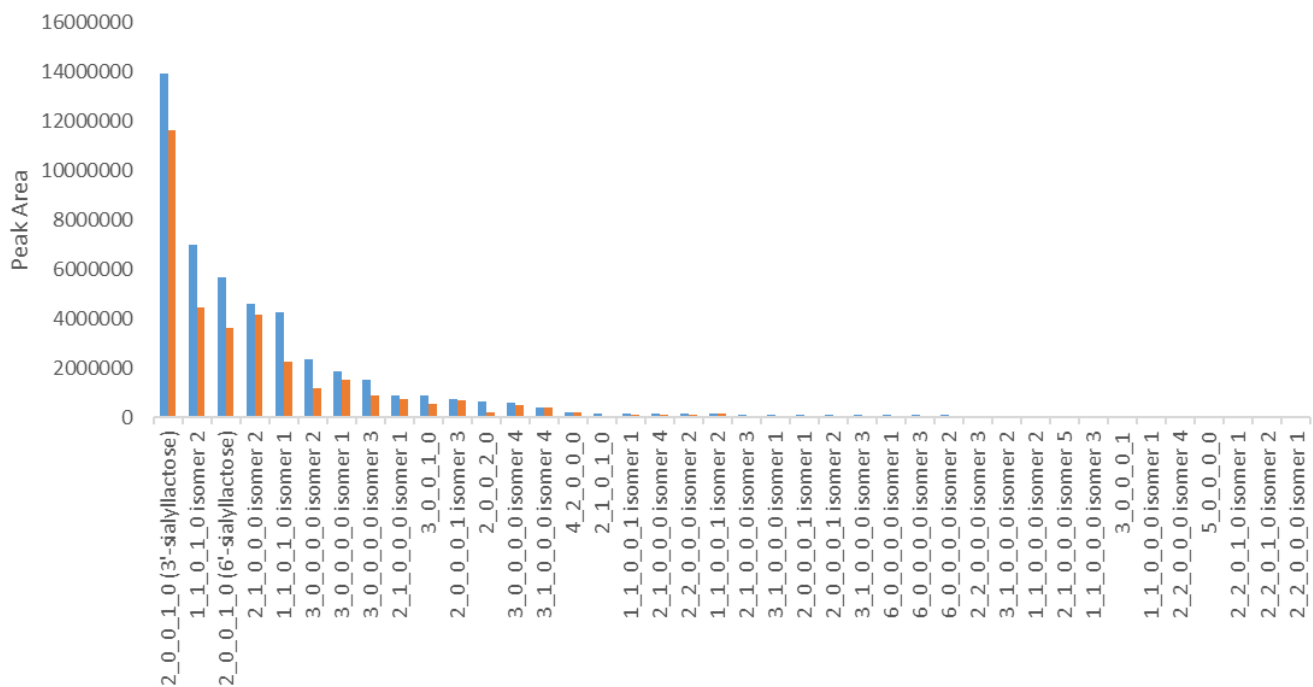
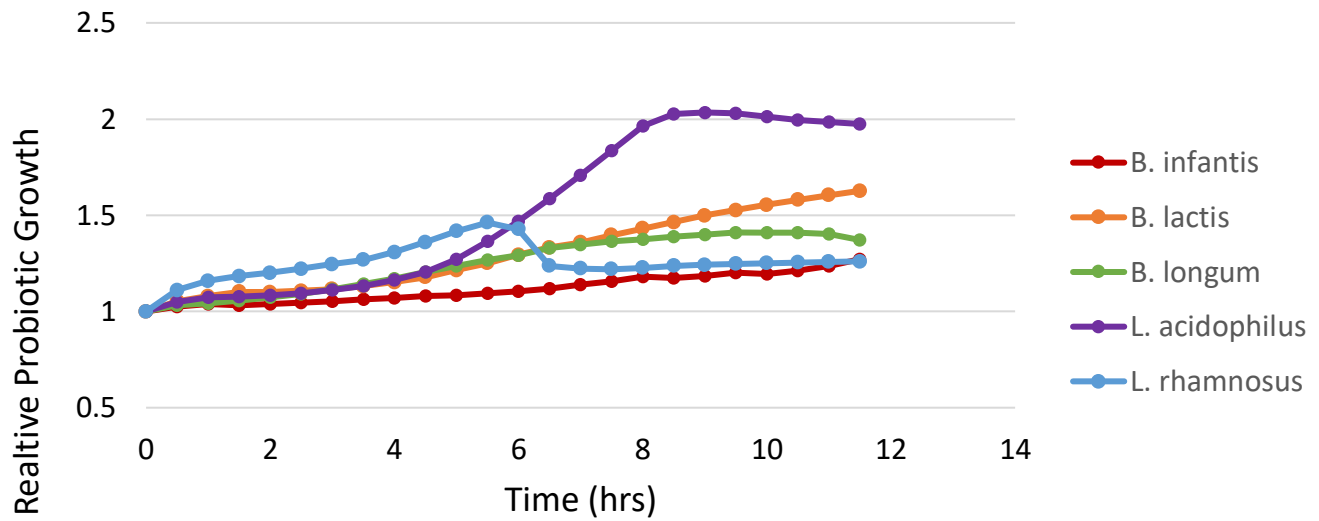


TECHNICAL WHITE PAPER: DISCOVERY AND VALIDATION OF PREBIOTIC PROPERTIES OF ULTRA-FILTERED COW COLOSTRUM AND CHICKEN EGG YOLK Brent Vaughan, Shane Lefler, David Vollmer, Dana Hoffman, Craig Oberg, & Danile Barile 4Life Research, Sandy, Utah; Utah State University; University of California-Davis OBJECTIVE The purpose of this study was to determine the oligosaccharide components in ultra-filtered cow colostrum and validate their use, along with chicken egg yolk, as a prebiotic ingredient.* BACKGROUND Prebiotics were discovered in the mid-1990s as nondigestible compounds that pass through the upper part of the gastrointestinal tract and colonize in the large bowel. While there, they stimulate the growth of beneficial bacteria by acting as their food substrate. There are several types of prebiotics, including oligosaccharides, which are complex sugars that can be derived from dairy products like milk. Cow colostrum also contains these prebiotic molecules, which are typically less than 1,000 daltons in size. The filtration processes used to concentrate 4Life Transfer Factor® molecules also have the ability to concentrate oligosaccharides, which makes them a potential rich source of prebiotics. Therefore, 4Life initiated a study about prebiotics in ultra- and nano-filtered cow colostrum and chicken egg yolk.* EXPERIMENTAL METHODS Oligosaccharide Determination and Quantification Ultra-filtered bovine colostrum oligosaccharides were isolated and purified via chloroform methanol extraction, protein precipitation, and solid phase extraction. The extracts were analyzed using an Agilent 6520 accurate-mass Quadrupole-Time-of-Flight mass spectrometer with a microfluidic nano-	INFORME TÉCNICO: DESCUBRIMIENTO Y VALIDACIÓN DE LAS PROPIEDADES PREBIÓTICAS DEL CALOSTRO BOVINO ULTRAFILTRADO Y LA YEMA DE HUEVO DE GALLINA Brent Vaughan, Shane Lefler, David Vollmer, Dana Hoffman, Craig Oberg y Danile Barile 4Life Research, Sandy, Utah; Utah State University; University of California-Davis OBJETIVO El propósito de este estudio fue determinar los componentes oligosacáridos en el calostro bovino ultrafiltrado y validar su uso, junto con la yema de huevo de gallina, como ingrediente prebiótico.* ANTECEDENTES Los prebióticos se descubrieron a mediados de los años 90 como compuestos no digeribles que atraviesan la parte superior del tracto gastrointestinal y colonizan el intestino grueso. Mientras permanecen allí, estimulan el crecimiento de las bacterias beneficiosas actuando como su sustrato alimenticio. Existen varios tipos de prebióticos, entre ellos los oligosacáridos, los cuales son azúcares complejos que pueden derivarse de los productos lácteos como la leche. El calostro bovino también contiene estas moléculas prebióticas, las mismas que típicamente tienen un tamaño menor a 1,000 daltones. Los procesos de filtración utilizados para concentrar las moléculas de 4Life Transfer Factor® también tienen la capacidad de concentrar los oligosacáridos, lo cual los convierte en una fuente potencialmente rica en prebióticos. Por lo tanto, 4Life inició un estudio sobre los prebióticos en el calostro bovino ultrafiltrado y en la yema de huevo de gallina.* MÉTODOS EXPERIMENTALES Determinación y cuantificación de oligosacáridos Los oligosacáridos del calostro bovino ultrafiltrado fueron aislados y purificados mediante la extracción con cloroformo y metanol, la precipitación de
--	---

electrospray liquid-chromatographic chip. Data was acquired in the positive-ion mode. Oligosaccharides were quantified using a Thermo Scientific ICS-5000 high-performance anion-exchange chromatography system with pulsed amperometric detection, equipped with an electrochemical cell with a disposable gold working electrode. Chromatographic separation of the oligosaccharides was carried out with a Dionex CarboPac PA200 analytical column. In Vitro Experiments Lactobacillus and Bifidobacterium strains were grown separately in MRS broth. Both organisms were incubated at 37 °C. Each culture was inoculated into sterile 12- or 24-well spectrophotometer plates containing ultra- and nano-filtered bovine colostrum and chicken egg yolk. All experiments were done in triplicate at a physiological pH of 5. Inoculated plates were placed in a Tecan Infinite M200 spectrophotometer and incubated at 37 °C with growth readings taken regularly for up to 12 hours. RESULTS Identifying oligosaccharides in cow colostrum A total of 40 oligosaccharides, were identified in the ultra-filtered cow colostrum by matching raw mass spectrometric data to an in-house library containing components that were previously identified from cow milk. Of the elucidated structures, 40% were sialic acid-containing, with the most concentrated being on the order of 10s to 100s mg/L.*	proteínas y la extracción en fase sólida. Se analizaron los extractos utilizando un espectrómetro de masas Agilent 6520 de masa exacta con analizador de tiempo de vuelo y cuadrupolo, con un chip cromatográfico de líquidos con electronanospray para microfluidos. La información se adquirió en el modo de iones positivos. Los oligosacáridos se cuantificaron utilizando un sistema de cromatografía de intercambio de aniones de alto rendimiento Thermo Scientific ICS-5000 con detección amperométrica pulsada y equipado con una celda electroquímica con un electrodo de trabajo desechable de oro. La separación cromatográfica de los oligosacáridos se llevó a cabo con una columna analítica Dionex CarboPac PA200. Experimentos in vitro Las cepas de Lactobacillus y Bifidobacterium fueron cultivadas por separado en un caldo MRS. Ambos organismos se incubaron a 37 °C. Cada cultivo fue inoculado en bandejas de espectrofotómetro estériles de 12 o 24 pocillos que contenía calostro bobino ultra y nanofiltrado, así como yema de huevo de gallina. Todos los experimentos se realizaron en triplicado con un pH fisiológico de 5. Las bandejas inoculadas se colocaron en un espectrofotómetro Tecan Infinite M200 y se incubaron a 37 °C con lecturas de crecimiento tomadas regularmente hasta 12 horas después. RESULTADOS Identificación de oligosacáridos en el calostro bovino Se identificaron un total de 40 oligosacáridos en el calostro bovino ultrafiltrado al comparar los datos sin procesar de la espectrometría de masas con una biblioteca interna que contiene los componentes de la leche de la vaca que se identificaron previamente. De las estructuras elucidadas, el 40% contenían ácido siálico, siendo la más concentrada en el orden de decenas y centenas de mg/L.*
---	--



Peak Area	Área del pico
Probiotic enhancement Ultra- and nano-filtered cow colostrum and chicken egg yolk demonstrated a stimulatory effect on each probiotic strain which could be measured and differentiated. Probiotic enhancements ranged from 111% to 868% compared to the baseline.*	Mejora en los probióticos El calostro bovino ultra y nanofiltrado y la yema de huevo de gallina demostraron tener un efecto estimulante en cada cepa probiótica, el cual podría ser medido y diferenciado. La mejora en los probióticos varió entre 111% y 868% en comparación con los datos de la línea de referencia.*



Relative Probiotic Growth	Crecimiento probiótico relativo
Time (hrs)	Tiempo (hrs)

CONCLUSIONS Forty different oligosaccharides were found within ultra-filtered cow colostrum. Colostrum and egg yolk components of 4Life Transfer Factor demonstrated their versatility as prebiotic ingredients.* *These statements have not been evaluated by the Food and Drug Administration. These products are not intended to diagnose, treat, cure, or prevent any disease.	CONCLUSIONES Se encontraron cuarenta oligosacáridos diferentes dentro del calostro bovino ultrafiltrado. Los componentes de calostro y huevo de gallina de 4Life Transfer Factor demostraron su versatilidad como ingredientes prebióticos.* *Estas declaraciones no han sido evaluadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). Estos productos no tienen la intención de diagnosticar, tratar, curar o prevenir ninguna enfermedad.
--	---