memb. Sci.* 152:117-127.
- Huet G, Hennebicq-Reig S, de Bolos C, Ulloa F, Lesuffleur T, Barbat A, Carriere V, Kim I, Real F X, Delannoy P y Zweibaum A (1998). GalNAc- $\alpha$ -O-benzyl inhibits NeAc- $\alpha$ -(2-3) glycosylation and blocks the intracellular transport of apical glycoproteins and mucus in differentiated HT-29 cells. *J. Cell. Biol.* 141:1311-1322.
- Hutchens T W, Henry J F y Yip T T (1991). Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human milk preterm infants. Evaluation by stable isotopic enrichment. *Pediatr. Res.* 29:243-250.
- Idota T, Kawakami H, Murakami Y y Sugawara M (1995). Inhibition of cholera toxin by human milk fractions and sialyllactose. *Biosc. Biotech. Biochem.* 59:417-419.
- Imaizumi T, Itaya H, Fujita K, Kudoh D, Kudoh S, Mori K, Fujimoto K, Matsumiya T, Yoshida H y Satoh K (2000). Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or Interleukin-1. *Arterioscl., Thromb. and Vasc. Biol.* 20:410-415.
- Jaffrin M Y, Ding L H, Couvreur Ch y Khari P (1997). Effect of ethanol on ultrafiltration of bovine albumin solutions with organic membranes. *J. Memb. Sci.* 124:233-241.
- Jankovic B D y Maric D (1990). In vivo modulation of the immune system by enkephalins. *Int. J. Neurosci.* 51:167-169.
- Jenab M y Thompson L U (2000). Phytic acid in wheat bran affects colon morphology, cell differentiation and apoptosis. *Carcinogenesis.* 21:1547-1552.
- Jensen R G (1995). Handbook of Milk Composition. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- Jiménez J, Boza J J, Suárez M D y Gil A (1992). Changes in fatty acid profiles of red blood cell membranes mediated by dietary nucleotides in weanling rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 14:293-299.
- Jolles P, Levy-Toledano S, Fiat A M, Soria C, Gillesen D, Thomaidis A, Dunn F W y Caen J P (1986). Analogy between fibrinogen and casein. Effect on an undecapeptide isolated from  $\kappa$ -casein on platelet function. *Eur. J. Biochem.* 158(2):379-382.

- Jones D A, McIntire L V, Smith C W y Picker L J (1994). A two-step adhesion cascade for T-cell/endothelial cell interactions under flow conditions. *J. Clin. Invest.* 94:2443-2450.
- Kalliomaki M, Ouwehand A, Arvilommi H, Kero P y Isolauri E (1999). Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early stage. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104(6):1251-1257.
- Kaplanski G, Farnarier C, Tissot O, Pierres A, Benoliel A, Alessi M, Kaplanski S y Bongrand P (1993). Granulocyte-endothelium initial adhesion. *Biophys. J.* 64:1922:1933.
- Knights R J (1985). Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates. En: *Nutrition for station needs in infance protein hydrolysates* (Lisshlpz F, ed.). Pags: 105-115.
- Koldovsky O y Strbak V (1995). Hormones and growth factors in human milk. En: Jensen, R. G. (ed). *Handbook of Milk Composition*, Academic Press, Nueva York, pags 436-464.
- Kunz C y Rudloff S (1993). Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr.* 88:903-912.
- Kunz C, Rudloff S, Hintelmann A, Pohlentz G y Egge H (1996). High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 685:211-221.
- Kunz C, Rodríguez-Palmero M, Koletzko B y Jensen R (1999 a). Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clin. Perinatol.* 26:307-333. Review.
- Kunz C, Rudloff S, Schad W y Braun D (1999 b). Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *Br. J. Nutr.* 82:391-399.
- Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N y Strobel S (2000). Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 20:699-722. Review.
- Kuo C, Takahashi N, Swanson A F, Ozeki y Hakomori S (1996). An N-linked High-mannose Type Oligosaccharide, Expressed at the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia trachomatis*, Mediates Attachment and Infectivity of the Microorganism to HeLa Cells. *J. Clin. Invest.* 98(12):2813-2818.
- Kurnik R T, Yu A W, Blank G S, Burton A R, Smith D, Athalye A M y van Reis R (1995). Buffer exchange using size exclusion chromatography, countercurrent dialysis, and tangential flow filtration: Models, development, and industrial applications. *Biotechnol. Bioeng.* 45:149-157.

- Kuwata H, Yip T T, Tomita M y Hutchens T W (1998). Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1429(1):129-141.
- Laemmli U K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(259):680-685.
- Lahov E y Regelson W (1996). Antibacterial and stimulating casein-derives substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxic.* 34:131-145.
- Lapointe J F, Gauthier S F, Pouliot Y y Bouchard C (2003). Effect of hydrodynamic conditions on fractionation of  $\beta$ -lactoglobulin tryptic peptides using nanofiltration membranes. *J. Memb. Sci.* 212:55-67.
- Larive C K, Lunte S M, Zhong M, Perkins M D, Wilson G S, Gokulrangan G, Williams T, Afroz F, Schöneich C, Derrick T, Russell Middaugh C y Bogdanowich-Knipp S (1999). Separation and Analysis of Peptides and Proteins. *Analytical Chemistry* 71:389R-423R.
- Lasky L A (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu. Rev. Biochem.* 64:113-139.
- Lawrence M B y Springer T A (1991). Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell.* 65:859-873.
- Lawrence M B y Springer T A (1993). Neutrophils roll on E-selectin. *J. Immunol.* 151:6338-6346.
- Leaver J y Thomson G (1993). Influence of heating and cooling on the trysinolysis of caseins in bovine milk. *Milchwiss.* 48:378-382.
- Lentsch S, Aimar P y Orozco J L (1993). Separation of albumin-PEG: Transmission of PEG through ultrafiltration membranes. *Biotechnol. Bioeng.* 41:1039-1047.
- Liu D, Hairy I, Karayiannakis A J, Widing J, Chinery R, Kmiot W, McCrea P D, Gullick W J y Pignatelli M (1997). Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor respond by intestinal growth factor. *Lab. Invest.* 77:557-563.
- Liukkonen J, Haataja S, Tikkanen K, Kelm S y Finne J (1992). Identification of N-acetylneuraminyl  $\alpha$ -2,3 poly-N-acetyllactosamine glycans as the receptors of sialic acid binding *Streptococcus suis* strains. *J. Biol. Chem.* 267:21105-21111.

- Lonnerdal B, Forsum E y Hambreus L (1976). A longitudinal study of the protein, nitrogen and lactose contents of human milk from Swedish well-nourished mothers. *Am. J. Clin. Nutr.* 29:1127-1133.
- Lonnerdal B (1997). Lactoferrin. *Anales Nestlé.* 54(3)89-98.
- Loser C, Eisel A, Harms D y Folsch U R (1999). Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut.* 44:12-16.
- Loveless R W y Feizi T (1989). Sialo-oligosaccharide receptor for *Micoplasma pneumoniae* and related oligosaccharides of poly-N-acetyllactosamine series are polarized at the cilia and apical-microvillar domains of the ciliated cells in human bronchial epithelium. *Infect. Immun.* 57:1285-1289.
- Luscinskas F W, Kansas G S, Ding H, Pizcueta P, Schleiffenbaum B E, Tedder T F y Gimbrone M A (1994). Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4 activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin,  $\beta$ 1-integrins and  $\beta$ 2-integrins. *J. Cell Biol.* 125:1417-1427.
- Mahmoud M I, Malone W T y Cordle C T (1992). Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis antigenicity and physical properties. *J. Food Sci.* 57:1223-1229.
- Makkink M K, Schwerbrock N M, Mahler M, Boshuizen J A, Renes I B, Cornberg M, Hedrich H J, Einerhand A W, Buller H A, Wagner S, Enss M L y Dekker J (2002). Fate of goblet cells in experimental colitis. *Dig. Dis. Sci.* 47:2286-2297.
- Marcheti E (1998). Metal complexes of bovine lactoferrin inhibit in vitro replication of Herpes simplex virus type 1 and 2. *Biometals.* 11:89-94.
- Maroux S, Louvard D y Baratti J (1977). The aminopeptidase from hog intestinal brush-border. *Biochim. Biophys. Acta.* 321:282-295.
- Martínez J A, Macarulla M T y Marcos R (1992). Nutritional outcome and immunocompetence in mice fed on a diet raw field beans as the source of protein. *Br. J. Nutr.* 68:493-503.
- Martínez-Alonso S (1999). Presentación de las membranas, equipos y modos de funcionamiento. Universidad de Granada. Aula de Productos Lácteos. Instituto de Investigación y Análisis Alimentarias, Facultad de Veterinaria.

- Martínez-Férez A, Henkel C, Pohlentz G, Rudloff S, Guadix E M, Kunz C (2001). Goat milk as a source of lactose-derived oligosaccharides. Abstract number: 3246. Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB). New Orleans, EEUU.
- Martínez-Férez A, Guadix A, Baró L, Jiménez J, López E, Boza J J y Guadix E M (2003). Isolation of goat milk lactose-derived oligosaccharides by cross flow ultra and nanofiltration. 4<sup>th</sup> European Congress of Chemical Engineering (Oral Communication).
- Martínez-Valverde A, Ramírez M, Sánchez-Pozo A y Gil A (1996). Effect of dietary nucleotides on the polyunsaturated fatty acid metabolism in low birth weight neonates. En Gil A, Uauy R (eds). Nutritional and biological significance of dietary nucleotides and nucleic acids. Abbott Laboratories, Granada, pages 131-132.
- Martin-Orue C, Bouhallab S y Garem A (1998). Nanofiltration of amino acid and peptide solutions: mechanisms of separation. *J. Memb. Sci.* 142:225-233.
- Martín-Sosa S, Martín M J y Hueso P (2002). The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. *J. Nutr.* 132:3067-3072.
- Mashimo H, Wu D C, Podolsky D K y Fishman M C (1996). Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science.* 274:262-265.
- Maubois J L y Ollivier G (1992). Milk protein fractionation. *Bull. Int. Dairy Fed.* 9201:15-32.
- McEver R P (1994). Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 714:185-189.
- McVeagh P y Miller J B (1997). Human milk oligosaccharides: only the breast. *J. Paediatr. Child Health* 33: 281-286. Review.
- Mehra R K y Donnelly W J (1993). Fractionation of whey protein components through a large pore size, hydrophilic, cellulosic membrane. *J. Dairy Res.* 60:89-97.
- Meireles M, Aimar P y Sánchez V (1991). Effects of protein fouling on the apparent pore size distribution of sieving membranes. *J. Memb. Sci.* 56:13-28.
- Membrane Handbook (1992). Ed. W S Winston y K K Sirkar. Chapman y Hall, Nueva York, EEUU.

- Metges C C (2000). Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J. Nutr.* 130(7):1857S-1864S.
- Mezoff A G, Jensen N J y Cohen M B (1991). Mechanisms of increased susceptibility of immature and weaned pigs to *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Pediatr. Res.* 29:424-428.
- Miller-Podraza H, Milh M A, Bergström J y Karlsson K A (1996). Recognition of glycoconjugates by *Helicobacter pylori*: an apparently high-affinity binding of human polyglycosylceramides, a second sialic acid-based specificity. *Glycoconjugate J.* 13:453-460.
- Millesime L, Dulien J y Chanfer B (1996). Fractionation of proteins with modified membranes. *Bioseparations.* 6:135-145.
- Millipore Corporation (2003). Technical Brief.
- Milovic V y Turchanowa L (2003). Polyamines and colon cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 31(2):381-383.
- Mochizuki S y Zydney A L (1993). Theoretical analysis of pore size distribution effects on membrane transport. *J. Memb. Sci.* 82:211-227.
- Montagne L, Toullec R, Formal M y Lalles J P (2000a). Influence of dietary protein level and origin on the flow of mucin along the small intestine of the preruminant calf. *J. Dairy. Sci.* 83:2820-2828.
- Montagne L, Toullec R y Lalles J P (2000b). Calf intestinal mucin : isolation, partial characterization, and measurement in ileal digesta with an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Dairy Sci.* 83:507-517.
- Montagne P, Cuilliere M L, Mole C, Bene M C y Faure G (2001). Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 501:241-247.
- Moro E (1900). Morphologi und bakteriologisch Untersuchungen über die Darmbakterien des Säuglings: die Bakteriumflora des normalen Frauenmilchstuhls. *Jarhbuch. Kinderh.* 61:686-734.
- Moro G, Minoli I, Mosca M, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B y Boehm G (2002). Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 34(3):291-295.
- Mountzouris K C, McCartney A L y Gibson G R (2002). Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br. J. Nutr.* 87(5):405-420.

- Muller A, Daufin G y Chaufer B (1999). Ultrafiltration modes of operation for the separation of  $\alpha$ -lactalbumin from acid casein whey. *J. Memb. Sci.* 153:9-21.
- Murnane M J, Sheahan K, Ozdemirli M y Shuja S (1991). Stage-specific increases in cathepsin B messenger RNA content in human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 51(4):1137-1142.
- Murray P A, Levine M J, Tabak L A y Reddy M S (1982). Specificity of salivary-bacterial interactions: II. Evidence for a lectin on *Streptococcus sanguis* with specificity for a Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc sequence. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 106:390-396.
- Naidu A S y Arnold R R (1997). Influence of lactoferrin on host-microbe interactions. En: Hutchens, T W, Lonnerdal B (eds). Lactoferrin: interaction and biological functions, Humana Press, pags 259-275.
- Nakao S, Osada H, Kurata H, Tsuru T y Kimura S (1988). Separation of proteins by charged ultrafiltration membranas. *Desalination.* 70:191-205.
- Nakatsuka S y Michaels A S (1992). Transport and separation of proteins by ultrafiltration through sorptive and non-sorptive membranes. *J. Memb. Sci.* 69:189-211.
- Nelson R M, Dolich S, Aruffo A, Cecconi O y Bevilacqua M P (1993). Higher-affinity oligosaccharide ligands for E-selectin. *J. Clin. Invest.* 91:1157-1166.
- Neutra M R y Forstner J F (1987). Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion and function. En: Johnson L R ed. Physiology of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press, pags. 975-1009.
- Newburg D S, Chaturvedi P, Van R, Cleary T G y Pickering L K (1992). Isolation of the human milk oligosaccharide which protects mice from heat-stable enterotoxin of E. coli. *Pediatr. Res.* 31:172A.
- Newburg D S (1996). Oligosaccharides and Glycoconjugates in Human Milk: Their role in Host Defense. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 1:271-283.
- Newburg D S (1999). Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Curr. Med. Chem.* 6:117-127. Review.
- Newburg D S (2000). Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30:S2-S8.

- Nichols B L, McKee K S, Henry J F y Putman M (1987). Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.* 21:563-567.
- Nyström M, Aimar P, Luque S, Kulovaara M y Metsämuuronen S (1998). Fractionation of model proteins using their physicochemical properties. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* 138:185-205.
- Okuyama H, Urao M, Lee D, Drongowski R A y Coran A G (1998). The effect of epidermal growth factor on bacterial translocation in newborn rabbits. *J. Pediatr. Surg.* 33:225-228.
- Ouadia A, Karamanos Y y Julien R (1992). Detection of the ganglioside N-glycolyl-neuraminyl-lactosyl-ceramide by biotinylated *Escherichia coli* K99 lectin. *Glycoconjugate J.* 9:21-26.
- Palecek S P y Zydney A L (1994). Hydraulic permeability of protein deposits formed during microfiltration: effects of solution pH and ionic strength. *J. Memb. Sci.* 95:71-81.
- Parkinen J, Finne J, Achtman M, Väisänen V y Korhonen T K (1983). *Escherichia coli* strains binding neuraminil  $\alpha$ 2-3 galactosides. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 111:456-461.
- Parrado J, Millan F, Hernández-Pinzón I, Bautista J y Machado A (1993). Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 41:1821-1825.
- Pearce R J (1992). Whey protein recovery and whey protein fractionation. En: *Whey and lactose processing*, ed. J G Zadow, pags 271-316. Elsevier Applied Science, Nueva York.
- Perea A, Ugalde U, Rodríguez I y Serra J L (1993). Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversions processes. *Enzyme Microb. Technol.* 15:418-423.
- Pickering L K, Granoff D M, Erickson J R, Masor M L, Cordle C T, Schaller J P, Winship T R, Paule C L y Hilty M D (1998). Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotides. *Pediatrics.* 101(2):242-249.
- Playford R J, McDonald C E y Johnson S (2000). Colostrum and milk-derived peptide growth for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:5-14.
- Pohlentz G, Schlemm S y Egge H (1992). 1-Deoxy-1-phosphatidylethanolamino-lactitol-type neoglycolipids serve as acceptors for sialyltransferases from rat liver golgi vesicles. *Eur. J. Biochem.* 203:387-392.

- Pouliot Y, Wijers M C, Gauthier S F y Nadeau L (1999). Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. *J. Memb. Sci.* 158:105-114.
- Pujar N S y Zydney A L (1994). Electrostatic and electrokinetic interactions during protein transport through narrow pore membranes. *Ind. Eng. Chem. Res.* 33:2473-2482.
- Pujar N S y Zydney A L (1998). Electrostatic effects on protein partitioning in size-exclusion chromatography and membrane ultrafiltration. *J. of Chromatogr. A.* 796:229-238.
- Punidades P y Rizvi S H (1998). Separation of milk proteins into fractions rich in casein or whey proteins by cross flow filtration. *Food. Res. Internat.* 31:265-272
- Rafter J (2002). Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Br. J. Nutr. Suppl* 1:S89-94.
- Ramphal R, Carnoy C, Fievre S, Michalski J C, Houdret N, Lamblin G, Strecker G y Roussel P (1991). *Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrates chains containing type 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) or type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) disaccharide units. *Infect. Immun.* 59:700-704.
- Raymond H C M, van Eijndhoven R H C N, Saksena S y Zydney A L (1995). Protein fractionation using electrostatic interactions in membrane filtration. *Biotechnol. and Bioeng.* 48:406-414.
- Richter W V, Jacob B y Schwandt P (1983). Molecular weight determination of peptides by high performance gel chromatography. *Anal. Biochem.* 133:288-291.
- Robert P R y Zaloga G P (1994). Dietary bioactive peptides. *New Horizons.* 2:237-243.
- Rogers G N, Herrler G, Paulson J C y Klenk H D (1986). Influenza C virus uses 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid as high affinity receptor determinant for attachment to cells. *J. Biol. Chem.* 261:5947-5951.
- Rouse I L y Beilin L J (1994). Vegetarian diets and blood pressure. *J. Hypertension.* 2:231-240.
- Rudloff S, Stefan C, Pohlentz G y Kunz C (2002). Detection of ligands for selectins in the oligosaccharide fraction of human milk. *Eur. J. Nutr.* 41:85-92.
- Saarinen U M, Siimes M A y Dallman P R (1977). Iron absorption in infant: high bioavailability of breast-milk iron as indicated by the extrinsic tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin. *J. Pediatr.* 91:36-39.

- Saksena S y Zydney A L (1994). Effect of solution pH and ionic strength on the separation of albumin from immunoglobulins (IgG) by selective filtration. *Biotechnol. Bioeng.* 43:960-968.
- Sánchez-Díaz A, Ruano M J, Lorente F y Hueso P (1997). A critical analysis of total sialic acid and sialoglycoconjugate contents of bovine milk-based infant formulas. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 24:405-410.
- Sanderson I R, Ezzell R M, Kedinger M, Xu Z X, Pringault E, Leon-Robine S, Louvard D y Walker W A (1996). Human fetal enterocytes in vitro: modulation of the phenotype by extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 7717-7722.
- Sannier F, Lecoeur C, Zhao Q, Garreau I y Piot J M (1996). Separation of hemoglobin and myoglobin from yellowfin tuna red muscle by ultrafiltration: Effect of pH and ionic strength. *Biotechnol. Bioeng.* 52:501-506.
- Sannier F, Bordenave S y Piot J M (2000). Purification of goat beta-lactoglobulin from whey by an ultrafiltration membrane enzymatic reactor. *J. Dairy Res.* 67: 43-51.
- Sarney D B, Hale C, Frankel G y Vulfson E N (2000). A novel approach to the recovery of biologically active oligosaccharides from milk using a combination of enzymatic treatment and nanofiltration. *Biotechnol. Bioeng.* 69(4):461-467.
- Satchithanandam S, Vargofcak-Apker M, Calvert R J, Leeds A R y Cassidy M M (1990). Alteration of gastrointestinal mucin by fiber feeding in rats. *J. Nutr.* 120:1179-1184.
- Schanbacher F L, Talhouk R S, Murray F A, Gherman L I y Willett L B (1998). Milk-borne bioactive peptides. *Int. Dairy J.* 8:393-403.
- Schenkman S y Eichinger D (1993). Trypanosoma cruzi: Trans-sialidase and Cell Invasion. *Parasitology Today.* 9:218.
- Schlimme E y Meissel H (1995). Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Die Nahrung* 39:1-20.
- Schwartz L (2003). Diafiltration: A fast, efficient method for desalting, or buffer exchange of biological samples. Scientific & Technical Report. Pall Life Sciences.
- Simon P M, Goode P L, Mobasser A y Zopf D (1997). Inhibition of Helicobacter pylori binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect. Immun.* 65(2):750-757.

- Skudder P J (1985). Evaluation of a porous silica based ion-exchange medium for the production of protein fractions from rennet- and acid-whey. *J. Dairy Res.* 52:167-181.
- Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T, Mallia A K, Gartner F H, Provenzano M D, Fujimoto E K, Goeke N M, Olson B J y Klenk D C (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1):76-85.
- Smith C W, Kishimoto T K, Abbassi O, Hughes B, Rothlein R, McIntire L V, Butcher E y Anderson D C (1991). Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1) dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 87:609-618.
- Springer T A (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76(2):301-314.
- Steijns J (1996). Dietary proteins as the source of new health promoting bio-active peptides with special attention to glutamine peptide. *Food Tech. Europe.* M/A:80-84.
- Strömberg N, Marklund B I, Lund B, Ilver D, Hamers A, Gaastra W, Karlsson K A y Normark S (1990). Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal $\alpha$ 1-4Gal-containing isoreceptors. *EMBO J.* 9:2001-2010.
- Surowka K y Celej A (1996). Partitioning of protein and some trace element during 3-step ultrafiltration of skim milk through membranes of decreasing permeability. *Milchwissenschaft.* 51:426-431.
- Svensson L (1992). Group-C rotavirus requires sialic acid for erythrocyte and cell receptor binding. *J. Virol.* 66:5582-5585.
- Tanaka M, Lee K, Martínez-Augustín O, He Y, Sanderson I R y Walker W A (1996). Exogenous nucleotides alter the proliferation, differentiation and apoptosis of human small intestinal epithelium. *J. Nutr.* 126:424-433.
- Ter Steege C A, Buurman W A y Forget P P (1997). Spermine induces maturation of the immature intestinal immune system in neonatal mice. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 25(3):332-340.
- Truskey G A y Pirone J S (1990). The effect of fluid shear stress upon cell adhesion to fibronectin-treated surfaces. *J. Biomed. Matl. Res.* 24:1333-1353.
- Tsuru T, Shutou T, Nakao S y Kimura S (1994). Peptide and aminoacid separation with nanofiltration membranes. *Separ. Sci. and Technol.* 29:971-984.

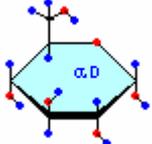
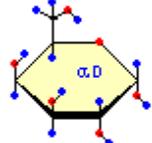
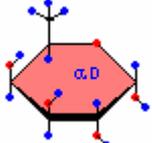
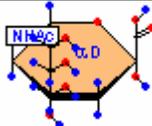
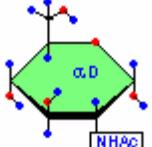
- Tyrell D, James P, Rao N, Foxall C, Abbas S, Kiso M, Asa D, Kidd J y Brandley B K (1991). Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 10372-10376.
- Uauy R (1989). Dietary nucleotides and requirements in early life. En: Lebenthal ed. Textbook of gastroenterology and nutrition, Raven Press, Nueva York, pags 265-280.
- Ulber R, Plate K, Weiss T, Demmer W, Buchholz H y Scheper T (2001). Downstream processing of bovine lactoferrin from sweet whey. *Acta Biotechnol.* 21:27-34.
- Vahouny G V, Le T, Ifrim I, Satchithanandam S y Cassidy M M (1985). Stimulation of intestinal cytokinetics and mucin turnover in rats fed wheat bran or cellulose. *Am. J. Clin. Nutr.* 41:895-900.
- Van Reis R, Gadam S, Frautschy L N, Orlando S, Goodrich E M, Saksena S, Kuriyel R, Simpson C M, Pearl S y Zydney A L (1997). High Performance Tangential Flow Filtration. *Biotechnol. Bioeng.* 56:71-82.
- Van Reis R, Brake J M, Charkoudian J, Burns D B y Zydney A L (1999). High-performance tangential flow filtration using charged membranes. *J. Memb. Sci.* 159:133-142.
- Varki A (1994). Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 7390-7397.
- Vellenga E y Trägårdh G (1998). Nanofiltration of combined salt and sugar solutions: coupling between retentions. *Desalination.* 120:211-220.
- Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P y Petocz P (2001). Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:510-515.
- Wang B y Brand-Miller J (2003). The role and potential of sialic acid in human nutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57:1351-1369.
- Warren C D, Chaturvedi P, Newburg A R, Oftedal O T, Tilden C D y Newburg D S (2001). Comparison of oligosaccharides in milk specimens from humans and twelve other species. *Adv. Exp. Med. Biol.* 501:325-332.
- Wechezak A R, Wright T N, Viggers R F y Sauvage L R (1989). Endothelial adherence under shear stress is dependent upon microfilament reorganization. *J. Cell. Physiol.* 139:136-146.
- Weis W, Brown J H, Cusack S, Paulson J C, Skehel J J y Wiley D C (1988). Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature.* 333:426-431.

Yi J Y, Kim T Y, Shim J H, Cho B K y Kim C W (1997). Histopathological findings, viral DNA distribution and lymphocytic immunophenotypes in vesicular and papular types of herpes zoster. *Acta Derm. Venereol.* 77(3):194-197.

Zydney A L (1998). Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. *Int. Dairy J.* 8: 243-250.

## **11. APENDICE.**

APÉNDICE 11.1. Monosacáridos constituyentes de los oligosacáridos detectados.

<b>Nombre químico</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Estructura química</b>	<b>Peso molecular (Da)</b>
Glucosa	Glc	 <p>The image shows the Haworth projection of alpha-D-glucopyranose. The pyranose ring is light blue. The anomeric carbon (C1) is in the alpha position, with the hydroxyl group pointing down. The other hydroxyl groups are in their respective positions: C2 (up), C3 (down), C4 (up), and C5 (down). The oxygen atom of the ring is at the top right.</p>	180,16
Galactosa	Gal	 <p>The image shows the Haworth projection of alpha-D-galactopyranose. The pyranose ring is light yellow. The anomeric carbon (C1) is in the alpha position, with the hydroxyl group pointing down. The hydroxyl groups at C2 and C3 are swapped compared to glucose: C2 (down) and C3 (up). C4 (up) and C5 (down) remain the same.</p>	180,16
Fucosa	Fuc	 <p>The image shows the Haworth projection of alpha-D-fucopyranose. The pyranose ring is light red. The anomeric carbon (C1) is in the alpha position, with the hydroxyl group pointing down. The hydroxyl groups at C2 and C3 are swapped compared to glucose: C2 (down) and C3 (up). C4 (down) and C5 (down) are also swapped compared to glucose.</p>	164,16
Ácido siálico	NeuAc	 <p>The image shows the Haworth projection of N-acetylneuraminic acid (NeuAc). The pyranose ring is light orange. The anomeric carbon (C1) is in the alpha position, with the hydroxyl group pointing down. It features a complex side chain at C2, including a methyl group, an amide group (NHAc), and a sialic acid moiety. The hydroxyl groups at C3, C4, and C5 are in their respective positions.</p>	309,28
N-acetil-glucosamina	GlcNAc	 <p>The image shows the Haworth projection of N-acetylglucosamine (GlcNAc). The pyranose ring is light green. The anomeric carbon (C1) is in the alpha position, with the hydroxyl group pointing down. The hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C5 are in their respective positions. An acetamido group (NHAc) is attached to the C2 carbon.</p>	221,21

APÉNDICE 11.2. Oligosacáridos neutros identificados en leche humana.

Nombre químico	Estructura química	PM (Da)	Referencia
2-Fucosil-Lactosa	Fuc $\alpha$ (1-2) Gal $\beta$ (1-4) Glc	488,44	Kuhn <i>et al</i> , 1956
3-Fucosil-Lactosa	Gal $\beta$ (1-4) Glc   Fuc $\alpha$ (1-3)	488,44	Montreuil, 1956
Di-Fucosil-Lactosa	Fuc $\alpha$ (1-2) Gal $\beta$ (1-4) Glc   Fuc $\alpha$ (1-3)	634,59	Kuhn y Gauhe, 1958
Lacto-N-Tetraosa	Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	707,64	Kuhn y Baer, 1956
Lacto-N-neoTetraosa	Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	707,64	Kuhn y Baer, 1962
Lacto-N-Fucopentaosa I	Fuc $\alpha$ (1-2) Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	853,78	Kuhn <i>et al</i> , 1956
Lacto-N-Fucopentaosa II	Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc   Fuc $\alpha$ (1-4)	853,78	Kuhn <i>et al</i> , 1958
Lacto-N-Fucopentaosa III	Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc   Fuc $\alpha$ (1-3)	853,78	Kobata y Ginsburg, 1969
Lacto-N-Fucopentaosa V	Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc   Fuc $\alpha$ (1-3)	853,78	Ginsburg <i>et al</i> , 1976
Lacto-N-Difucohexaosa I	Fuc $\alpha$ (1-2) Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc   Fuc $\alpha$ (1-4)	999,92	Kuhn y Gauhe, 1958
Lacto-N-Difucohexaosa II	Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc   Fuc $\alpha$ (1-4)        Fuc $\alpha$ (1-3)	999,92	Kuhn y Gauhe, 1960
Lacto-N-Hexaosa	Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-6) } Gal $\beta$ (1-4) Glc Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3) }	1072,97	Kobata y Ginsburg, 1972
Lacto-N-neoHexaosa	Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-6) } Gal $\beta$ (1-4) Glc Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-3) }	1072,97	Kobata y Ginsburg, 1972

APÉNDICE 11.2. Oligosacáridos neutros identificados en leche humana (Continuación).

Nombre químico	Estructura química	PM (Da)	Referencia
Para-Lacto-N-Hexaosa	Gal β(1-3) GlcNAc β(1-3) Gal β(1-4) GlcNAc β(1-3) Gal β(1-4) Glc	1072,97	Sabharwal <i>et al</i> , 1988
Para-Lacto-N-neoHexaosa	Gal β(1-4) GlcNAc β(1-3) Gal β(1-4) GlcNAc β(1-3) Gal β(1-4) Glc	1072,97	Yamashita <i>et al</i> , 1977
Fucosil-Lacto-N-Hexaosa I	Gal β(1-4) GlcNAc β(1-6) \ Gal β(1-4) Glc Fuc α(1-2) Gal β(1-3) GlcNAc β(1-3) /	1219,12	Yamashita <i>et al</i> , 1977
Fucosil-Lacto-N-Hexaosa II	Fuc α(1-3) Gal β(1-4) GlcNAc β(1-6) \ Gal β(1-4) Glc Gal β(1-3) GlcNAc β(1-3) /	1219,12	Dua <i>et al</i> , 1985
Fucosil-Lacto-N-neoHexaosa	Gal β(1-4) GlcNAc β(1-6) \ Gal β(1-4) Glc Fuc α(1-2) Gal β(1-4) GlcNAc β(1-3) /	1219,12	Kobata y Ginsburg, 1972
Fucosil-para-Lacto-N-Hexaosa	Gal β(1-3) GlcNAc β(1-3) Gal β(1-4) GlcNAc β(1-3) Gal β(1-4) Glc Fuc α(1-3)	1219,12	Sabharwal <i>et al</i> , 1988
Di-Fucosil-Lacto-N-Hexaosa	Fuc α(1-3) Gal β(1-4) GlcNAc β(1-6) \ Gal β(1-4) Glc Gal β(1-3) GlcNAc β(1-3) / Fuc α(1-4)	1365,26	Dua <i>et al</i> , 1985
Di-Fucosil-Lacto-N-Hexaosa a	Fuc α(1-3) Gal β(1-4) GlcNAc β(1-6) \ Gal β(1-4) Glc Fuc α(1-2) Gal β(1-3) GlcNAc β(1-3) /	1356,26	Yamashita <i>et al</i> , 1977
Di-Fucosil-Lacto-N-neoHexaosa	Fuc α(1-3) Gal β(1-4) GlcNAc β(1-6) \ Gal β(1-4) Glc Gal β(1-4) GlcNAc β(1-3) / Fuc α(1-3)	1356,26	Haeuw-Fievre <i>et al</i> , 1993
Di-Fucosil-para-Lacto-N-Hexaosa	Gal β(1-3) GlcNAc β(1-3) Gal β(1-4) GlcNAc β(1-3) Gal β(1-4) Glc Fuc α(1-4) Fuc α(1-3)	1356,26	Yamashita <i>et al</i> , 1977

Nombre químico	Estructura química	PM (Da)	Referencia
Di-Fucosil-para-Lacto-N-neoHexaosa	$\begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\ \text{Fuc } \alpha(1-3) \qquad \qquad \text{Fuc } \alpha(1-3) \end{array}$	1356,26	Yamashita <i>et al</i> , 1977
Tri-Fucosil-Lacto-N-Hexaosa	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1-3) \\   \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\   \\ \text{Fuc } \alpha(1-2) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \end{array}$ $\text{Fuc } \alpha(1-4)$	1511,40	Sabharwal <i>et al</i> , 1988
Tri-Fucosil-para-Lacto-N-Hexaosa	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1-2) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\ \text{Fuc } \alpha(1-4) \qquad \qquad \text{Fuc } \alpha(1-3) \end{array}$	1511,40	Strecker <i>et al</i> , 1988
Lacto-N-Octaosa	$\begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\   \\ \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \end{array}$	1438,31	Yamashita <i>et al</i> , 1976
Lacto-N-neoOctaosa	$\begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\   \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \end{array}$	1438,31	Yamashita <i>et al</i> , 1976
Iso-Lacto-N-Octaosa	$\begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\   \\ \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \end{array}$	1438,31	Yamashita <i>et al</i> , 1976
Para-Lacto-N-Octaosa	$\text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ Glc}$	1438,31	Haeuw-Fievre <i>et al</i> , 1993
Fucosil-Lacto-N-Octaosa	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1-3) \\   \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\   \\ \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \end{array}$	1584,46	Yamashita <i>et al</i> , 1976
Fucosil-Lacto-N-neoOctaosa	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1-3) \\   \\ \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\   \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \end{array}$	1584,46	Yamashita <i>et al</i> , 1976
Di-Fucosil-Lacto-N-Octaosa I	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1-3) \qquad \qquad \text{Fuc } \alpha(1-3) \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \end{array}$	1730,60	Tachibana <i>et al</i> , 1978
Di-Fucosil-Lacto-N-neoOctaosa I	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1-4) \qquad \qquad \text{Fuc } \alpha(1-3) \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \end{array}$	1730,60	Tachibana <i>et al</i> , 1978

APÉNDICE 11.2. Oligosacáridos neutros identificados en leche humana (Continuación).

Nombre químico	Estructura química	PM (Da)	Referencia
Di-Fucosil-Lacto-N-Octaosa II	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1-\beta) \\    \\  \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\    \qquad \qquad \qquad   \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \qquad \qquad \qquad \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\    \\  \text{Fuc } \alpha(1-4)  \end{array}  $	1730,60	Tachibana <i>et al</i> , 1978
Di-Fucosil-Lacto-neoOctaosa II	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1-3) \\    \\  \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\    \qquad \qquad \qquad   \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \qquad \qquad \qquad \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\    \\  \text{Fuc } \alpha(1-3)  \end{array}  $	1730,60	Tachibana <i>et al</i> , 1978
Tri-Fucosil-Lacto-N-Octaosa	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1-3) \qquad \text{Fuc } \alpha(1-3) \\    \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\    \qquad \qquad \qquad   \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \qquad \qquad \qquad \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\    \\  \text{Fuc } \alpha(1-4)  \end{array}  $	1876,74	Tachibana <i>et al</i> , 1978
Tri-Fucosil-Lacto-neoOctaosa	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1-4) \qquad \text{Fuc } \alpha(1-3) \\    \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\    \qquad \qquad \qquad   \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \qquad \qquad \qquad \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\    \\  \text{Fuc } \alpha(1-3)  \end{array}  $	1876,74	Tachibana <i>et al</i> , 1978
Tri-Fucosil-isoLacto-N-Octaosa	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1-3) \\    \\  \text{Fuc } \alpha(1-2) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\    \qquad \qquad \qquad   \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Fuc } \alpha(1-2) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \qquad \qquad \qquad \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\    \\  \text{Fuc } \alpha(1-4)  \end{array}  $	1876,74	Strecker <i>et al</i> , 1992
Tetra-Fucosil-isoLacto-N-Octaosa	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1-3) \\    \\  \text{Fuc } \alpha(1-2) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\    \qquad \qquad \qquad   \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Fuc } \alpha(1-2) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \qquad \qquad \qquad \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\    \\  \text{Fuc } \alpha(1-4)  \end{array}  $	2022,88	Haeuw-Fievre <i>et al</i> , 1993
Tetra-Fucosil-paraLacto-N-Octaosa	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1-2) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\    \qquad \qquad \qquad   \qquad \qquad \qquad   \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Fuc } \alpha(1-4) \qquad \text{Fuc } \alpha(1-4) \qquad \text{Fuc } \alpha(1-4)  \end{array}  $	2022,88	Haeuw-Fievre <i>et al</i> , 1993
Penta-Fucosil-isoLacto-N-Octaosa	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1-4) \qquad \text{Fuc } \alpha(1-3) \\    \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Fuc } \alpha(1-2) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\    \qquad \qquad \qquad   \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Fuc } \alpha(1-2) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \qquad \qquad \qquad \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\    \\  \text{Fuc } \alpha(1-4)  \end{array}  $	2169,03	Haeuw-Fievre <i>et al</i> , 1993
Lacto-N-Decaosa	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1-3) \\    \\  \text{Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\    \qquad \qquad \qquad   \qquad \qquad \qquad   \\  \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \qquad \qquad \qquad \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc}  \end{array}  $	1584,46	Yamashita <i>et al</i> , 1976

Nombre químico	Estructura química	P.M. (Da)	Referencia
3-Galactosil-Lactosa	Gal $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	504,44	Donald y Feeney, 1988
4-Galactosil-Lactosa	Gal $\beta$ (1-4) Gal $\beta$ (1-4) Glc	504,44	Snow Brand Co., 1995
6-Galactosil-Lactosa	Gal $\beta$ (1-6) Gal $\beta$ (1-4) Glc	504,44	Yamashita y Kobata, 1974

APÉNDICE 11.3. Oligosacáridos monosíalicos identificados en leche humana.

Nombre químico	Estructura química	P.M. (Da)	Referencia
3-Sialil-Lactosa	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	633,56	Kuhn y Brossmer, 1959
6-Sialil-Lactosa	NeuAc $\alpha$ (2-6) Gal $\beta$ (1-4) Glc	633,56	Kuhn, 1959
Fucosil-Sialil-Lactosa	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc   Fuc $\alpha$ (1-3)	779,70	Grönberg <i>et al</i> , 1989
Sialil-Lacto-N-Tetraosa a	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	998,90	Kuhn y Gauhe, 1962
Sialil-Lacto-N-Tetraosa b	NeuAc $\alpha$ (2-6)   Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	998,90	Kuhn y Gauhe, 1962
Sialil-Lacto-N-Tetraosa c	NeuAc $\alpha$ (2-6) Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	998,90	Kuhn y Gauhe, 1962
Fucosil-Sialil-Lacto-N-Tetraosa a	NeuAc $\alpha$ (2-3) Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc   Fuc $\alpha$ (1-4)	1145,04	Wieruszkeski <i>et al</i> , 1985
Fucosil-Sialil-Lacto-N-Tetraosa b	NeuAc $\alpha$ (2-6)   Fuc $\alpha$ (1-2) Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc	1145,04	Wieruszkeski <i>et al</i> , 1985
Fucosil-Sialil-Lacto-N-Tetraosa c	NeuAc $\alpha$ (2-6) Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-3) Gal $\beta$ (1-4) Glc   Fuc $\alpha$ (1-4)	1145,04	Smith <i>et al</i> , 1987
Sialil-Lacto-N-Hexaosa	NeuAc $\alpha$ (2-6) Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-6) Gal $\beta$ (1-4) Glc Gal $\beta$ (1-3) GlcNAc $\beta$ (1-3)	1364,23	Kobata y Ginsburg, 1972
Sialil-Lacto-N-neoHexaosa I	NeuAc $\alpha$ (2-6) Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-6) Gal $\beta$ (1-4) Glc Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-3)	1364,23	Kobata y Ginsburg, 1972
Sialil-Lacto-N-neoHexaosa II	Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-6) Gal $\beta$ (1-4) Glc NeuAc $\alpha$ (2-6) Gal $\beta$ (1-4) GlcNAc $\beta$ (1-3)	1364,23	Grönberg <i>et al</i> , 1989

Nombre químico	Estructura química	PM (Da)	Referencia
Fucosil-Sialil-Lacto-N-Hexaosa I	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}\beta) \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}6) \diagdown \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{Glc} \diagup \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}3) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \\  \text{NeuAc } \alpha(2\text{-}6)  \end{array}  $	1510,38	Grönberg <i>et al</i> , 1992
Fucosil-Sialil-Lacto-N-Hexaosa II	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}3) \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}6) \diagdown \\  \text{NeuAc } \alpha(2\text{-}3) \text{Gal } \beta(1\text{-}3) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \diagup \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{Glc}  \end{array}  $	1510,38	Grönberg <i>et al</i> , 1992
Fucosil-Sialil-Lacto-N-Hexaosa III	$  \begin{array}{c}  \text{NeuAc } \alpha(2\text{-}6) \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}6) \diagdown \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}3) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \diagup \\  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}4) \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{Glc}  \end{array}  $	1510,38	Grönberg <i>et al</i> , 1992
Fucosil-Sialil-Lacto-N-neoHexaosa I	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}3) \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}6) \diagdown \\  \text{NeuAc } \alpha(2\text{-}6) \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \diagup \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{Glc}  \end{array}  $	1510,38	Grönberg <i>et al</i> , 1989
Fucosil-Sialil-Lacto-N-neoHexaosa II	$  \begin{array}{c}  \text{NeuAc } \alpha(2\text{-}6) \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}6) \diagdown \\  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}2) \text{Gal } \beta(1\text{-}3) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \diagup \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{Glc}  \end{array}  $	1510,38	Kobata y Ginsburg, 1972
Di-Fucosil-Sialil-Lacto-N-Hexaosa	$  \begin{array}{c}  \text{NeuAc } \alpha(2\text{-}6) \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}6) \diagdown \\  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}2) \text{Gal } \beta(1\text{-}3) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \diagup \\  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}4) \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{Glc}  \end{array}  $	1656,52	Grönberg <i>et al</i> , 1992
Di-Fucosil-Sialil-Lacto-N-neoHexaosa	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}3) \\  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}2) \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}6) \diagdown \\  \text{NeuAc } \alpha(2\text{-}6) \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \diagup \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{Glc}  \end{array}  $	1656,52	Grönberg <i>et al</i> , 1992
Fucosil-Sialil-Lacto-N-Octaosa	$  \begin{array}{c}  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}6) \diagdown \\  \text{NeuAc } \alpha(2\text{-}3) \text{Gal } \beta(1\text{-}3) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \diagup \\  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}4) \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{Glc}  \end{array}  $	1875,71	Kitagawa <i>et al</i> , 1993
Tri-Fucosil-Sialil-isoLacto-N-Octaosa	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}3) \\  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}2) \text{Gal } \beta(1\text{-}3) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}6) \diagdown \\  \text{NeuAc } \alpha(2\text{-}3) \text{Gal } \beta(1\text{-}3) \text{GlcNAc } \beta(1\text{-}3) \diagup \\  \text{Fuc } \alpha(1\text{-}4) \\  \text{Gal } \beta(1\text{-}4) \text{Glc}  \end{array}  $	2168,00	Kitagawa <i>et al</i> , 1993

APÉNDICE 11.3. Oligosacáridos monosíalicos identificados en leche humana (Continuación).

Nombre químico	Estructura química	PM (Da)	Referencia
---	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1-4) \\   \\ \text{NeuAc } \alpha(2-3) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc} \end{array}$	820,75	Kitagawa <i>et al</i> , 1990
---	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1-4) \\   \\ \text{NeuAc } \alpha(2-3) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal} \end{array}$	982,90	Kitagawa <i>et al</i> , 1990
---	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1-3) \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \diagdown \\ \text{NeuAc } \alpha(2-3) \text{ Gal } \beta(1-3) \diagup \end{array} \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ Glc}$	1307,18	Grönberg <i>et al</i> , 1992

APÉNDICE 11.4. Oligosacáridos ácidos, di- y trisiálicos identificados en leche humana.

Nombre químico	Estructura química	PM (Da)	Referencia
Di-Sialil-Lacto-N-Tetraosa	$\begin{array}{c} \text{NeuAc } \alpha(2-6) \\   \\ \text{NeuAc } \alpha(2-3) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \end{array}$	1290,16	Grimmonprez y Montreuil, 1968
Fucosil-Di-Sialil-Lacto-N-Tetraosa	$\begin{array}{c} \text{NeuAc } \alpha(2-6) \\   \\ \text{NeuAc } \alpha(2-3) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ Glc} \\   \\ \text{Fuc } \alpha(1-4) \end{array}$	1436,30	Kitagawa <i>et al</i> , 1991
Di-Sialil-Lacto-N-Hexaosa I	$\begin{array}{c} \text{NeuAc } \alpha(2-6) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\ \text{NeuAc } \alpha(2-3) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \end{array} \left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc}$	1655,49	Kitagawa <i>et al</i> , 1991
Di-Sialil-Lacto-N-Hexaosa II	$\begin{array}{c} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\ \text{NeuAc } \alpha(2-3) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \\   \\ \text{NeuAc } \alpha(2-6) \end{array} \left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc}$	1655,49	Kitagawa <i>et al</i> , 1991
Di-Sialil-Lacto-N-neoHexaosa	$\begin{array}{c} \text{NeuAc } \alpha(2-6) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\ \text{NeuAc } \alpha(2-6) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \end{array} \left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc}$	1655,49	Grönberg <i>et al</i> , 1992
Fucosil-Di-Sialil-Lacto-N-Hexaosa I	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1-3) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\ \text{NeuAc } \alpha(2-3) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \\   \\ \text{NeuAc } \alpha(2-6) \end{array} \left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc}$	1801,63	Yamashita <i>et al</i> , 1976
Fucosil-Di-Sialil-Lacto-N-Hexaosa II	$\begin{array}{c} \text{Fuc } \alpha(1-3) \\   \\ \text{Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\ \text{NeuAc } \alpha(2-3) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \\   \\ \text{NeuAc } \alpha(2-6) \end{array} \left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc}$	1801,63	Kitagawa <i>et al</i> , 1991
Fucosil-Di-Sialil-Lacto-N-neoHexaosa	$\begin{array}{c} \text{NeuAc } \alpha(2-3/6) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\ \text{NeuAc } \alpha(2-3/6) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \\   \\ \text{Fuc } \alpha(1-3) \end{array} \left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc}$	1801,63	Yamashita <i>et al</i> , 1976
Tri-Sialil-Lacto-N-Hexaosa	$\begin{array}{c} \text{NeuAc } \alpha(2-6) \text{ Gal } \beta(1-4) \text{ GlcNAc } \beta(1-6) \\ \text{NeuAc } \alpha(2-3) \text{ Gal } \beta(1-3) \text{ GlcNAc } \beta(1-3) \\   \\ \text{NeuAc } \alpha(2-6) \end{array} \left. \begin{array}{l} \\ \\ \end{array} \right\} \text{Gal } \beta(1-4) \text{ Glc}$	1946,75	Fievre <i>et al</i> , 1991

**APÉNDICE 11.5.** Composición de los medios de cultivos y tampones utilizados en los ensayos para evaluar las propiedades funcionales de los oligosacáridos.

**Tampón HBSS** (Hank's balanced salt solution)

KCl	5.37 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.34 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.44 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4.17 mM
CaCl <sub>2</sub>	1.26 mM
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.49 mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.41 mM
NaCl	0.14 M
D-glucosa	5.55 mM
Agua destilada c.s.p.	1L
Filtrar por 0.22 μm	

**Tampón PBS**

NaCl	0.14 M
KCl	0.48 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17.08 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.41 mM
Agua destilada c.s.p.	1L
Ajustar a pH 7.4	

**Tampón RIPA**

Dodecil-sulfato de sodio, SDS	0.1% (p/v)
Desoxicolato sódico	0.1 % (p/v)
Tritón X-100	1.0 % (v/v)
Tampón PBS	1 L

**APÉNDICE 11.5.** Composición de los medios de cultivos y tampones utilizados en los ensayos para evaluar las propiedades funcionales de los oligosacáridos (Continuación).

**Solución de tiocianato de guanidinio**

Tiocianato de guanidinio	6.32 M
Citrato sódico	0.039 M pH 7.0
H <sub>2</sub> O tratada con DEPC	0.1% (v/v)
Lauril sarcosina	0.68% (p/v)
β-Mercaptoetanol	0.75 % (v/v)

**Tampón Borato 10x**

Ácido bórico	0.5 M
Borato sódico	50 mM
Sulfato sódico	100 Mm
EDTA	10 mM

**Tampón de carga de RNA**

Glicerol	30% (v/v)
Formamida	50% (v/v)
Formaldehído	15% (v/v)
Azul bromofenol-xileno cianol	0.25% (p/v)
Agua bidestilada tratada con DEPC	0.1% (v/v)
Tampón borato 1x	

**Medio HUVEC**

MCDB 131 (Biomol)	438 mL
Suero fetal bovino	10% (v/v)
Solución Pen/Strep	1% (v/v)
L-glutamina	1% (v/v)
Solución EGF (5 ng/mL)	5 µL
ECGS (PromoCell GMBH)	0.4% (v/v)
Filtrar por 0.22 µm	

APÉNDICE 11.6. Modelo dinámico propuesto para el proceso de ultrafiltración de leche de cabra.

$$\frac{dV_F}{dt} = F \quad [1] \qquad J = \frac{F}{A} \quad [2]$$

$$J = \alpha R^4 \quad [3] \qquad \frac{dR}{dt} = -\beta \frac{C_R^{Ca} \cdot J}{R} \quad [4]$$

$$\frac{dC_R^{OS}}{dt} = -\frac{F \cdot S_{OS} \cdot C_R^{OS}}{V_R} \quad [5] \qquad \frac{dC_R^{Ca}}{dt} = -\frac{F \cdot S_{Ca} \cdot C_R^{Ca}}{V_R} \quad [6]$$

$$S_{OS} = \frac{C_F^{OS}}{C_R^{OS}} \quad [7] \qquad S_{Ca} = \frac{C_F^{Ca}}{C_R^{Ca}} \quad [8]$$

$$\lambda_{OS} = \frac{R_{OS}}{R} \quad [9] \qquad \lambda_{Ca} = \frac{R_{Ca}}{R} \quad [10]$$

Parámetros del modelo:

- Coeficiente de flujo,  $\alpha = 4.98 \times 10^{-2} \text{ L}/(\text{h m}^2 \text{ nm}^4)$
- Coeficiente de fouling,  $\beta = 2.15 \times 10^{-5} (\text{nm}^2 \text{ m}^2) / \text{mg Ca}$
- Radio efectivo de la molécula de oligosacáridos,  $R_{OS} = 0.562 \text{ nm}$
- Radio efectivo para el calcio,  $R_{Ca} = 2.884 \text{ nm}$
- Radio inicial de poro,  $R = 4.299 \text{ nm}$ .

**APÉNDICE 11.7.** Simulación de la evolución del volumen de filtrado,  $V_F$ , para el ensayo de diafiltración continua de leche de cabra a  $T^a = 30^\circ\text{C}$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s con la membrana de 50 KDa.

t, h	$V_F$ , L	t, h	$V_F$ , L	t, h	$V_F$ , L
0.0	0.00000	7.0	4.02998	14.0	6.57495
0.2	0.15145	7.2	4.11777	14.2	6.63473
0.4	0.29991	7.4	4.20448	14.4	6.69394
0.6	0.44547	7.6	4.29011	14.6	6.75257
0.8	0.58824	7.8	4.37471	14.8	6.81064
1.0	0.72833	8.0	4.45828	15.0	6.86816
1.2	0.86585	8.2	4.54085	15.2	6.92514
1.4	1.00087	8.4	4.62244	15.4	6.98157
1.6	1.13350	8.6	4.70307	15.6	7.03748
1.8	1.26381	8.8	4.78276	15.8	7.09287
2.0	1.39188	9.0	4.86152	16.0	7.14774
2.2	1.51778	9.2	4.93938	16.2	7.20211
2.4	1.64159	9.4	5.01635	16.4	7.25598
2.6	1.76337	9.6	5.09245	16.6	7.30936
2.8	1.88318	9.8	5.16770	16.8	7.36225
3.0	2.00108	10.0	5.24210	17.0	7.41466
3.2	2.11713	10.2	5.31568	17.2	7.46661
3.4	2.23138	10.4	5.38845	17.4	7.51808
3.6	2.34390	10.6	5.46043	17.6	7.56910
3.8	2.45471	10.8	5.53163	17.8	7.61967
4.0	2.56388	11.0	5.60206	18.0	7.66979
4.2	2.67144	11.2	5.67174		
4.4	2.77744	11.4	5.74068		
4.6	2.88192	11.6	5.80890		
4.8	2.98492	11.8	5.87640		
5.0	3.08647	12.0	5.94319		
5.2	3.18662	12.2	6.00930		
5.4	3.28540	12.4	6.07472		
5.6	3.38284	12.6	6.13948		
5.8	3.47897	12.8	6.20358		
6.0	3.57383	13.0	6.26703		
6.2	3.66744	13.2	6.32985		
6.4	3.75984	13.4	6.39204		
6.6	3.85104	13.6	6.45361		
6.8	3.94108	13.8	6.51458		

**APÉNDICE 11.8.** Simulación de la evolución de la concentración de oligosacáridos y calcio en la corriente de retenido,  $C_R^{Ca}$  y  $C_R^{OS}$ , para el ensayo de diafiltración continua de leche de cabra a  $T^a = 30^\circ C$ ,  $P_{TM} = 0.90$  bar y velocidad de recirculación  $v = 3.3$  m/s con la membrana de 50 KDa.

t, h	$C_R^{OS}$ , mg/L	$C_R^{Ca}$ , mg/L	t, h	$C_R^{OS}$ , mg/L	$C_R^{Ca}$ , mg/L	t, h	$C_R^{OS}$ , mg/L	$C_R^{Ca}$ , mg/L
0.0	240.000	1300.00	7.0	37.668	1048.78	14.0	11.989	988.28
0.2	223.711	1285.63	7.2	36.197	1045.70	14.2	11.674	987.48
0.4	208.820	1272.00	7.4	34.801	1042.74	14.4	11.370	986.71
0.6	195.198	1259.08	7.6	33.476	1039.90	14.6	11.078	985.97
0.8	182.708	1246.81	7.8	32.217	1037.16	14.8	10.795	985.26
1.0	171.237	1235.16	8.0	31.020	1034.52	15.0	10.523	984.58
1.2	160.685	1224.07	8.2	29.882	1031.98	15.2	10.260	983.93
1.4	150.964	1213.52	8.4	28.799	1029.54	15.4	10.007	983.30
1.6	141.994	1203.48	8.6	27.768	1027.19	15.6	9.762	982.70
1.8	133.704	1193.91	8.8	26.786	1024.92	15.8	9.525	982.12
2.0	126.032	1184.78	9.0	25.850	1022.74	16.0	9.296	981.57
2.2	118.923	1176.06	9.2	24.957	1020.65	16.2	9.075	981.04
2.4	112.329	1167.75	9.4	24.106	1018.62	16.4	8.861	980.53
2.6	106.204	1159.80	9.6	23.293	1016.68	16.6	8.655	980.05
2.8	100.508	1152.20	9.8	22.516	1014.81	16.8	8.455	979.58
3.0	95.204	1144.94	10.0	21.775	1013.00	17.0	8.261	979.14
3.2	90.260	1137.99	10.2	21.065	1011.27	17.2	8.074	978.71
3.4	85.645	1131.34	10.4	20.387	1009.60	17.4	7.892	978.30
3.6	81.335	1124.97	10.6	19.738	1007.99	17.6	7.717	977.91
3.8	77.304	1118.86	10.8	19.116	1006.44	17.8	7.547	977.54
4.0	73.531	1113.01	11.0	18.521	1004.95	18.0	7.382	977.19
4.2	69.995	1107.41	11.2	17.951	1003.51			
4.4	66.680	1102.03	11.4	17.404	1002.13			
4.6	63.567	1096.87	11.6	16.880	1000.80			
4.8	60.642	1091.92	11.8	16.377	999.92			
5.0	57.892	1087.17	12.0	15.895	998.29			
5.2	55.304	1082.60	12.2	15.431	997.10			
5.4	52.866	1078.22	12.4	14.986	995.96			
5.6	50.567	1074.01	12.6	14.559	994.87			
5.8	48.399	1069.97	12.8	14.148	993.81			
6.0	46.352	1066.08	13.0	13.753	992.80			
6.2	44.418	1062.34	13.2	13.372	991.82			
6.4	42.589	1058.75	13.4	13.007	990.88			
6.6	40.859	1055.29	13.6	12.654	989.98			
6.8	39.220	1051.97	13.8	12.315	989.11			

**APÉNDICE 11.9.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos (REC) con el tiempo para el modo DF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana.

**1 módulo de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	380	0.95092	0.086263	760	0.68079	0.086614
10	3,49600	0,035331	390	0.93924	0.086292	770	0.67646	0.086615
20	3,02199	0,051720	400	0.92798	0.086320	780	0.67222	0.086616
30	2,70000	0,061024	410	0.91711	0.086344	790	0.66805	0.086617
40	2,46294	0,066941	420	0.90662	0.086367	800	0.66397	0.086618
50	2,27904	0,070990	430	0.89648	0.086388	810	0.65995	0.086619
60	2,13101	0,073907	440	0.88667	0.086407	820	0.65601	0.086620
70	2,00852	0,076089	450	0.87718	0.086425	830	0.65214	0.086620
80	1,90498	0,077779	460	0.86799	0.086441	840	0.64833	0.086621
90	1,81597	0,079095	470	0.85908	0.086456	850	0.64459	0.086621
100	1,73836	0,080160	480	0.85044	0.086470	860	0.64092	0.086622
110	1,66993	0,081030	490	0.84205	0.086483	870	0.63731	0.086622
120	1,60899	0,081748	500	0.83391	0.086494	880	0.63375	0.086623
130	1,55427	0,082349	510	0.82600	0.086505	890	0.63026	0.086623
140	1,50478	0,082857	520	0.81831	0.086515	900	0.62682	0.086623
150	1,45973	0,083289	530	0.81083	0.086524	910	0.62344	0.086624
160	1,41850	0,083660	540	0.80355	0.086532	920	0.62012	0.086624
170	1,38058	0,083981	550	0.79646	0.086540	930	0.61684	0.086624
180	1,34554	0,084259	560	0.78956	0.086547	940	0.61362	0.086624
190	1,31305	0,084502	570	0.78284	0.086554	950	0.61045	0.086624
200	1,28280	0,084715	580	0.77628	0.086560	960	0.60732	0.086624
210	1,25455	0,084903	590	0.76989	0.086565	970	0.60425	0.086625
220	1,22808	0,085069	600	0.76365	0.086570	980	0.60122	0.086625
230	1,20322	0,085217	610	0.75759	0.086575	990	0.59823	0.086625
240	1,17982	0,085348	620	0.75161	0.086579	1000	0.59529	0.086625
250	1,15773	0,085466	630	0.74581	0.086583	1010	0.59239	0.086625
260	1,13684	0,085571	640	0.74013	0.086587	1020	0.58954	0.086625
270	1,11703	0,085668	650	0.73458	0.086591	1030	0.58672	0.086625
280	1,09823	0,085750	660	0.72916	0.086594	1040	0.58395	0.086625
290	1,08035	0,085826	670	0.72385	0.086597	1050	0.58121	0.086625
300	1,06331	0,085896	680	0.71866	0.086599	1060	0.57851	0.086625
310	1,04705	0,085958	690	0.71358	0.086602	1070	0.57585	0.086625
320	1,03152	0,086015	700	0.70860	0.086604	1080	0.57323	0.086625
330	1,01666	0,086066	710	0.70373	0.086606	1090	0.57064	0.086625
340	1,00242	0,086113	720	0.69895	0.086608	1100	0.56808	0.086625
350	0,98876	0,086156	730	0.69428	0.086609	1110	0.56556	0.086625
360	0,97565	0,086195	740	0.68969	0.086611	1120	0.56308	0.086625
370	0,96305	0,086230	750	0.68519	0.086612	1123	0.56243	0.086625

**APÉNDICE 11.9.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo DF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana (Continuación).

**5 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	380	0,95806	0,366724	760	0,68606	0,368020
10	3,50171	0,164968	390	0,94631	0,366832	770	0,68170	0,368024
20	3,03159	0,234199	400	0,93497	0,366932	780	0,67743	0,368029
30	2,71116	0,271610	410	0,92403	0,367023	800	0,66912	0,368036
40	2,47471	0,294711	420	0,91347	0,367106	810	0,66507	0,368039
60	2,14290	0,321244	430	0,90326	0,367183	820	0,66110	0,368042
70	2,02027	0,329413	440	0,89339	0,367254	830	0,65720	0,368045
80	1,91654	0,335660	450	0,88383	0,367319	840	0,65337	0,368047
90	1,82730	0,340559	460	0,87458	0,367378	850	0,64960	0,368049
100	1,74947	0,344479	470	0,86561	0,367433	860	0,64590	0,368051
110	1,68080	0,347668	480	0,85690	0,367484	870	0,64226	0,368053
120	1,61964	0,350298	490	0,84846	0,367530	880	0,63868	0,368055
130	1,56470	0,352494	500	0,84026	0,367573	890	0,63516	0,368056
140	1,51499	0,354344	520	0,82455	0,367649	900	0,63170	0,368057
150	1,46974	0,355919	530	0,81702	0,367683	910	0,62829	0,368058
160	1,42832	0,357268	540	0,80969	0,367714	920	0,62495	0,368059
170	1,39021	0,358432	550	0,80256	0,367743	930	0,62165	0,368060
180	1,35500	0,359443	560	0,79561	0,367769	940	0,61840	0,368061
190	1,32234	0,360326	570	0,78884	0,367794	950	0,61521	0,368062
210	1,26352	0,361782	590	0,77579	0,367837	970	0,60896	0,368063
220	1,23691	0,362385	600	0,76952	0,367856	980	0,60591	0,368063
230	1,21192	0,362921	610	0,76338	0,367874	990	0,60289	0,368064
240	1,18838	0,363397	620	0,75739	0,367890	1000	0,59994	0,368064
250	1,16616	0,363823	630	0,75155	0,367905	1010	0,59702	0,368064
260	1,14514	0,364205	640	0,74583	0,367919	1030	0,59130	0,368065
270	1,12522	0,364548	660	0,73478	0,367943	1040	0,58851	0,368065
280	1,10630	0,364856	670	0,72943	0,367954	1050	0,58575	0,368065
290	1,08831	0,365134	680	0,72421	0,367964	1060	0,58303	0,368065
300	1,07117	0,365386	690	0,71909	0,367973	1070	0,58035	0,368065
310	1,05481	0,365613	700	0,71408	0,367982	1080	0,57771	0,368065
320	1,03918	0,365820	710	0,70917	0,367990	1100	0,57253	0,368065
340	1,00989	0,366178	720	0,70436	0,367997	1110	0,56999	0,368065
350	0,996151	0,366334	730	0,69965	0,368003	1120	0,56748	0,368065
360	0,982954	0,366476	740	0,69503	0,368009	1130	0,56501	0,368065
370	0,970269	0,366605	750	0,69050	0,368015	1140	0,56243	0,368065

**APÉNDICE 11.9.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo DF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana (Continuación).

**10 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	390	0,95537	0,605043	780	0,68412	0,606661
10	3,50885	0,303478	400	0,94394	0,605175	790	0,67988	0,606666
20	3,04368	0,415468	410	0,93291	0,605297	800	0,67573	0,606671
30	2,72533	0,472233	420	0,92226	0,605409	810	0,67165	0,606676
40	2,48968	0,505971	430	0,91196	0,605512	820	0,66764	0,606680
50	2,30619	0,528058	440	0,90200	0,605606	840	0,65983	0,606688
60	2,15807	0,543483	450	0,89237	0,605693	850	0,65603	0,606691
70	2,03526	0,554767	460	0,88303	0,605774	860	0,65229	0,606694
80	1,93129	0,563315	470	0,87398	0,605848	870	0,64862	0,606696
100	1,76366	0,575264	500	0,84842	0,606036	890	0,64146	0,606701
110	1,69470	0,579551	510	0,84038	0,606090	900	0,63797	0,606703
120	1,63325	0,583075	520	0,83257	0,606139	910	0,63453	0,606704
130	1,57804	0,586007	530	0,82497	0,606185	920	0,63114	0,606706
140	1,52806	0,588474	540	0,81758	0,606227	930	0,62782	0,606707
150	1,48256	0,590569	550	0,81038	0,606266	940	0,62454	0,606708
160	1,44089	0,592362	560	0,80337	0,606302	950	0,62131	0,606710
170	1,40255	0,593907	570	0,79654	0,606335	960	0,61814	0,606710
180	1,36711	0,595248	580	0,78988	0,606366	970	0,61501	0,606711
200	1,30362	0,597442	590	0,78338	0,606394	990	0,60889	0,606713
210	1,27502	0,598345	600	0,77704	0,606421	1000	0,60589	0,606713
220	1,24823	0,599144	610	0,77086	0,606445	1010	0,60295	0,606714
240	1,19934	0,600484	630	0,75891	0,606488	1030	0,59719	0,606714
250	1,17696	0,601048	650	0,74751	0,606525	1040	0,59436	0,606715
260	1,15578	0,601553	660	0,74199	0,606541	1050	0,59158	0,606715
270	1,13571	0,602007	670	0,73659	0,606556	1060	0,58884	0,606715
280	1,11665	0,602416	680	0,73132	0,606570	1070	0,58613	0,606715
290	1,09852	0,602785	690	0,72616	0,606583	1090	0,58083	0,606716
300	1,08124	0,603118	700	0,72109	0,606595	1100	0,57823	0,606716
310	1,06475	0,603420	710	0,71615	0,606606	1110	0,57567	0,606716
330	1,03392	0,603944	720	0,71129	0,606616	1120	0,57314	0,606716
340	1,01948	0,604171	730	0,70654	0,606625	1130	0,57064	0,606716
350	1,00563	0,604378	740	0,70188	0,606633	1140	0,56818	0,606716
360	0,99232	0,604567	750	0,69731	0,606641	1150	0,56574	0,606716
370	0,97953	0,604740	760	0,69283	0,606648	1160	0,56334	0,606716
380	0,96722	0,604948	770	0,68843	0,606655	1170	0,56243	0,606716

**APÉNDICE 11.9.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo DF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana (Continuación).

**15 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	380	0,97665	0,757358	780	0,69101	0,759118
10	3,51596	0,419648	390	0,96469	0,757501	790	0,68673	0,759123
20	3,05583	0,555335	400	0,95317	0,757632	800	0,68254	0,759129
30	2,73964	0,619683	410	0,94204	0,757752	810	0,67842	0,759134
40	2,50486	0,656414	420	0,93129	0,757863	820	0,67437	0,759138
50	2,32164	0,679827	430	0,92092	0,757965	830	0,67039	0,759142
60	2,17353	0,695873	440	0,91087	0,758058	840	0,66649	0,759146
70	2,05056	0,707453	450	0,90115	0,758145	850	0,66266	0,759149
80	1,94636	0,716134	460	0,89173	0,758224	870	0,65518	0,759155
100	1,77818	0,728139	470	0,88260	0,758298	880	0,65153	0,759158
110	1,70894	0,732411	480	0,87375	0,758365	890	0,64795	0,759160
120	1,64720	0,735908	490	0,86516	0,758428	900	0,64442	0,759163
140	1,54147	0,741245	510	0,84871	0,758539	920	0,63753	0,759166
150	1,49570	0,743307	520	0,84083	0,758588	930	0,63417	0,759168
160	1,45379	0,745070	530	0,83316	0,758634	940	0,63086	0,759169
170	1,41521	0,746588	540	0,82570	0,758676	950	0,62761	0,759170
180	1,37955	0,747903	560	0,81136	0,758752	970	0,62124	0,759172
190	1,34645	0,749049	570	0,80447	0,758785	980	0,61813	0,759173
200	1,31563	0,750053	580	0,79775	0,758816	990	0,61507	0,759174
210	1,28684	0,750937	590	0,79119	0,758845	1000	0,61205	0,759175
220	1,25985	0,751719	600	0,78479	0,758871	1010	0,60907	0,759175
230	1,23449	0,752413	610	0,77855	0,758896	1020	0,60614	0,759176
240	1,21061	0,753030	620	0,77245	0,758918	1030	0,60325	0,759176
250	1,18806	0,753582	630	0,76649	0,758940	1040	0,60039	0,759177
260	1,16672	0,754077	640	0,76068	0,758959	1050	0,59759	0,759177
270	1,14650	0,754521	650	0,75499	0,758977	1060	0,59482	0,759177
280	1,12729	0,754922	660	0,74942	0,758994	1080	0,58939	0,759178
290	1,10902	0,755283	670	0,74398	0,759009	1090	0,58673	0,759178
300	1,09160	0,755610	680	0,73865	0,759023	1100	0,58411	0,759178
310	1,07498	0,755907	690	0,73344	0,759036	1110	0,58152	0,759178
320	1,05910	0,756176	700	0,72834	0,759049	1120	0,57897	0,759178
340	1,02934	0,756643	730	0,71364	0,759080	1140	0,57396	0,759178
350	1,01537	0,756847	740	0,70894	0,759089	1160	0,56908	0,759178
360	1,00196	0,757033	750	0,70432	0,759097	1180	0,56432	0,759178
370	0,98906	0,757203	760	0,69979	0,759104	1188	0,56243	0,759178

**APÉNDICE 11.9.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo DF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana (Continuación).

**20 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	380	0,98635	0,853441	780	0,69811	0,854976
10	3,52307	0,516965	390	0,97429	0,853564	790	0,69379	0,854981
20	3,06808	0,662864	400	0,96267	0,853677	800	0,68956	0,854986
30	2,75413	0,727441	410	0,95145	0,853781	810	0,68539	0,854991
40	2,52028	0,762773	420	0,94061	0,853877	830	0,67730	0,854999
50	2,33739	0,784666	430	0,93013	0,853965	840	0,67336	0,855003
60	2,18929	0,799373	440	0,92000	0,854046	850	0,66948	0,855006
70	2,06619	0,809831	450	0,91019	0,854121	860	0,66568	0,855009
80	1,96177	0,817585	460	0,90069	0,854190	870	0,66193	0,855011
90	1,87173	0,823522	470	0,89148	0,854254	880	0,65825	0,855014
100	1,79305	0,828184	480	0,88255	0,854313	890	0,65463	0,855016
120	1,66150	0,834967	510	0,85728	0,854464	920	0,64412	0,855022
130	1,60573	0,837486	520	0,84933	0,854507	930	0,64072	0,855023
140	1,55522	0,839593	530	0,84159	0,854547	940	0,63738	0,855025
150	1,50920	0,841374	540	0,83406	0,854584	950	0,63409	0,855026
160	1,46703	0,842893	550	0,82673	0,854618	960	0,63085	0,855027
170	1,42821	0,844199	560	0,81959	0,854650	970	0,62767	0,855028
190	1,35901	0,846314	570	0,81264	0,854679	980	0,62452	0,855029
200	1,32797	0,847175	580	0,80585	0,854707	1000	0,61838	0,855030
210	1,29897	0,847934	590	0,79924	0,854732	1010	0,61538	0,855031
220	1,27180	0,848604	600	0,79278	0,854755	1030	0,60949	0,855032
230	1,24625	0,849198	610	0,78648	0,854777	1040	0,60662	0,855033
240	1,22219	0,849728	620	0,78033	0,854797	1050	0,60378	0,855033
260	1,17798	0,850624	640	0,76844	0,854833	1070	0,59822	0,855034
270	1,15759	0,851005	650	0,76269	0,854849	1080	0,59550	0,855034
280	1,13823	0,851348	660	0,75708	0,854864	1090	0,59282	0,855034
290	1,11981	0,851658	670	0,75158	0,854878	1100	0,59017	0,855034
300	1,10226	0,851939	680	0,74621	0,854891	1120	0,58497	0,855034
310	1,08551	0,852193	690	0,74095	0,854903	1130	0,58243	0,855034
320	1,06950	0,852424	700	0,73579	0,854914	1150	0,57744	0,855034
330	1,05417	0,852634	710	0,73075	0,854924	1170	0,57257	0,855035
340	1,03949	0,852826	730	0,72096	0,854942	1190	0,56782	0,855035
350	1,02540	0,853001	740	0,71621	0,854950	1200	0,56549	0,855035
360	1,01188	0,853161	750	0,71155	0,854957	1210	0,56319	0,855035
370	0,99887	0,853307	760	0,70250	0,854970	1213	0,56243	0,855035

**APÉNDICE 11.9.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo DF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana (Continuación).

**25 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	390	0,98418	0,913117	780	0,70543	0,914253
10	3,53016	0,598393	400	0,97245	0,913207	790	0,70107	0,914258
20	3,08040	0,745258	410	0,96113	0,913290	800	0,69679	0,914262
30	2,76879	0,805772	430	0,93963	0,913436	810	0,69259	0,914266
40	2,53595	0,837434	440	0,92941	0,913501	820	0,68847	0,914270
50	2,35342	0,856476	450	0,91951	0,913561	830	0,68442	0,914273
60	2,20538	0,868997	460	0,90993	0,913616	840	0,68044	0,914276
70	2,08216	0,877760	470	0,90063	0,913667	860	0,67268	0,914281
80	1,97753	0,884180	480	0,89162	0,913714	870	0,66889	0,914284
90	1,88723	0,889051	490	0,88287	0,913758	880	0,66518	0,914286
100	1,80828	0,892847	500	0,87437	0,913798	890	0,66152	0,914288
110	1,73847	0,895872	510	0,86612	0,913836	900	0,65793	0,914290
120	1,67616	0,898326	520	0,85809	0,913871	910	0,65439	0,914291
130	1,62011	0,900347	530	0,85028	0,913903	930	0,64748	0,914294
140	1,56933	0,902033	540	0,84269	0,913933	940	0,64411	0,914295
150	1,52305	0,903454	550	0,83529	0,913960	950	0,64078	0,914297
160	1,48063	0,904664	560	0,82808	0,913986	960	0,63751	0,914298
170	1,44157	0,905702	570	0,82106	0,914010	970	0,63429	0,914298
180	1,40545	0,906599	580	0,81421	0,914032	980	0,63112	0,914299
190	1,37191	0,907379	590	0,80753	0,914052	1000	0,62491	0,914301
200	1,34066	0,908062	600	0,80102	0,914072	1010	0,62188	0,914301
220	1,28408	0,909192	610	0,79465	0,914089	1020	0,61889	0,914302
230	1,25835	0,909662	620	0,78844	0,914106	1040	0,61303	0,914303
240	1,23411	0,910081	630	0,78237	0,914121	1050	0,61017	0,914303
250	1,21122	0,910454	640	0,77644	0,914135	1060	0,60734	0,914303
260	1,18955	0,910789	660	0,76497	0,914160	1070	0,60455	0,914304
270	1,16901	0,911090	670	0,75943	0,914172	1090	0,59909	0,914304
280	1,14950	0,911362	680	0,75399	0,914182	1100	0,59642	0,914304
300	1,11324	0,911829	700	0,74348	0,914201	1120	0,59117	0,914305
320	1,08020	0,912213	710	0,73839	0,914210	1130	0,58860	0,914305
340	1,04994	0,912531	730	0,72850	0,914225	1170	0,57864	0,914305
350	1,03574	0,912670	740	0,72371	0,914231	1190	0,57385	0,914305
360	1,02209	0,912797	750	0,71900	0,914237	1210	0,56917	0,914305
370	1,00897	0,912913	760	0,71439	0,914243	1230	0,56461	0,914305
380	0,99635	0,913019	770	0,70987	0,914249	1240	0,56243	0,914305

**APÉNDICE 11.9.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo DF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana (Continuación).

**29 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	390	0,99231	0,943534	790	0,70706	0,944453
10	3,53582	0,653803	400	0,98050	0,943606	810	0,69852	0,944460
20	3,09031	0,796921	410	0,96910	0,943672	820	0,69436	0,944463
30	2,78068	0,852488	430	0,94744	0,943789	830	0,69028	0,944465
40	2,54868	0,880506	440	0,93715	0,943841	840	0,68626	0,944468
50	2,36648	0,896937	450	0,92718	0,943889	860	0,67844	0,944472
60	2,21849	0,907547	460	0,91752	0,943933	870	0,67463	0,944475
70	2,09520	0,914874	470	0,90816	0,943974	880	0,67088	0,944476
90	1,89992	0,924184	480	0,89908	0,944012	890	0,66719	0,944478
100	1,82074	0,927281	490	0,89026	0,944047	900	0,66357	0,944480
110	1,75071	0,929736	500	0,88170	0,944079	910	0,66001	0,944481
120	1,68818	0,931719	510	0,87339	0,944109	930	0,65304	0,944484
130	1,63190	0,933347	520	0,86529	0,944137	940	0,64964	0,944485
140	1,58090	0,934701	530	0,85743	0,944163	950	0,64629	0,944486
150	1,53441	0,935839	540	0,84978	0,944187	960	0,64299	0,944487
160	1,49178	0,936807	550	0,84232	0,944210	970	0,63975	0,944487
170	1,45253	0,937636	560	0,83506	0,944231	980	0,63655	0,944488
190	1,38250	0,938973	580	0,82109	0,944268	1010	0,62723	0,944490
200	1,35108	0,939516	590	0,81436	0,944284	1020	0,62422	0,944490
210	1,32171	0,939993	600	0,80779	0,944300	1030	0,62124	0,944491
220	1,29417	0,940415	610	0,80138	0,944314	1040	0,61831	0,944491
230	1,26829	0,940788	630	0,78900	0,944340	1060	0,61258	0,944492
240	1,24390	0,941121	640	0,78303	0,944352	1070	0,60977	0,944492
250	1,22087	0,941418	650	0,77718	0,944362	1080	0,60699	0,944492
260	1,19907	0,941684	660	0,77147	0,944372	1090	0,60426	0,944493
270	1,17839	0,941923	670	0,76588	0,944382	1110	0,59890	0,944493
280	1,15876	0,942138	680	0,76041	0,944390	1120	0,59627	0,944493
290	1,14007	0,942333	690	0,75505	0,944398	1130	0,59368	0,944493
300	1,12225	0,942509	700	0,74981	0,944406	1140	0,59112	0,944493
330	1,07344	0,942947	730	0,73471	0,944425	1180	0,58121	0,944494
340	1,05853	0,943068	740	0,72988	0,944431	1200	0,57643	0,944494
350	1,04423	0,943178	750	0,72514	0,944436	1220	0,57178	0,944494
360	1,03049	0,943279	760	0,72049	0,944440	1240	0,56723	0,944494
370	1,01728	0,943372	770	0,71593	0,944445	1260	0,56279	0,944494
380	1,00456	0,943456	780	0,71146	0,944449	1262	0,56243	0,944494

**APÉNDICE 11.10.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo CDF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana.

**1 módulo de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4.29936	0.000000	380	0.90699	0.086367	760	0.64647	0.086621
10	3.48251	0.035842	390	0.89567	0.086390	770	0.64232	0.086622
20	2.99369	0.052597	400	0.88476	0.086411	780	0.63826	0.086623
30	2.66170	0.062033	410	0.87423	0.086431	790	0.63426	0.086623
40	2.41821	0.067969	420	0.86408	0.086448	800	0.63034	0.086623
50	2.23017	0.071987	430	0.85426	0.086464	810	0.62649	0.086624
60	2.07947	0.074851	440	0.84478	0.086479	820	0.62272	0.086624
70	1.95530	0.076972	450	0.83560	0.086492	830	0.61900	0.086624
80	1.85074	0.078591	460	0.82671	0.086504	840	0.61536	0.086625
90	1.76115	0.079857	470	0.81810	0.086515	850	0.61178	0.086625
100	1.68329	0.080865	480	0.80976	0.086526	860	0.60826	0.086625
110	1.61482	0.081682	490	0.80166	0.086535	870	0.60480	0.086625
120	1.55401	0.082353	500	0.79380	0.086543	880	0.60139	0.086625
130	1.49953	0.082909	510	0.78617	0.086551	890	0.59805	0.086625
140	1.45035	0.083376	520	0.77875	0.086558	900	0.59476	0.086625
150	1.40569	0.083771	530	0.77154	0.086564	910	0.59152	0.086625
160	1.36488	0.084108	540	0.76452	0.086570	920	0.58834	0.086625
170	1.32740	0.084397	550	0.75769	0.086575	930	0.58520	0.086625
180	1.29283	0.084646	560	0.75104	0.086580	940	0.58212	0.086625
190	1.26081	0.084863	570	0.74456	0.086585	950	0.57908	0.086625
200	1.23105	0.085051	580	0.73825	0.086589	960	0.57610	0.086625
210	1.20329	0.085217	590	0.73210	0.086592	970	0.57315	0.086625
220	1.17731	0.085362	600	0.72609	0.086596	980	0.57025	0.086626
230	1.15294	0.085490	610	0.72023	0.086599	990	0.56740	0.086626
240	1.13001	0.085604	620	0.71451	0.086602	1000	0.56458	0.086626
250	1.10839	0.085705	630	0.70892	0.086604	1008	0.56243	0.086626
260	1.08797	0.085795	640	0.70347	0.086606			
270	1.06862	0.085875	650	0.69813	0.086608			
280	1.05027	0.085946	660	0.69292	0.086610			
290	1.03283	0.086011	670	0.68782	0.086612			
300	1.01622	0.086068	680	0.68283	0.086614			
310	1.00039	0.086120	690	0.67795	0.086615			
320	0.98528	0.086167	700	0.67317	0.086616			
330	0.97082	0.086209	710	0.66849	0.086617			
340	0.95698	0.086247	720	0.66391	0.086618			
350	0.94372	0.086282	730	0.65942	0.086619			
360	0.93099	0.086313	740	0.65502	0.086620			
370	0.91876	0.086341	750	0.65070	0.086621			

**APÉNDICE 11.10.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo CDF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana (Continuación).

**5 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	230	0,96312	0,366675	460	0,67659	0,368028
10	3,42890	0,176910	240	0,94249	0,366865	470	0,66922	0,368035
20	2,87572	0,253310	250	0,92312	0,367029	480	0,66208	0,368040
30	2,50032	0,292381	260	0,90487	0,367170	490	0,65517	0,368045
40	2,23021	0,314899	270	0,88765	0,367292	500	0,64846	0,368049
50	2,02630	0,329030	280	0,87136	0,367397	510	0,64196	0,368052
60	1,86643	0,338464	290	0,85592	0,367488	520	0,63564	0,368055
70	1,73728	0,345063	300	0,84127	0,367567	530	0,62951	0,368057
80	1,63044	0,349847	310	0,82733	0,367635	540	0,62354	0,368059
90	1,54031	0,353417	320	0,81405	0,367695	550	0,61775	0,368060
100	1,46306	0,356141	330	0,80138	0,367746	560	0,61211	0,368061
110	1,39595	0,358261	340	0,78928	0,367791	570	0,60662	0,368062
120	1,33700	0,359936	350	0,77770	0,367830	580	0,60127	0,368063
130	1,28470	0,361276	360	0,76662	0,367863	590	0,59607	0,368063
140	1,23792	0,362362	370	0,75598	0,367892	600	0,59099	0,368064
150	1,19575	0,363250	380	0,74578	0,367918	610	0,58604	0,368064
160	1,15752	0,363982	390	0,73597	0,367940	620	0,58122	0,368064
170	1,12264	0,364590	400	0,72653	0,367959	630	0,57651	0,368064
180	1,09066	0,365098	410	0,71745	0,367975	640	0,57191	0,368064
190	1,06120	0,365525	420	0,70869	0,367989	650	0,56742	0,368064
200	1,03396	0,365886	430	0,70025	0,368001	660	0,56303	0,368064
210	1,00868	0,366191	440	0,69209	0,368012	661	0,56243	0,368064
220	0,98512	0,366452	450	0,68421	0,368021			

**APÉNDICE 11.10.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo CDF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana (Continuación).

**10 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	140	0,97423	0,604813	280	0,66784	0,60668
10	3,34644	0,347059	150	0,93783	0,605247	290	0,65539	0,60669
20	2,68575	0,478364	160	0,90509	0,605581	300	0,64359	0,60670
30	2,24495	0,534688	170	0,87547	0,605840	310	0,63241	0,60671
40	1,94239	0,562449	180	0,84848	0,606040	320	0,62178	0,60671
50	1,72466	0,577737	190	0,82378	0,606196	330	0,61166	0,60672
60	1,56088	0,586879	200	0,80106	0,606317	340	0,60200	0,60672
70	1,43306	0,592690	210	0,78008	0,606412	350	0,59279	0,60672
80	1,33028	0,596557	220	0,76063	0,606486	360	0,58398	0,60672
90	1,24561	0,599223	230	0,74253	0,606543	370	0,57554	0,60672
100	1,17447	0,601113	240	0,72564	0,606588	380	0,56746	0,60672
110	1,11372	0,602481	250	0,70983	0,606622	386	0,56243	0,60672
120	1,06111	0,603489	260	0,69498	0,606648			
130	1,01502	0,604243	270	0,68102	0,606668			

**15 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	110	0,95035	0,757639	220	0,66552	0,759123
10	3,23885	0,508267	120	0,90841	0,758056	230	0,65062	0,759134
20	2,42699	0,666853	130	0,87157	0,758357	240	0,63668	0,759142
30	1,92272	0,717939	140	0,83889	0,758576	250	0,62359	0,759147
40	1,63280	0,736658	150	0,80962	0,758736	260	0,61129	0,759151
50	1,44385	0,745446	160	0,78322	0,758853	270	0,59968	0,759152
60	1,30825	0,750260	170	0,75924	0,758939	280	0,58872	0,759153
70	1,20485	0,753150	180	0,73734	0,759002	290	0,57833	0,759154
80	1,12264	0,754991	190	0,71723	0,759048	300	0,56847	0,759154
90	1,05524	0,756215	200	0,69868	0,759082	306	0,56243	0,759154
100	0,99868	0,757052	210	0,68149	0,759106			

**APÉNDICE 11.10.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo CDF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana (Continuación).

**20 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	110	0,94208	0,853848	220	0,66619	0,854992
10	3,09085	0,657209	120	0,90198	0,854164	230	0,65155	0,855001
20	2,20813	0,797617	130	0,86661	0,854394	240	0,63784	0,855008
30	1,80334	0,827583	140	0,83509	0,854563	250	0,62495	0,855012
40	1,56192	0,839305	150	0,80678	0,854687	260	0,61282	0,855015
50	1,39712	0,845165	160	0,78116	0,854778	270	0,60136	0,855017
60	1,27545	0,848499	170	0,75784	0,854846	280	0,59053	0,855018
70	1,18088	0,850552	180	0,73649	0,854896	290	0,58026	0,855018
80	1,10464	0,851885	190	0,71685	0,854932	300	0,57050	0,855018
90	1,04148	0,852784	200	0,69871	0,854959	306	0,56243	0,855018
100	0,98805	0,853407	210	0,68187	0,854978			

**25 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	110	0,94503	0,913370	220	0,67082	0,914252
10	2,91767	0,779877	120	0,90537	0,913611	230	0,65619	0,914260
20	2,14327	0,873545	130	0,87033	0,913786	240	0,64247	0,914265
30	1,77354	0,894355	140	0,83906	0,913916	250	0,62958	0,914269
40	1,54645	0,902716	150	0,81094	0,914011	260	0,61743	0,914272
50	1,38893	0,906957	160	0,78547	0,914083	270	0,60597	0,914273
60	1,27144	0,909395	170	0,76225	0,914135	280	0,59511	0,914274
70	1,17947	0,910908	180	0,74098	0,914175	290	0,58483	0,914274
80	1,10496	0,911897	190	0,72139	0,914204	300	0,57505	0,914274
90	1,04298	0,912569	200	0,70329	0,914225	310	0,56575	0,914275
100	0,99038	0,913037	210	0,68648	0,914241	314	0,56243	0,914275

**APÉNDICE 11.10.** Valores simulados del radio de poro y % de recuperación de oligosacáridos con el tiempo para el modo CDF y 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 29 módulos de membrana (Continuación).

**29 módulos de membrana**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0	4,29936	0,000000	110	0,94983	0,943738	220	0,67546	0,944436
10	2,84501	0,842842	120	0,91025	0,943926	230	0,66077	0,944442
20	2,12220	0,913321	130	0,87524	0,944064	240	0,64701	0,944447
30	1,76631	0,929166	140	0,84398	0,944166	250	0,63407	0,944450
40	1,54484	0,935549	150	0,81584	0,944242	260	0,62188	0,944452
50	1,39009	0,938795	160	0,79035	0,944299	270	0,61036	0,944454
60	1,27412	0,940666	170	0,76711	0,944341	280	0,59946	0,944455
70	1,18305	0,941831	180	0,74579	0,944373	290	0,58913	0,944455
80	1,10908	0,942595	190	0,72617	0,944396	300	0,57931	0,944455
90	1,04744	0,943115	200	0,70802	0,944414	310	0,56997	0,944455
100	0,99506	0,943479	210	0,69116	0,944426	318	0,56243	0,944455

**APÉNDICE 11.11.** Valores simulados para el ejemplo de productividad = 250 L/h, volumen inicial 1000 L y % de recuperación de oligosacáridos superior al 95%.

**Concentración de calcio en el retenido ( $C_R^{Ca}$ ) y filtrado ( $C_F^{Ca}$ ).**

t, h	$C_R^{Ca}$ , mg/L	$C_F^{Ca}$ , mg/L	t, h	$C_R^{Ca}$ , mg/L	$C_F^{Ca}$ , mg/L	t, h	$C_R^{Ca}$ , mg/L	$C_F^{Ca}$ , mg/L
0,00	1300,00	193,130	1,40	2604,96	307,140	2,70	4110,98	293,435
0,10	1349,17	198,093	1,50	2799,22	321,746	2,80	4082,19	278,629
0,20	1402,10	203,358	1,60	3023,12	338,006	2,90	4055,52	264,614
0,30	1459,23	208,958	1,70	3283,82	356,231	3,00	4030,79	251,328
0,40	1521,07	214,925	1,80	3590,81	376,822	3,10	4007,85	238,717
0,50	1588,21	221,298	1,90	3957,19	400,276	3,20	3986,56	226,733
0,60	1661,35	228,121	1,99	4391,72	426,684	3,30	3966,81	215,332
0,70	1741,28	235,442	2,00	4390,69	426,220	3,40	3948,46	204,475
0,80	1828,98	243,320	2,10	4340,36	403,373	3,50	3931,42	194,128
0,90	1925,62	251,825	2,20	4294,04	382,035	3,60	3915,60	184,257
1,00	2032,61	261,037	2,30	4251,38	362,059	3,70	3900,90	174,834
1,10	2151,65	271,040	2,40	4212,02	343,318	3,80	3887,24	165,833
1,20	2284,88	281,969	2,50	4175,67	325,697	3,90	3874,57	157,231
1,30	2434,89	293,947	2,60	4142,07	309,098	3,95	3868,54	153,053

**Concentración de oligosacáridos en el retenido ( $C_R^{OS}$ ) y filtrado ( $C_F^{OS}$ ).**

t, h	$C_R^{OS}$ , mg/L	$C_F^{OS}$ , mg/L	t, h	$C_R^{OS}$ , mg/L	$C_F^{OS}$ , mg/L	t, h	$C_R^{OS}$ , mg/L	$C_F^{OS}$ , mg/L
0,00	240,000	222,908	1,40	254,762	234,938	2,70	130,282	118,481
0,10	240,748	223,519	1,50	256,387	236,258	2,80	118,890	107,998
0,20	241,527	224,155	1,60	258,149	237,687	2,90	108,75	98,673
0,30	242,341	224,820	1,70	260,067	239,242	3,00	99,691	90,354
0,40	243,192	225,515	1,80	262,170	240,944	3,10	91,585	82,914
0,50	244,084	226,243	1,90	264,492	242,822	3,20	84,309	76,242
0,60	245,020	227,007	1,99	267,026	244,867	3,30	77,764	70,245
0,70	246,005	227,810	2,00	266,437	244,322	3,40	71,862	64,843
0,80	247,043	228,656	2,10	238,392	218,338	3,50	66,528	59,965
0,90	248,139	229,550	2,20	213,997	195,758	3,60	61,699	55,551
1,00	249,300	230,496	2,30	192,695	176,062	3,70	57,316	51,549
1,10	250,534	231,500	2,40	174,025	158,816	3,80	53,331	47,913
1,20	251,848	232,570	2,50	157,605	143,662	3,90	49,701	44,604
1,30	253,253	233,712	2,60	143,114	130,301	3,95	48,000	43,054

**APÉNDICE 11.11.** Valores simulados para el ejemplo de productividad = 250 L/h, volumen inicial 1000 L y % de recuperación de oligosacáridos superior al 95% (Continuación).

**Caudal (F) y flujo (J) de permeado.**

t, h	F, mL/min	J, mL/(m <sup>2</sup> min)	t, h	F, mL/min	J, mL/(m <sup>2</sup> min)	t, h	F, mL/min	J, mL/(m <sup>2</sup> min)
0,00	428,461	17,0024	1,40	354,063	14,0501	2,70	254,777	10,1102
0,10	424,012	16,8259	1,50	347,294	13,7815	2,80	248,535	9,8625
0,20	419,465	16,6454	1,60	340,218	13,5007	2,90	242,559	9,6254
0,30	414,813	16,4608	1,70	332,794	13,2061	3,00	236,832	9,3981
0,40	410,049	16,2718	1,80	324,977	12,8959	3,10	231,337	9,1801
0,50	405,166	16,0780	1,90	316,710	12,5679	3,20	226,061	8,9707
0,60	400,156	15,8792	1,99	308,097	12,2261	3,30	220,988	8,7694
0,70	395,009	15,6749	2,00	307,920	12,2191	3,40	216,107	8,5757
0,80	389,714	15,4648	2,10	299,111	11,8695	3,50	211,407	8,3892
0,90	384,260	15,2484	2,20	290,764	11,5383	3,60	206,877	8,2094
1,00	378,633	15,0251	2,30	282,844	11,2240	3,70	202,508	8,0360
1,10	372,820	14,7944	2,40	275,313	10,9251	3,80	198,291	7,8687
1,20	366,800	14,5556	2,50	268,143	10,6406	3,90	194,218	7,7071
1,30	360,556	14,3078	2,60	261,306	10,3693	3,95	192,225	7,6280

**Volumen de retenido (V<sub>R</sub>) y filtrado (V<sub>F</sub>).**

t, h	V <sub>R</sub> , L	V <sub>F</sub> , L	t, h	V <sub>R</sub> , L	V <sub>F</sub> , L	t, h	V <sub>R</sub> , L	V <sub>F</sub> , L
0,00	1000,000	0,000	1,40	448,713	551,287	2,70	249,999	946,461
0,10	957,376	42,624	1,50	413,643	586,357	2,80	249,999	971,625
0,20	915,201	84,799	1,60	379,265	620,735	2,90	249,999	996,177
0,30	873,486	126,514	1,70	345,612	654,388	3,00	249,999	1020,14
0,40	832,242	167,758	1,80	312,720	687,280	3,10	249,999	1043,55
0,50	791,481	208,519	1,90	280,632	719,368	3,20	249,999	1066,42
0,60	751,214	248,786	1,99	249,999	750,001	3,30	249,999	1088,77
0,70	711,455	288,545	2,00	249,999	750,604	3,40	249,999	1110,62
0,80	672,218	327,782	2,10	249,999	780,948	3,50	249,999	1132,00
0,90	633,518	366,482	2,20	249,999	810,438	3,60	249,999	1152,91
1,00	595,372	404,628	2,30	249,999	839,115	3,70	249,999	1173,38
1,10	557,798	442,202	2,40	249,999	867,020	3,80	249,999	1193,42
1,20	520,816	479,184	2,50	249,999	894,190	3,90	249,999	1213,04
1,30	484,446	515,554	2,60	249,999	920,659	3,95	249,999	1222,75

**APÉNDICE 11.11.** Valores simulados para el ejemplo de productividad = 250 L/h, volumen inicial 1000 L y % de recuperación de oligosacáridos superior al 95% (Continuación).

**Radio de poro (R) y porcentaje de recuperación (REC).**

t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100	t, h	R, nm	REC x 100
0,00	4,29936	0,000000	1,40	4,09917	0,523688	2,70	3,77543	0,864290
0,10	4,28816	0,039643	1,50	4,07944	0,558113	2,80	3,75209	0,876157
0,20	4,27661	0,078977	1,60	4,05850	0,592055	2,90	3,72933	0,886723
0,30	4,26471	0,117994	1,70	4,03617	0,625491	3,00	3,70712	0,896155
0,40	4,25241	0,156688	1,80	4,01226	0,658393	3,10	3,68542	0,904600
0,50	4,23969	0,195050	1,90	3,98650	0,690729	3,20	3,66423	0,912179
0,60	4,22652	0,233072	1,99	3,95911	0,721850	3,30	3,64349	0,918997
0,70	4,21287	0,270744	2,00	3,95854	0,722462	3,40	3,62321	0,925144
0,80	4,19868	0,308056	2,10	3,92992	0,751676	3,50	3,60335	0,930700
0,90	4,18391	0,344997	2,20	3,90222	0,777088	3,60	3,58389	0,935731
1,00	4,16851	0,381556	2,30	3,87537	0,799277	3,70	3,56481	0,940296
1,10	4,15241	0,417720	2,40	3,84931	0,818724	3,80	3,54611	0,944447
1,20	4,13555	0,453473	2,50	3,82400	0,835829	3,90	3,52776	0,948228
1,30	4,11784	0,488802	2,60	3,79939	0,850924	3,95	3,51867	0,950000

**Coefficiente de transmisión para los oligosacáridos (S<sub>os</sub>) y para el calcio (S<sub>ca</sub>).**

t, h	S <sub>os</sub>	S <sub>Ca</sub>	t, h	S <sub>os</sub>	S <sub>Ca</sub>	t, h	S <sub>os</sub>	S <sub>Ca</sub>
0,00	0,928783	0,148561	1,40	0,922187	0,117906	2,70	0,909426	0,071378
0,10	0,928436	0,146825	1,50	0,921488	0,114939	2,80	0,908388	0,068255
0,20	0,928076	0,145039	1,60	0,920736	0,111805	2,90	0,907359	0,065248
0,30	0,927702	0,143198	1,70	0,919923	0,108480	3,00	0,906338	0,062352
0,40	0,927313	0,141299	1,80	0,919038	0,104940	3,10	0,905324	0,059562
0,50	0,926907	0,139338	1,90	0,918068	0,101152	3,20	0,904318	0,056874
0,60	0,926483	0,137311	1,99	0,917018	0,097156	3,30	0,903319	0,054284
0,70	0,926039	0,135211	2,00	0,916996	0,097074	3,40	0,902326	0,051786
0,80	0,925574	0,133035	2,10	0,915876	0,092935	3,50	0,901339	0,049379
0,90	0,925086	0,130774	2,20	0,914771	0,088969	3,60	0,900357	0,047057
1,00	0,924571	0,128421	2,30	0,913679	0,085163	3,70	0,899381	0,044819
1,10	0,924028	0,125969	2,40	0,912599	0,081509	3,80	0,898410	0,042661
1,20	0,923452	0,123406	2,50	0,911531	0,077999	3,90	0,897444	0,040580
1,30	0,922840	0,120723	2,60	0,910474	0,074624	3,95	0,896960	0,039564

**APÉNDICE 11.11.** Valores simulados para el ejemplo de productividad = 250 L/h, volumen inicial 1000 L y % de recuperación de oligosacáridos superior al 95% (Continuación).

$\lambda_{os}$  y  $\lambda_{ca}$ , cociente entre el radio efectivo y radio de poro de los oligosacáridos y el calcio.

t, h	$\lambda_{os}$	$\lambda_{ca}$	t, h	$\lambda_{os}$	$\lambda_{ca}$	t, h	$\lambda_{os}$	$\lambda_{ca}$
0,00	0,130816	0,670870	1,40	0,137205	0,703632	2,70	0,148970	0,763969
0,10	0,131158	0,672622	1,50	0,137868	0,707036	2,80	0,149897	0,768721
0,20	0,131512	0,674438	1,60	0,138580	0,710684	2,90	0,150811	0,773413
0,30	0,131879	0,676321	1,70	0,139346	0,714615	3,00	0,151715	0,778047
0,40	0,132260	0,678277	1,80	0,140177	0,718874	3,10	0,152608	0,782626
0,50	0,132657	0,680311	1,90	0,141083	0,723520	3,20	0,153491	0,787154
0,60	0,133070	0,682431	1,99	0,142058	0,728524	3,30	0,154364	0,791633
0,70	0,133502	0,684643	2,00	0,142079	0,728629	3,40	0,155228	0,796065
0,80	0,133953	0,686957	2,10	0,143113	0,733936	3,50	0,156084	0,800453
0,90	0,134426	0,689381	2,20	0,144130	0,739147	3,60	0,156932	0,804800
1,00	0,134922	0,691928	2,30	0,145128	0,744268	3,70	0,157771	0,809106
1,10	0,135445	0,694610	2,40	0,146111	0,749306	3,80	0,158603	0,813373
1,20	0,135998	0,697443	2,50	0,147078	0,754265	3,90	0,159428	0,817604
1,30	0,136583	0,700443	2,60	0,148030	0,759151	3,95	0,159840	0,819716

**Caudal de agua adicionado durante el proceso de diafiltración (W).**

t, h	W, mL/min	t, h	W, mL/min	t, h	W, mL/min
0,00	0,000	1,40	0,000	2,70	254,777
0,10	0,000	1,50	0,000	2,80	248,535
0,20	0,000	1,60	0,000	2,90	242,559
0,30	0,000	1,70	0,000	3,00	236,832
0,40	0,000	1,80	0,000	3,10	231,337
0,50	0,000	1,90	0,000	3,20	226,061
0,60	0,000	1,99	308,097	3,30	220,988
0,70	0,000	2,00	307,920	3,40	216,107
0,80	0,000	2,10	299,111	3,50	211,407
0,90	0,000	2,20	290,764	3,60	206,877
1,00	0,000	2,30	282,844	3,70	202,508
1,10	0,000	2,40	275,313	3,80	198,291
1,20	0,000	2,50	268,143	3,90	194,218
1,30	0,000	2,60	261,306	3,95	192,225