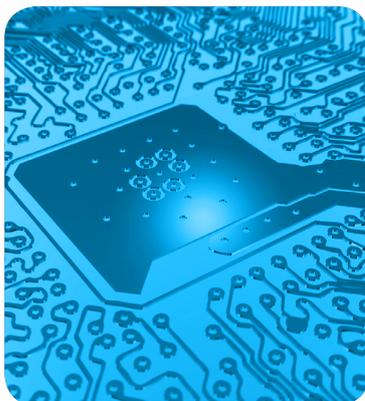




MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias /12-13

Máster en Química
Agrícola y Nuevos
Alimentos



**Utilización de
distintas glicosidasas
para la obtención de
carbohidratos bioacti-
vos derivados de la
lactosa y la sacarosa.**

Virginia Villarejo Guerra



Esta actividad de investigación, fundamentada como Trabajo Fin de Master, es la culminación del “**Master en Química Agrícola y Nuevos Alimentos**”, realizado durante el intervalo del Curso 2012-2013, denominado “**Utilización de distintas glicosidasas para la obtención de carbohidratos bioactivos derivados de la lactosa y sacarosa**”, impartido en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL bajo la dirección y supervisión de las Dras. Antonia Montilla Corredera y Nieves Corzo Sánchez (CSIC). Y la coordinación tutorial de la Dra. Tiziana Fornari Reale (UAM).

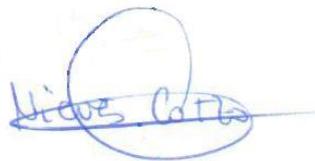
Madrid a 18 de Septiembre de 2013

Vº Bueno de las Directoras y la Tutora

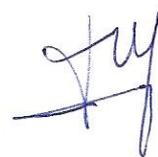
Fdo:



Dra. Antonia Montilla Corredera



Dra. Nieves Corzo Sánchez



Dra. Tiziana Fornari Reale

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1)	Microbiota intestinal	2
2)	Prebióticos	2
2.1	Oligosacáridos	3
3)	Obtención de oligosacáridos por síntesis enzimática	7
3.1	Oligosacáridos derivados de la lactosa	8
3.1.1	Galactooligosacáridos, GOS	9
3.1.2	Oligosacáridos derivados de la lactulosa, OsLu	11
3.1.3	Lactosacarosa	12
3.2	Fructooligosacáridos, FOS	14
II.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	16
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
1)	Reactivos.....	17
2)	Enzimas.....	17
3)	Caracterización enzimática.....	17
3.1	Determinación de la actividad hidrolítica de los preparados comerciales.....	17
3.2	Determinación de la actividad invertasa del preparado enzimático Lactozym Pure 6500L	20
3.3	Determinación del contenido en proteína del preparado enzimático Lactozym Pure 6500L.....	20
3.4	Selección del preparado enzimático	20
3.5	Reacciones enzimáticas con Lactozym Pure 6500L	21

4)	Técnicas analíticas para la determinación de carbohidratos	21
4.1	Cromatografía de Gases, CG.....	21
4.2	Cromatografía de líquidos de alta eficacia, HPLC	22
4.2.1	Cromatografía de Exclusión Molecular, SEC	22
4.2.2	Cromatografía en Fase Normal, NP-HPLC	22
4.3	Espectrometría de Masas, MALDI-TOF-MS.....	23
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
1)	Actividad hidrolítica de los preparados enzimáticos comerciales.....	24
2)	Determinación de la actividad hidrolítica de los preparados seleccionados.....	27
3)	Obtención de oligosacáridos derivados de sacarosa y lactosa utilizando el preparado Lactozym Pure 6500L	32
3.1	Obtención de oligosacáridos utilizando sacarosa	32
3.2	Obtención de oligosacáridos derivados de sacarosa y lactosa o lactulosa	34
3.2.1	Estudio de la composición de las mezclas de síntesis	34
3.2.2	Cuantificación de los oligosacáridos formados	37
V.	CONCLUSIONES	40
VI.	BIBLIOGRAFÍA	41

I. INTRODUCCIÓN

El estilo de vida actual, especialmente en aquellos países más avanzados, está caracterizado por la falta de actividad física, excesivo estrés y hábitos alimenticios poco saludables. Este conjunto de conductas poco recomendables hace que aumente el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes mellitus de tipo II, osteoporosis, hipertensión y envejecimiento prematuro entre otras anomalías. El considerable aumento de consumidores cada vez más concienciados con el mantenimiento de la salud ha creado una demanda, cada vez más creciente, de alimentos con componentes o ingredientes que presentan unas determinadas propiedades funcionales.

Un alimento funcional se define como aquel que, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, proporciona beneficios para la salud o reduce el riesgo de padecer enfermedades (Ashwell, 2005). Dicho concepto nació en Japón en los años 80, debido a la necesidad de garantizar una mejor calidad de vida, a la vista de las elevadas inversiones sanitarias originadas por el aumento de la longevidad de la población. Las múltiples posibilidades de elaboración de alimentos funcionales, basadas en la incorporación a un alimento tradicional de ingredientes con actividad biológica, en la eliminación de constituyentes no deseados o en la modificación de otros, hacen que la gama de productos comercializados actualmente haya aumentado de manera espectacular (Olano y Juárez, 2005; <http://www.foodsme-hop.eu/bases/food.nsf>).

Como sucede con cualquier alimento tradicional, la UE ha establecido unas bases legales para el control y comercialización de los alimentos funcionales informando al consumidor de sus características. En este caso concreto se rige por el Reglamento de la UE: (CE) nº 258/97. Posteriormente se han introducido nuevas regulaciones para salvaguardar la seguridad del consumidor, especialmente en lo referido al etiquetado y a las alegaciones nutricionales y de salud. Así, en el año 2000 se introdujo una nueva Directiva (2000/13/EC) sobre el etiquetado de alimentos funcionales cuyo objetivo era garantizar al consumidor toda la información esencial en lo que respecta a la composición del producto, el fabricante, los métodos de almacenamiento y preparación, etc. En Diciembre de 2006, el Consejo y el Parlamento Europeo establecieron una nueva normativa acerca del uso de alegaciones nutricionales y de salud. Con esta reglamentación se pretende no sólo garantizar la seguridad del consumidor, sino también asegurar una competencia justa y promover y proteger la innovación en el ámbito de los alimentos. Sólo los productos que ofrezcan auténticos beneficios nutricionales o sobre la salud podrán referirse a ellos en anuncios publicitarios y en sus etiquetas.

Un alimento puede considerarse funcional cuando contiene algún ingrediente beneficioso para la salud; reduce la concentración de sustancias nocivas o favorece la eliminación de estas, o cuando modifican la naturaleza o biodisponibilidad de algún componente. Entre los ingredientes con potencial funcionalidad, en los últimos años, han suscitado especial interés los relacionados con la función gastrointestinal, ya que los problemas relacionados con dicha función afectan a un gran sector de la población (Saarela y col., 2002; Swennen y col., 2006).

1) MICROBIOTA INTESTINAL

La microbiota intestinal es el conjunto de bacterias que viven en el intestino y mantiene una relación de simbiosis a comensalismo con el huésped (Heine y col., 1998). Se calcula que la microbiota del ser humano está constituida por unas 2000 especies bacterianas diferentes, siendo beneficiosas muchas de ellas, y solamente unas 100 especies pueden llegar a ser perjudiciales (Roberfroid y col., 2010).

La flora intestinal juega un papel importante en el mantenimiento de la salud del huésped contribuyendo en la digestión y asimilación de los nutrientes y en la estimulación del sistema inmunológico, por tanto, un funcionamiento adecuado del tracto gastrointestinal es de gran importancia para lograr una actividad equilibrada del organismo. Para ello es necesario mantener un balance apropiado del ecosistema intestinal, que proteja al huésped de la colonización de microorganismos potencialmente patógenos que pueden ser ingeridos o estar presentes en el huésped. Además, numerosos microorganismos sintetizan sustancias beneficiosas para el huésped como las vitaminas del complejo B y la vitamina K (Hopper y col., 2002).

La composición de la microbiota intestinal difiere entre individuos y va variando durante el transcurso de la vida desde el nacimiento hasta la vejez. Existen, además, una serie de factores muy influyentes, tales como la dieta, el estado de salud o enfermedad, el tratamiento con medicamentos, la localización geográfica, la raza, las circunstancias socio-económicas, así como el estilo de vida. Para que el balance del ecosistema intestinal sea óptimo, las bacterias beneficiosas, tales como los lactobacilos y bifidobacterias, deben predominar. Se estima que cerca del 85% de la microbiota intestinal en una persona sana debe estar constituida por bacterias beneficiosas, para evitar la infección por microorganismos patógenos (Sullivan y Edlund, 2001).

2) PREBIÓTICOS

Se han establecido diferentes definiciones de prebiótico, en 1995 Gibson y Roberfroid definieron por primera vez el término prebiótico como: “Un ingrediente alimentario no digerible capaz de alcanzar el colon sin ser hidrolizado ni absorbido en la parte más alta del tracto gastrointestinal. El aspecto clave reside en su selectividad para promover el crecimiento de bacterias beneficiosas asociadas con la salud y bienestar, tales como bifidobacterias y lactobacilos, a expensas de otras indeseables como clostridias”. Posteriormente se amplió la definición de prebiótico indicando que además de ser fermentado selectivamente, da lugar a cambios específicos tanto en la composición como en la actividad de la microbiota intestinal confiriendo beneficios tanto en la salud como en el bienestar del individuo” (Gibson y col., 2004).

Más recientemente, Roberfroid y col., (2010) con el objeto de validar y expandir el concepto de prebiótico consideran el “efecto prebiótico” como la: “estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad/es de uno o de un número limitado de géneros/especies de microorganismos de la microbiota intestinal que confiere beneficios a la salud del huésped”. Así, se está empezando a utilizar la expresión “efecto prebiótico“, para

identificar o hacer referencia a los cambios selectivos en la composición de la microbiota intestinal, así como a determinados efectos fisiológicos, que se estudian tanto en modelos experimentales como en estudios de intervención en humanos.

La mayoría de los efectos beneficiosos, de los prebióticos, están asociados con la optimización de la función del colon y su metabolismo. Por ejemplo, el aumento de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), provocan una moderada reducción del pH intraluminal del colon, favoreciendo la conversión de NH_3 a NH_4^+ (forma nitrogenada no-absorbible que se excreta) y mejorando la absorción de minerales (Tamura y col., 1993). También, pueden producir un aumento del volumen fecal, así como una disminución de la fermentación proteolítica y estimulación del sistema inmune (Forchielli y Walker, 2005; Wang, 2009; Schuster-Wolff-Bühning y col., 2010; Panesar y Kumari, 2011).

Para que los ingredientes prebióticos puedan considerarse como tales y por lo tanto producir estos efectos es indispensable que cumplan una serie de requisitos que se muestran en la Figura I1.

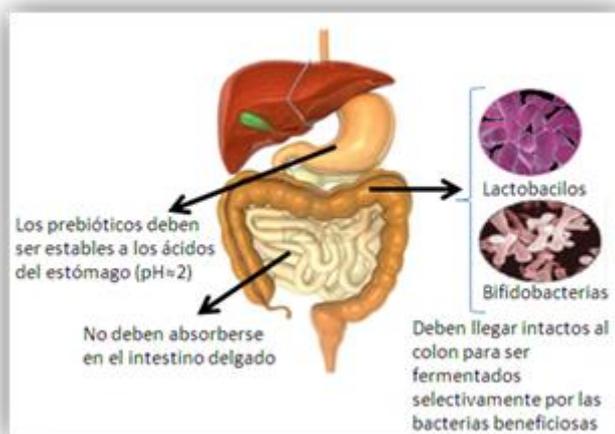


Figura I1: Condiciones que deben cumplir los ingredientes para ser considerados como prebióticos. (Tuohy y col., 2005).

De entre todos los ingredientes alimentarios, los carbohidratos no digeribles (oligo- y polisacáridos) son los candidatos más importantes para ser prebióticos. Debido a su estructura química, no se absorben en la parte alta del tracto gastrointestinal, ni son hidrolizados por las enzimas digestivas humanas, llegando intactos al colon y sirven como sustrato para las bacterias colónicas endógenas y así indirectamente, originan energía, sustratos metabólicos y micronutrientes necesarios para el huésped. (Stanton y col., 2003).

2.1 Oligosacáridos

Los oligosacáridos son polímeros de bajo peso molecular, que contienen de 2 a 10 unidades de monosacáridos unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos (Weijers y col., 2008). Dentro de este grupo pueden existir oligosacáridos digeribles y los que no lo son. Los no digeribles son resistentes a la hidrólisis por parte de las enzimas digestivas humanas

(Patel y Goyal, 2011), pudiendo llegar al colon, donde son metabolizados por la microbiota intestinal. Cuando estos oligosacáridos son selectivamente fermentados por las bifidobacterias y los lactobacilos (microorganismos probióticos), dando lugar a la formación de dióxido de carbono, hidrógeno y AGCC, se pueden considerar como prebióticos. El requisito de selectividad es el más difícil de comprobar debido a la dificultad para demostrar la influencia del oligosacárido sobre el cambio en la microbiota, favoreciendo el crecimiento de microorganismos beneficiosos frente a los perjudiciales.

Los oligosacáridos prebióticos ejercen una serie de efectos beneficiosos tales como aumento de la motilidad intestinal e incremento de la excreción fecal; protección frente a infecciones de los sistemas respiratorio y urogenital así como del tracto gastrointestinal (Figura I2); tratamiento de la encefalopatía hepática, modulación del sistema inmune; actividad anticancerígena en el colon, mejora de la absorción de minerales, etc. Estos efectos influyen beneficiosamente en la salud, lo que hace que los alimentos con oligosacáridos prebióticos puedan considerarse alimentos funcionales (Rivero-Urgel y Santamaria-Orleans, 2001).

Por otra parte, algunas de las propiedades físico-químicas de los oligosacáridos que los hacen interesantes como ingredientes alimentarios son su elevada solubilidad en agua, sus propiedades gelificantes, bajo contenido calórico y su menor poder edulcorante conforme aumenta la cadena glucídica, haciéndoles, por ejemplo, excelentes sustitutos de la grasa en formulaciones dietéticas (Mussatto y Mancilha, 2006).

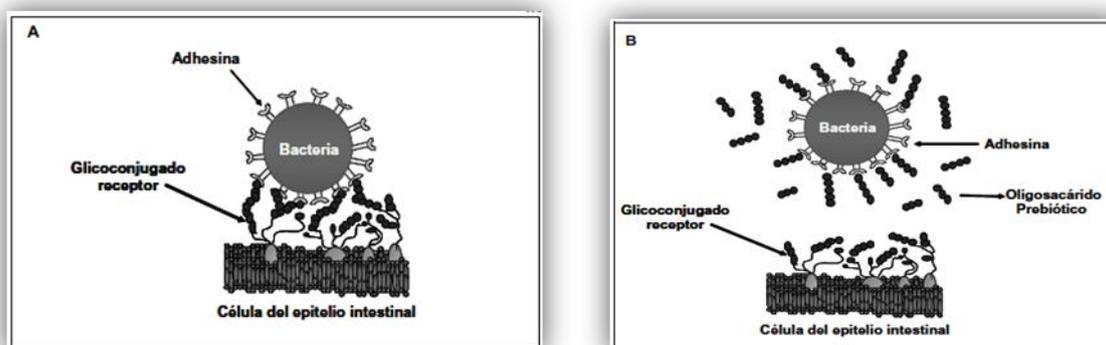


Figura I2: Modelo de acción directa de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones. (A) Las adhesinas bacterianas reconocen a los oligosacáridos receptores en las células del epitelio intestinal. (B) Inhibición de la adhesión bacteriana por prebióticos con estructuras similares a los glicanos receptores (Sharon, 2006).

Existe un amplio número de carbohidratos no digeribles, sin embargo no todos tienen actividad prebiótica. Los oligosacáridos naturales se encuentran principalmente en la leche materna y en vegetales, en la Tabla I1 se muestran los diferentes tipos existentes y su fuente de obtención.

Tabla I1: Fuente de obtención y aplicaciones de los oligosacáridos no digeribles. (Patel y Goyal, 2011)

Oligosacárido	Fuente	Aplicación
Arabinooligosacáridos	Remolacha azucarera	Prebiótico
Ciclodextrinas	Almidón	Estabilizar compuestos volátiles. Emulsionador de aceites. Antioxidante. Proteger frente a la fotodegradación. Enmascarador del amargor de alimentos y fármacos. Biodisponibilidad de fármacos
Fructooligosacáridos (FOS)	Raíz de achicoria. Remolacha.	Prebióticos. Mejorar la absorción intestinal de Ca y Mg. Prevenir infecciones urogenitales. Edulcorar bebidas. Reducir riesgo de cáncer de colon.
Galactooligosacáridos (GOS)	Leche	Prebióticos.
Gentiooligosacáridos	Almidón.	Prebiótico. Potenciador del sabor.
Glucooligosacáridos	Sacarosa	En dermoestética, promover la flora cutánea.
Isomaltooligosacáridos	Almidón.	Anti-cariogénico y bifidogénico.
Lactosacarosa	Lactosa de leche y sacarosa de remolacha.	Bifidogénico.
Lactulosa	Leche	Prebiótico, tratar la hiperamonemia y encefalopatía portosistémica hepática, laxante, alimentación infantil.
Maltooligosacáridos	Almidón	Reducir el contenido de <i>Clostridium</i> y <i>Enterobacteriaceae</i> .
Mananooligosacáridos	Levaduras (Fragmentos de pared celular)	Modular la microbiota intestinal del pescado. Alterar la respuesta de linfocitos <i>in vitro</i> . Alternativa a los antibióticos en dietas de engorde de pollos.
Oligosacáridos de algas	Algas (Agarosa)	Antioxidante y prebiótico.
Oligosacáridos de la leche humana	Leche humana	Prebióticos. Desarrollo del sistema inmune.
Oligosacáridos derivados de la pectina	Plantas superiores, frutas y verduras.	Preparados para lactantes, Alivio de diarrea. Eliminar de metales pesados. Promover la adsorción Ca. Antibacteriano y antioxidante.

Tabla 11: Continuación. Fuente de obtención y aplicaciones de los oligosacáridos no digeribles. (Patel y Goyal, 2011)

Oligosacárido	Fuente	Aplicación
Quitooligosacáridos	Caparazón crustáceos (Quitosano)	Antioxidante, antitumoral, anti-hipertensivos, anti-microbiana e inmunopotenciadores. Proteger las células normales de la apoptosis.
Xilooligosacáridos y Feruloiloligosacáridos	Salvado de trigo y paja, madera de álamo, cáscaras de cebada, cáscara de almendra, bambú y mazorca de maíz.	Prebióticos. Cosméticos. Regular el crecimiento de las plantas. Antioxidante. Agente gelificante. Tratar diabetes, arteriosclerosis y cáncer de colon.
α-galactósidos	Soja y otras leguminosas	Promover la exclusión competitiva de patógenos. Reducir estrés oxidativo. Evitar enfermedades cardiovasculares.
β-Glucanooligosacáridos	Avena	Fomentar el crecimiento de lactobacilos.

En la leche, además de la lactosa que es el carbohidrato mayoritario, están presentes oligosacáridos cuya composición y contenido depende de la especie animal de que se trate y del estado de lactación. La mayor parte están constituidos por una molécula de lactosa en su extremo reductor a la que mediante la acción de diferentes glicosiltransferasas, se le unen residuos de galactosa, *N*-acetil-glucosamina, fucosa o ácido *N*-acetil-neuramínico en distintas proporciones. Los enlaces glicosídicos de las moléculas son resistentes a las enzimas digestivas y por tanto los oligosacáridos llegan al colon donde son metabolizados por la flora intestinal. En la leche humana, el contenido en oligosacáridos es aproximadamente de 5-10 g/L y se han identificado más de 130 compuestos (Bode, 2009). Aunque los beneficios que aporta el consumo de dichos oligosacáridos son considerados únicos, su utilización en la elaboración de alimentos a gran escala es prácticamente imposible dado su escaso contenido en las leches habitualmente empleadas en la industria (vaca, oveja, cabra, búfala). Por ello existe un gran interés en el desarrollo de procedimientos de obtención de oligosacáridos derivados de lactosa y de otras fuentes que presenten propiedades prebióticas.

Entre los más utilizados en la industria alimentaria destacan los fructanos (inulina y oligofructosa, FOS), galactooligosacáridos (GOS) y lactulosa (Roberfroid y col., 2003; Goulas y col., 2007) y solamente de estos existe suficiente base científica para considerarlos como prebióticos

3) OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS POR SÍNTESIS ENZIMÁTICA

La síntesis de oligosacáridos puede ser catalizada por dos tipos de enzimas, las glicosidasas (EC 3.2.1), con actividad hidrolítica y de transglicosilación, activas frente a sustratos simples como la lactosa o la sacarosa, y las glicosil-transferasas (EC 2.4) (Monsan y Paul, 1995), más específicas, pero que necesitan sustratos modificados como azúcares-nucleótidos encareciendo el proceso. Por este motivo, la mayor parte de los carbohidratos prebióticos se obtienen mediante síntesis enzimática utilizando enzimas del primer tipo, que suelen ser de origen microbiano, provenientes de hongos filamentosos (*Aspergillus oryzae* y *A. niger*), de levaduras (*Kluyveromyces lactis* y *K. marxianus*) y de bacterias (*Bacillus circulans* y *B. subtilis*) (Tabla I3). Una de las principales diferencias de estas enzimas es su pH óptimo de actuación, siendo de 3 a 5 para las de origen fúngico y de 6 a 7 para las de levaduras y bacterias (Husain, 2010).

Tabla I3: Fuentes microbianas de β -galactosidasas y β -fructosidasas (Sangeetha y col., 2005; Panesar y col., 2006).

	Microorganismos productores de β -galactosidasas	Microorganismos productores de β -fructosidasas
Hongo:	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. palmi</i> // <i>Aspergillus foetidis</i> , <i>A. fonsecaeu</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. carbonarius</i> // <i>Aureobasidium pullulans</i> // <i>Beauveria bassiana</i> // <i>Curvularia inaequalis</i> // <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i> // <i>Mucor meihei</i> , <i>M. pusillus</i> // <i>Neurospora crassa</i> // <i>Paecilomyces varioti</i> // <i>Penicillium conescens</i> // <i>P. chrysogenum</i> // <i>Rhizobium meliloti</i> // <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> // <i>Scopulariopsis</i> sp. // <i>Streptomyces violaceus</i> // <i>Trichoderma reesei</i> .	<i>Aureobasidium pullulans</i> // <i>Aspergillus japonicus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. sydowi</i> , <i>A. citrinum</i> // <i>Calviceps purpurea</i> // <i>Fusarium oxysporum</i> // <i>Penicillium frequentans</i> , <i>P. spinulosum</i> , <i>P. citrinum</i> // <i>Phytophthora parasitica</i> // <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> // <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
Levadur	<i>Bullera singularis</i> // <i>Candida pseudotropicalis</i> // <i>Saccharomyces anamensis</i> , <i>S. fragilis</i> // <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> , <i>K. fragilis</i> , <i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i> .	<i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>Candida kefyr</i> // <i>Debaryomyces cantarelli</i> // <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. kudriavzevii</i> , <i>S. mikatae</i> , <i>S. paradoxus</i> .
Bacteri:	<i>Arthrobacter</i> sp. // <i>Bacillus acidocaldarius</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. stearothermophilus</i> // <i>Bacteroides polypragmatus</i> // <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. infantis</i> // <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. thermosulfurogens</i> // <i>Corynebacterium murisepticum</i> // <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>E. cloacae</i> // <i>Escherichia coli</i> // <i>Klebsiella pneumonia</i> // <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. kefirianofaciens</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. sporogenes</i> , <i>L. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> // <i>Leuconostoc citrovorum</i> // <i>Pediococcus acidilacti</i> , <i>P. pento</i> // <i>Propionibacterium shermanii</i> // <i>Pseudomonas fluorescens</i> // <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> // <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. thermophiles</i> // <i>Sulfolobus solfataricus</i> // <i>Thermoanaerobacter</i> sp. <i>Thermus rubus</i> , <i>aquaticus</i> , <i>T. thermophiles</i> // <i>Xanthomonas campestris</i> .	<i>Arthrobacter</i> sp. <i>Bacillus macerans</i> .

Entre las enzimas glicosidasas podemos destacar, por su importancia industrial, las que tienen actividad fructosiltransferasa, para la síntesis de FOS a partir de sacarosa, y aquellas con actividad galactosiltransferasa para la síntesis de GOS a partir de lactosa. Industrialmente la β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) proveniente de la *K. lactis* es la más usada para elaborar productos lácteos bajos en lactosa aptos para el consumo de personas intolerantes a este disacárido (Klewicki, 2007) y las β -fructosidasas (EC 3.2.1.26) provenientes de *Aspergillus* sp. para la producción de FOS.

Los GOS, al encontrarse de manera natural en la leche materna, y los FOS, en vegetales como cebolla, etc., están considerados como ingredientes alimentarios en la Unión Europea (EFSA); y como GRAS (Generally Recognized as Safe) en USA y como FOSHU (Food of Specified Health Use) en Japón (Tzortis, 2009).

3.1 Oligosacáridos derivados de la lactosa

La lactosa, β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc, es el principal componente del suero de quesería, subproducto que se genera en grandes cantidades en la industria quesera. Este carbohidrato se recupera del suero por diferentes procesos que conllevan una concentración, cristalización, separación, refinado, secado y molienda. Para ampliar el espectro de utilización, la lactosa se puede modificar química o enzimáticamente, sometiéndose a hidrólisis y transglicosilación, oxidación, reducción, isomerización o esterificación, obteniendo derivados tales como GOS, lactulosa, lactitol, lactosacarosa o ácido lactobiónico, que se encuentran actualmente comercializados. La hidrólisis enzimática de la lactosa por la acción de la β -galactosidasa está representada en la Figura I3.

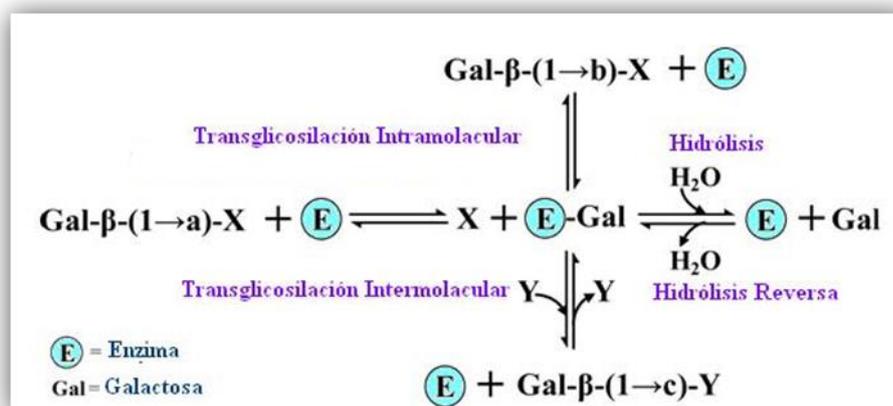


Figura I3: Esquema general de la hidrólisis de la lactosa y síntesis de GOS. (a), (b), y (c): 2, 3, 4, 6, (a \neq b) indican la posición del enlace glicosídico. (X) es el galactosil donador; (Y) es el galactosil aceptor. En la transglicosilación intramolecular, (X) hace a la vez de donador y aceptor cambiando únicamente la posición del enlace. Generalmente la lactosa es el sustrato inicial a=4 y (X) glucosa. Durante el progreso de la reacción los productos generados son sustratos potenciales para el enzima. (Y) puede tener una de las siguientes estructuras: glucosa, Gal, Gal-Gal, o [Gal]_n-Glc (con 1 \leq n \leq 6) (Torres y col., 2010).

En la reacción de transglicosilación, la β -galactosidasa hidroliza la lactosa transfiriendo la unidad de galactosa a grupos aceptores nucleófilos que contienen un grupo hidroxilo tales como el agua, liberando la galactosa, o a otro carbohidrato (lactosa, glucosa o galactosa) obteniendo un di-, tri- u oligosacárido de mayor grado de polimerización (GP) (Schuster-Wolff-Bühning y col., 2010; Torres y col., 2010).

3.1.1 Galactooligosacáridos, GOS.

A pesar de que la formación de GOS fue descrita hace 60 años (Aronson, 1952), se ha producido un renovado interés en los últimos años debido al reconocimiento de estos oligosacáridos como ingredientes prebióticos fisiológicamente activos que en el colon ejercen un importante efecto sobre la microbiota intestinal promoviendo el crecimiento de bifidobacterias, (Mahoney, 1998).

Los GOS son mezclas de oligosacáridos que se obtienen por transgalactosilación a partir de lactosa utilizando β -galactosidasas. Contienen de 2 a 10 moléculas de galactosa unidas a una molécula de glucosa final mediante enlace glicosídico $\beta(1\rightarrow2)$, $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ y $\beta(1\rightarrow6)$ (Figura I4). Este enlace variará dependiendo del tipo de β -galactosidasa utilizada en la síntesis enzimática (Matella y col., 2006; Hsu y col., 2007).

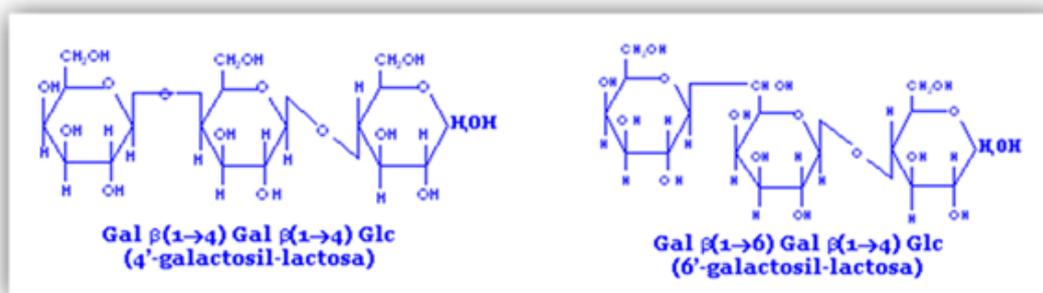


Figura I4: Estructura química de la 4'-galactosil-lactosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc) y la 6'-galactosil-lactosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc) (Del Val y col., 2001).

Cuando en esta reacción se lleva a cabo en presencia de lactosa y de fructosa se forma también lactulosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Fru, Figura I5) (Schuster- Wolff-Bühning y col., 2010).

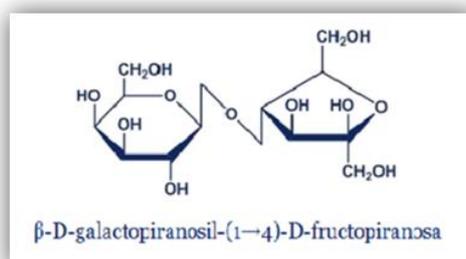


Figura I5: Estructura química de la lactulosa.

Las β -galactosidasas procedentes de bacterias lácticas y bifidobacterias son también de gran interés para la producción de GOS, ya que estos compuestos pueden inducir selectivamente el crecimiento y actividad metabólica de estos dos tipos de microorganismos (Rabiu y col., 2001; Depeint y col., 2008; Nguyen y col., 2012; Osman y col., 2012; Sriphannam y col., 2012).

Los GOS producen una serie de efectos fisiológicos beneficiosos en personas adultas y animales tales como mejoría en la frecuencia y consistencia de las heces y el aumento de la absorción mineral (calcio y magnesio) (Lamsal, 2012; Walton y col., 2012). La aplicación de GOS es particularmente interesante en preparados para lactantes y leche de crecimiento, debido a su parecido con los oligosacáridos de la leche humana. Se ha encontrado que un alto nivel de GOS en fórmulas infantiles podría estimular el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias intestinales. Otra aplicación potencial es en alimentos especializados para personas de edad avanzada y hospitalizadas (Lamsal, 2012). Estudios recientes sugieren que, además de su carácter prebiótico, los GOS podrían presentar también propiedades anti-inflamatorias. Este efecto se ha probado en ratones tratados con *Helicobacter hepaticus*, en los que la ingesta de estos oligosacáridos redujo significativamente la gravedad de la colitis y aumentó el porcentaje de células NK (Gopalakrishnan y col., 2012). Otras investigaciones han indicado que la ingesta de GOS por parte de individuos intolerantes a la lactosa, reduce significativamente los síntomas negativos (Savaiano y col., 2012). Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para confirmar estos efectos.

Tabla I4: Propiedades fisicoquímicas generales de los GOS (Torres y col., 2010).

Propiedades Fisicoquímicas	
Solubilidad	Aprox. 80% (p/p) solubilidad en agua.
Apariencia	Translúcidos, incoloros.
Viscosidad	Similar al jarabe de maíz de alto contenido en fructosa.
Estabilidad térmica	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estable a 160 °C durante 10 min a pH 7. ✓ Estable a 100 °C durante 10 min a pH 2. ✓ Estable a 37 °C durante meses a pH 2.
Punto de congelación	Reducen el punto de congelación de los alimentos.
Propiedades humectantes	Alta capacidad de retención de humedad evitando el secado excesivo.
Poder edulcorante	0,3 a 0,6 veces el de la sacarosa.

En otros sectores como las empresas farmacéuticas y cosméticas se pueden utilizar estos derivados por sus excelentes propiedades como estimulante selectivo de las bacterias beneficiosas de la piel (Krutmann, 2009).

Por otra parte, los GOS presentan una serie de propiedades físico-químicas, tal como se muestran en la Tabla I4, que son importantes para su utilización en la industria.

3.1.2 Oligosacáridos derivados de la lactulosa: OsLu.

La lactulosa es un disacárido constituido por una molécula de galactosa y otra de fructosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Fru) que se forma durante los tratamientos térmicos de la leche y se obtiene de modo industrial a partir de la lactosa mediante isomerización en medio básico (Montgomery y Hudson, 1930; Kozempel y col., 1995). Sus efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las bifidobacterias presentes en el intestino humano son conocidos desde hace más de cincuenta años (Petuely, 1957). Se han realizado un amplio número de trabajos sobre los efectos de la lactulosa en el organismo concluyendo que la lactasa humana presente en el intestino delgado no puede hidrolizar este disacárido (Ruttloff y col., 1967), de forma que llega intacta al colon, donde puede ser metabolizada por las bacterias probióticas de la flora intestinal, del mismo modo que los oligosacáridos presentes en la leche humana estimulan el crecimiento de bifidobacterias en bebés. Desde los años 50, este carbohidrato se utiliza en farmacia como laxante, en el tratamiento de la encefalopatía hepática y como un ingrediente prebiótico (Méndez y Olano, 1979; Schuman, 2002; Sharma y col., 2008; Panesar y Kumari, 2011). Estudios realizados con adultos sanos indican un consumo óptimo de 10 g al día para inducir un aumento de bifidobacterias y un descenso en la población de clostridios (Tuohy y col., 2002), sin embargo su principal desventaja es que puede producir gases, movimientos intestinales frecuentes y diarrea; estos efectos están producidos por la rápida fermentación de la lactulosa (Schuster-Wolff-Bühning y col., 2010).

Ya que actualmente existe un gran interés en la obtención de nuevos carbohidratos con propiedades prebióticas mejoradas, nuestro grupo de investigación se planteó la posibilidad de obtener oligosacáridos derivados de la lactulosa (OsLu) mediante transglicosilación con β -galactosidasas, abriendo nuevas perspectivas para la elaboración de nuevos carbohidratos prebióticos. Estos oligosacáridos, al tener mayor peso molecular, serán fermentados por bifidobacterias y lactobacilos, más lentamente y alcanzarán zonas más distales del intestino grueso donde se producen un número elevado de patologías.

Martínez-Villaluenga y col., (2008b) y Cardelle-Cobas y col., (2008a) sintetizaron por primera vez, utilizando β -galactosidasas de *K. lactis* (Lactozym 3000 L HP G) y *A. aculeatus* (Pectinex Ultra SP-L), OsLu por transgalactosilación de la lactulosa. De estos, se caracterizaron dos trisacáridos (Figura I6), uno de ellos presenta una unidad de galactosa unido al C-6 de la galactosa, la 6'-galactosil-lactulosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Fru), y en el otro la unidad de galactosa está unida al C-1 de la molécula de fructosa, la 1-galactosil-lactulosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Fru-(1 \rightarrow 1)- β -D-Gal).

Aunque la estructura de la lactosa y lactulosa es semejante las β -galactosidasas no se comportan exactamente igual con ambos sustratos, así, con las enzimas procedentes de *K. lactis* (Padilla y col., 2012) y *A. oryzae* se obtienen mayores rendimientos de OsLu, mientras que el uso del enzima de *B. circulans* (Corzo-Martínez y col., 2013) da lugar a una mayor formación de GOS (Guerrero y col., 2013).

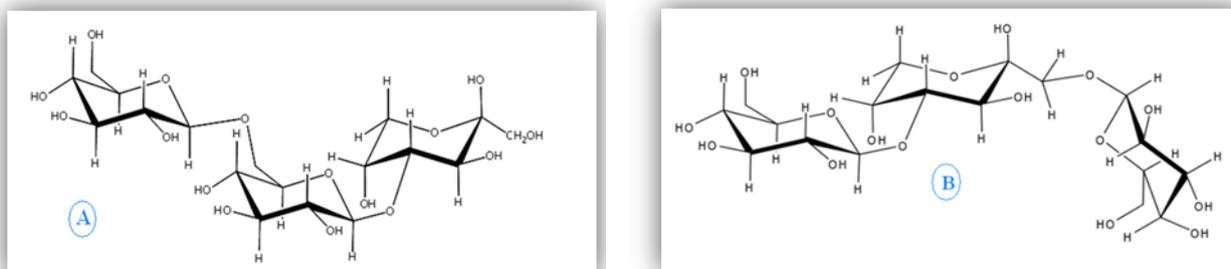


Figura 16: Estructura de los OsLu producidos en la transgalactosilación de la lactulosa catalizada por β -galactosidasas. (A) 6'-galactosil-lactulosa y (B) 1-galactosil-lactulosa.

Diferentes ensayos de fermentación *in vitro* utilizando cultivos puros Cardelle-Cobas y col., (2011b) así como cultivos fecales (Cardelle-Cobas y col., 2009; 2012) han demostrado la estimulación de crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos cuando estos carbohidratos se utilizan como única fuente de carbono. Además los OsLu presentaron mayores valores de índice prebiótico que la lactulosa, cuando los cultivos se incubaban durante períodos largos (24h). Asimismo, se ha demostrado que los OsLu son significativamente más resistentes a la digestión intestinal que los GOS (12.5 frente a un 52.9%), constatando que cuando GOS y OsLu alcanzan el intestino grueso son totalmente fermentados, no detectándose su presencia en heces (Hernández-Hernández y col., 2012). Sin embargo, la característica más notable de los OsLu es la de constituir una alternativa como prebiótico frente al disacárido de partida, la lactulosa.

A pesar de los efectos beneficiosos de GOS y OsLu, hay pocos trabajos en los que se estudia la estabilidad de estos oligosacáridos no sólo durante el proceso de elaboración, sino también durante el almacenamiento (Huebner y col., 2008). En el caso de OsLu, los ensayos clínicos son necesarios para evaluar la posibilidad de la introducción de esta nueva generación de prebióticos como ingredientes funcionales en los alimentos y productos alimenticios.

3.1.3 Lactosacarosa.

La lactosacarosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru) es un trisacárido que se obtiene mediante la enzima levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Aerobacter levanicum*. Este trisacárido fue estudiado por primera vez por Avigad (1957) quien lo sintetizó utilizando lactosa como aceptor y sacarosa como donante de la de fructosa. El residuo fructosil- se transfiere al C-1 de la glucosa de la lactosa, formándose un trisacárido no reductor. Las levansacarosas de distinto origen han sido utilizadas para la obtención de lactosacarosa a

partir de *Bacillus* sp. y células enteras de *Paenibacillus polymyxa* (Choi y col., 2004); de *Sterigmatomyces elviae* (Lee y col., 2007); y de *Arthrobacter* sp. (Ruan y col., 2012)

La lactosacarosa se forma también por transgalactosilación de la sacarosa en presencia de lactosa catalizada por β -galactosidasas (*B. circulans*) tal como se observa en la Figura I7. En esta reacción la galactosa liberada se une al C-4 de la glucosa presente en la sacarosa dando lugar al mencionado trisacárido, obteniéndose el mayor rendimiento si están presentes donante y aceptor en una proporción molar de 1:1 a 1:2. Altas concentraciones de sacarosa, es decir, de donante, disminuyen el rendimiento puesto que queda sin reaccionar cantidades significativas de sustrato (Li y col., 2009). En esta reacción se obtienen, además, GOS (compuesto III) y otros trisacáridos análogos a la lactosacarosa (compuesto II).

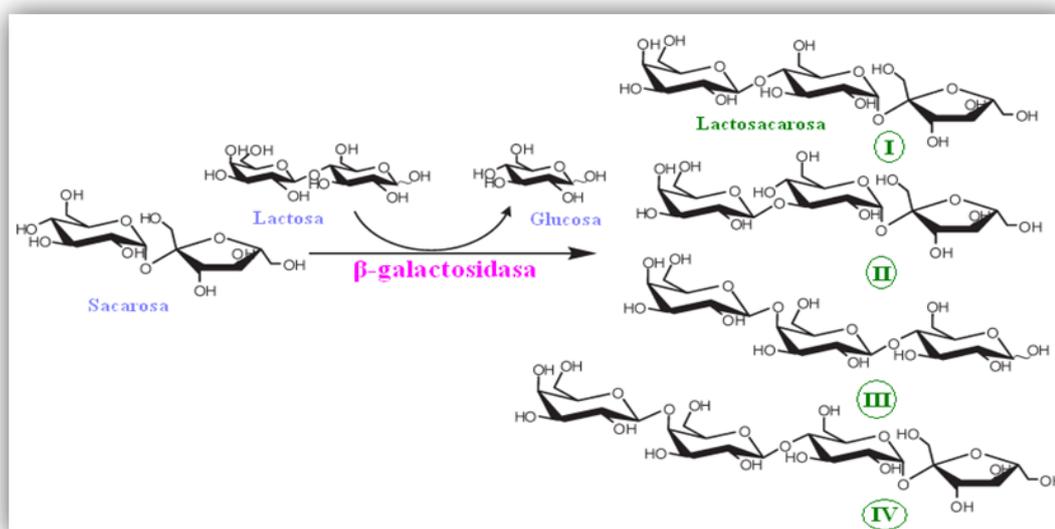


Figura I7: Síntesis de los compuestos I-IV usando β -Galactosidasas con lactosa y sacarosa como sustratos. **(I)** Lactosacarosa. β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fruf. **(II)** β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fruf. **(III)** (β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α , β -D-Glcp. **(IV)** β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fruf. El orden de formación de los compuestos es III>I>IV>II. (Li y col., 2009).

La lactosacarosa es un carbohidrato no digerible por lo que se está considerando como un posible prebiótico, de hecho hay evidencias de su actividad bifidogénica en ensayos en humanos ya que se ha comprobado la mayor formación de AGCC y la reducción del pH intestinal (Ohkusa y col., 1995). También se ha observado que reduce el contenido en amoníaco e inhibe el crecimiento de clostridios (Teramoto y col., 2006). Utilizando sistemas modelo *in vitro* de estómago e intestino delgado se ha estudiado el comportamiento de este carbohidrato durante su paso a lo largo del tracto gastrointestinal, comprobándose, que se hidrolizaba ligeramente (Playne y Crittenden, 2009).

Por otra parte, ensayos llevados a cabo con animales han mostrado los efectos protectores, que ejerce la lactosacarosa, sobre la enteropatía inducida por medicamentos (indometacina) atribuyéndose este efecto al mantenimiento de la microbiota intestinal

(Honda y col., 1999). También se ha comprobado que la lactosacarosa favorece la absorción del calcio en ratas (Kishino y col., 2006) y que el consumo a largo plazo de una dieta que contiene 5% de lactosacarosa durante 8 semanas disminuye significativamente el peso del tejido adiposo abdominal en comparación con la del grupo control (Mizote y col., 2009).

En cuanto a sus propiedades físico-químicas la lactosacarosa es más soluble en agua que la lactosa (hasta 3670 g/L a 25 °C); tiene un poder edulcorante en comparación con la sacarosa de 0,3; es estable en forma de polvo durante 1 h a pH 4,5 y 120 °C; tiene alta capacidad de retención de humedad y es muy higroscópica. Todas estas propiedades así como sus características generales relacionadas con los beneficios para la salud (no digerible, no cariogénico, bifidogénico) hacen de la lactosacarosa un valioso ingrediente para utilizarlo en la elaboración de alimentos funcionales. La dosis efectiva bifidogénica en adultos sanos es de 5 g al día, sin embargo, en cantidades superiores puede causar un aumento de la presión osmótica gastrointestinal y diarrea (Playne y Crittenden, 2009).

En Japón, en 2005, se aprobó la utilización de la lactosacarosa como un ingrediente FOSHU y se emplea como prebiótico, así como edulcorante en una gran variedad de bebidas, confitería, postres, dulces, productos de panadería y yogures (Playne y Crittenden, 2009).

3.2 Fructooligosacáridos, FOS.

El término genérico de fructooligosacáridos (FOS) hace referencia a los oligosacáridos no digeribles compuestos principalmente por fructosa. Se pueden considerar dos tipos, los oligosacáridos lineales de D-fructosa unidos por enlaces glicosídicos β -(2 \rightarrow 1) que se denominan *fructanos*, FF_n, siendo el más conocido la inulina, cuyo GP puede ser superior a 10. El segundo tipo se obtiene por la acción enzimática de las β -fructosidasas sobre la sacarosa, que rompe el enlace β -(1 \rightarrow 2), transfiriendo la fructosa a otro aceptor, así se forman los oligosacáridos más propiamente conocidos como *fructooligosacaridos*, GF_n (Borromei y col., 2010; Prata y col., 2010). Estos FOS contienen entre 2 y 9 unidades de fructosa unidas con enlaces β -(2 \rightarrow 1), con un residuo terminal α -D-glucosa. De entre ellos cabe destacar la kestosa (Glu-(Fru)₂ o GF2), nistosa (Glu-(Fru)₃ o GF3) y β -fructofuranosilnistosa (Glu-(Fru)₄ o GF4) (Kaplan y Hutkins, 2000; Van der Meulen y col., 2006), representados en la Figura I8.

El enlace β -(2 \rightarrow 1) es el responsable de que estos compuestos no sean hidrolizados en las partes altas del tracto gastrointestinal, así como de su reducido valor calórico y sus efectos semejantes a la fibra dietética (Trindade y col., 2006). Se ha descrito que la ingestión de FOS mejora las funciones gastrointestinales reduciendo el tiempo de tránsito, aumentando la motilidad de la mucosa intestinal y modulando la proliferación de células intestinales (Kolida y col., 2007).

También se ha comprobado que los FOS de alto peso molecular son fermentados más lentamente por las bacterias intestinales y, en consecuencia, más persistentes en el intestino grueso que los de peso molecular inferior (Rastall y col., 2005).

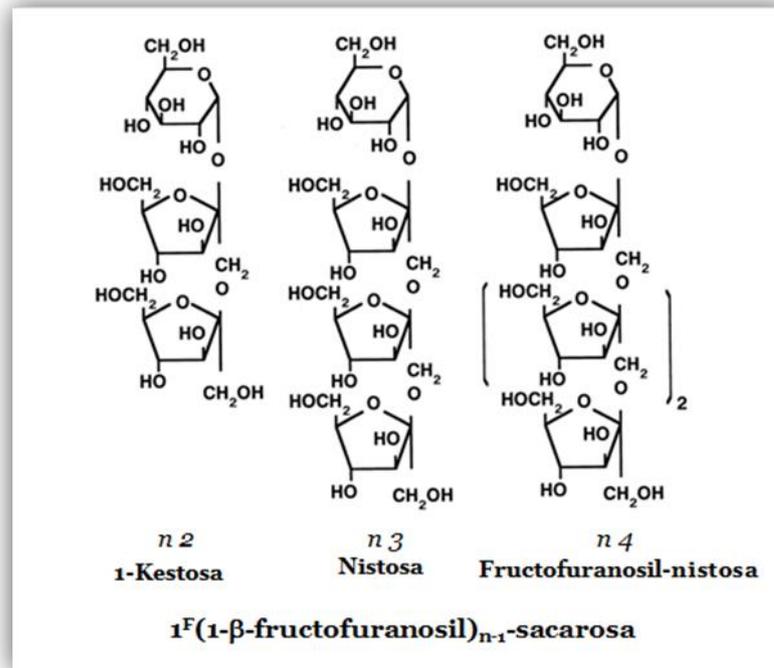


Figura 18: Estructura química de fructooligosacáridos: Kestosa, Nistosa y Fructofuranosilnistosa (Adaptado de Guio y col., 2009).

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La lactosa es un disacárido que se genera en el mundo, en cantidades muy importantes (3.3 millones de toneladas métricas/año), como un subproducto de la industria láctea, principalmente del suero de quesería. En los últimos años, este producto se ha utilizado para obtener galactooligosacáridos (GOS), que son carbohidratos prebióticos, mediante la transgalactosilación enzimática de la lactosa. Esto ha supuesto el desarrollo de diferentes procesos que permiten obtener productos de alto valor añadido, además de evitar los problemas de contaminación ambiental que se producen durante el tratamiento del suero.

Las enzimas utilizadas para obtener GOS son β -galactosidasas y pueden proceder de diferentes microorganismos (levaduras, hongos, bacterias). Estas enzimas dan lugar a mezclas de oligosacáridos con estructuras variadas que presentan diferentes enlaces glicosídicos y diferentes grados de polimerización, dependiendo, fundamentalmente, del tipo de enzima utilizada. La estructura química de los carbohidratos influye en las propiedades prebióticas; por ello la obtención de mezclas de síntesis con oligosacáridos con diferentes estructuras es muy interesante ya que pueden presentar propiedades mejoradas y/o complementarias a los carbohidratos de partida.

Por otra parte, se ha descrito la producción de nuevos oligosacáridos mediante reacciones de transglicosilación enzimática utilizando fuentes baratas y fácilmente disponibles tales como sacarosa, maltosa, celobiosa, o rafinosa, entre otros. Actualmente se utilizan enzimas para obtener nuevos oligo- y polisacáridos a partir de sacarosa ya que es uno de los carbohidratos más baratos y abundantes y con un gran potencial como materia prima para desarrollar nuevos ingredientes.

En la actualidad, el mercado global de alimentos funcionales está creciendo considerablemente representando una gran oportunidad para desarrollar productos de alto valor añadido.

Por todo ello el **objetivo** de este trabajo se centra fundamentalmente en la: **“Obtención de nuevos oligosacáridos prebióticos, derivados de lactosa y sacarosa, utilizando enzimas comerciales, que pueden presentar distintas actividades”**. Se estudiarán las condiciones de síntesis de oligosacáridos mediante la actividad β -fructosidasa y/o β -galactosidasa de los preparados comerciales seleccionados. Para alcanzar este objetivo, se desarrollará el siguiente plan de trabajo:

- 1) Determinación de la actividad hidrolítica de preparados enzimáticos frente a sacarosa, lactosa y lactulosa.
- 2) Selección de enzimas con las actividades de interés.
- 3) Estudio de la síntesis enzimática con un preparado comercial con doble actividad β -galactosidasa y β -fructosidasa.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1) REACTIVOS

Los patrones de sacarosa, lactosa, lactulosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, kestosa, rafinosa, lactosacarosa, nistosa y β -fenil-glucósido se adquirieron en Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

La β -galactosidasa procedente de *Kluyveromyces lactis* comercializada como Lactozym Pure 6500 L (Lactozym) fue regalo de Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) que, según las indicaciones de la casa comercial presenta una actividad específica de 6500 LAU/g (unidades de lactasa por gramo de enzima).

2) ENZIMAS

Se ha estudiado la capacidad hidrolítica de diferentes preparados enzimáticos comerciales frente a sacarosa, lactosa y lactulosa. En la Tabla M1 se reflejan los preparados estudiados, el microorganismo productor, la actividad enzimática declarada y la casa que las comercializa.

3) CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA

3.1 Determinación de la actividad hidrolítica de los preparados comerciales.

Se ha valorado la actividad hidrolítica de los preparados enzimáticos, sobre diferentes azúcares, determinando en primer lugar el poder reductor de las mezclas de síntesis. Para ello se ha utilizado el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, Sigma), que se basa en la reducción de éste ácido (de color amarillo), por un azúcar reductor, pasando a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Sumner y Howell, 1935), cuya presencia puede determinarse espectrofotométricamente a 560 nm.

La actividad enzimática se determinó en soluciones de sacarosa, lactosa y lactulosa preparadas a una concentración de 250 mg/mL en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de $MgCl_2$, pH 6,5 y 50 μ L/mL de cada preparado enzimático, incubadas a 50 °C durante 24 h. La toma de muestra se realizó a 0 y 24 h.

De la reacción enzimática con sacarosa se toman 20 μ L, en el caso de la lactosa y lactulosa se realiza una dilución previa 1/20 (v/v) y se toman, igualmente, 20 μ L. Se añaden 80 μ L de agua Milli Q y 100 μ L de DNS, se mantiene en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos, para que se desarrolle la reacción, y posteriormente las muestras se enfrían rápidamente, en hielo, para detener la reacción. Se añaden 750 μ L de agua y se transfieren a una placa multipocillos para la lectura a 560 nm. En todos los casos se prepara una muestra control en las mismas condiciones. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Tabla M1. Preparados enzimáticos comerciales utilizados en este estudio. Se muestra el microorganismo de procedencia, la actividad enzimática y la casa comercial.

Número	Nombre	Microorganismo productor	Actividad enzimática	Casa comercial
E-1	Dextranasa Plus L	<i>Chaetomium</i> sp.	Dextranasa	Novozymes
E-2	Pectinex Ultra SP-L	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Poligalacturonasa	Novozymes
E-3	Viscozyme L	<i>A. aculeatus</i>	Xilanasana/ Celulasa Hemicelulasa	Novozymes
E-4	Viscozyme Barley HT	<i>Aspergillus</i> sp.	Amilasa / Celulasa	Novozymes
E-5	Acrylaway L	<i>A. oryzae</i>	Asparaginasa	Novozymes
E-6	Alcalasa 2.5 L	<i>Bacillus licheniformis</i>	Proteasa alcalina	Novozymes
E-7	Alcalasa 2.4 L FG	<i>B. licheniformis</i>	Proteasa	Novozymes
E-8	α -Galactosidasa 1000 L	<i>A. niger</i>	α -Galactosidasa	Fabrazyme
E-9	Biolactasa NTL*2	<i>B. circulans</i>	β -Galactosidasa	Biocon Español S
E-10	Amilasa AG 300 L	<i>A. niger</i>	Amiloglucosidasa	Novozymes
E-11	Branchzyme	<i>B. subtilis</i>	Glucosiltransferasa	Novozymes
E-12	Celluclast 1.5 L	<i>Trichoderma reesei</i> ATC 26921	β -Glucosidasa, Xilanasana, Xilosidasa.	Novozymes
E-13	Flavourzyme 1000 L	<i>A. oryzae</i>	Aminopectidasa	Novozymes
E-14	Gluconex 200 g	<i>T. harzianum</i>	Exo- β -D-galactofuranosidasa	Sigma-Aldrich
E-15	Invertasa Novozyme IV031051	<i>Saccharomyces cerevisic</i>	Invertasa	Novozymes
E-16	Dextrozyme DX	<i>A. niger B. subtilis</i>	Glucoamilasa (glucan 1,4-glucosidasa)	Novozymes
E-17	Mannozyme CL	---	---	Novozymes
E-18	Lactozym Pure 6500 L	<i>Kluyveromyces lactis</i>	β -Galactosidasa	Novozymes
E-19	Neutrasa 0.8 L	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Proteasa (neutra)	Novozymes
E-20	Novozym 188	<i>A. niger</i>	β -Glucosidasa	Novozymes
E-21	Novozym 50070	---	---	Novozymes
E-22	Lecitase Ultra	<i>A. oryzae</i>	Fosfolipasa	Novozymes
E-23	Lecitase Novo	<i>A. oryzae</i>	Lipasa	Novozymes

Tabla M1. Continuación. Preparados enzimáticos comerciales utilizados en este estudio. Se muestra el microorganismo de procedencia, la actividad enzimática y la casa comercial.

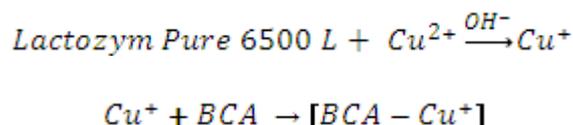
Número	Nombre	Microorganismo productor	Actividad enzimática	Casa comercial
E-24	NS-37058	---	---	Novozymes
E-25	Novozym 33102	---	---	Novozymes
E-26	NS-22013	---	Inulinasa	Novozymes
E-27	Maxilact L 2000	<i>K. lactis</i>	Lactasa	Biotec
E-28	Novoshape	<i>A. oryzae</i>	Pectinmetiltransferasa	Novozymes
E-29	Toruzyme 3.0 L	<i>B. circulans</i>	Ciclodextrin-glicosiltransferasa	Novozymes
E-30	Ultraflo L	<i>Humicola insolens</i>	Endoglucanasa/ Celulasa Xilanasa	Novozymes
E-31	Carezyme 4500 L	<i>Aspergillus</i> sp.	Celulasa	Novozymes
E-32	Proteasa	<i>Streptomyces griseus</i>	Proteasa	Merck
E-33	β -Galactosidasa de <i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i>	β -Galactosidasa	Sigma-Aldrich
E-34	Proteasa	<i>B. licheniformis</i>	Proteasa	Sigma-Aldrich
E-35	Glucyme	<i>A. oryzae</i>	Glucosaoxidasa	Novozymes
E-36	Pectinasa	<i>A. niger</i>	Pectinasa	Sigma-Aldrich
E-37	Celulasa	<i>T. viridae</i>	Celulasa	Sigma-Aldrich
E-38	Invertasa grado VII from Baker yeas	<i>S. cerevisiae</i>	Invertasa	Sigma-Aldrich
E-39	Fosfatasa ácida	---	Fosfatasa	Boehringer Mannheim
E-40	Celulasa	<i>A. niger</i>	β -Glucosidasa /Xilanasa	Sigma-Aldrich
E-41	Amiloglucosidasa	<i>A. niger</i>	Amiloglucosidasa	Sigma-Aldrich
E-42	Lactozym Pure 2600 L	<i>K. lactis</i>	β -Galactosidasa	Sigma-Aldrich
E-43	Lisozyme	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Proteasa	Sigma-Aldrich
E-44	α -Amilasa	<i>B. subtilis</i>	Amiloglucosidasa	Megazyme
E-45	Amiloglucosidasa	<i>A. niger</i> / <i>Rhizopus</i> sp.	Amiloglucosidasa	Megazyme
E-46	Proteasa	---	Proteasa	Megazyme

3.2 Determinación de la actividad invertasa del preparado enzimático Lactozym Pure 6500L.

Se ha determinado la actividad invertasa del preparado comercial Lactozym, utilizando soluciones de sacarosa (250 mg/mL) preparadas en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de MgCl₂ a pH 6,5, a 50 °C y 2 µL/mL del preparado enzimático, incubadas durante 2 h. La toma de muestra se realizó a 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 120 minutos determinándose el poder reductor, generado por los monosacáridos liberados, mediante el método del DNS. De esta forma, considerando que una unidad enzimática (Ud) se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de glucosa y de fructosa por mL y por minuto a 50 °C y pH 6,5; el preparado Lactozym expresa una actividad invertasa de 1067 Ud/mL. Los ensayos se realizaron por triplicado, siendo la desviación estándar relativa (RSD) inferior al 7%.

3.3 Determinación del contenido en proteína del preparado enzimático Lactozym Pure 6500L.

La cantidad de proteína del preparado comercial Lactozym se determinó mediante el método colorimétrico del ácido bicinconírico (BCA, BCATM Protein assay kit de Thermo Scientific, Rockford, USA). En éste método se mide la absorbancia a 560 nm del color púrpura desarrollado por éste ácido al formar un complejo con los iones Cu¹⁺ liberados en medio alcalino por las proteínas con Cu²⁺, como la β-galactosidasa, y el BCA (reacción de Biuret) (Fujimoto y col., 1985).



Para la cuantificación se ha realizado una recta de calibrado utilizando concentraciones de 0 a 2 mg/mL de BSA. El contenido de proteína en el preparado comercial Lactozym fue de 208 mg/ml. Los ensayos se realizaron por triplicado siendo la desviación estándar relativa (RSD) inferior al 7%.

La actividad específica se calculó dividiendo la actividad enzimática (1067 Ud/mL) entre el contenido en proteína. De esta manera la actividad específica del enzima resultó ser 5,1 µmol de glucosa liberada/min/mg, es decir, 5,1 Ud/mg.

3.4 Selección del preparado enzimático.

Para realizar el estudio de la actividad hidrolítica y de transglicosilación, se seleccionaron 6 de los preparados enzimáticos estudiados y se incubaron, utilizando diferentes volúmenes del preparado, como queda reflejado en la Tabla M2, con sacarosa, lactosa, lactulosa (250 mg/mL), mezclas de sacarosa-lactosa y de sacarosa-lactulosa (500 mg/mL, relación 1:1), preparadas en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de MgCl₂, a pH 6,5. La incubación de las reacciones enzimáticas se llevó a cabo en tubos eppendorf de 2 mL en un agitador orbital a 300 rpm, tomándose alícuotas de 300 µL a diferentes tiempos

(1, 5 y 24 h) y sumergiéndolas inmediatamente en agua hirviendo durante 5 minutos para inactivar la enzima. Las muestras se almacenan en congelación hasta su posterior análisis.

Tabla M2. Volúmenes ($\mu\text{L}/\text{mL}$) a añadir de los 6 preparados enzimáticos estudiados a soluciones de sacarosa, lactosa, lactulosa (250 mg/mL) y mezcla sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa (500 mg/mL, 1:1), en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de MgCl_2 a pH 6,5 y 50 °C.

	E-2 Pectinex Ultra SP-I ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	E- 4 Viscozyme Barley HT ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	E-8 α-galactosidasa 1000L ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	E-11 Branchzyme ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	E- 12 Celluclast 1.5L ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	E-18 Lactozym Pure 6500L ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
Sacarosa	10	50	10	10	10	50
Lactosa	50	50	100	100	100	10
Lactulosa	100	10	10	10	10	50
Sacarosa- Lactosa	20	20	20	20	20	20
Sacarosa- Lactulosa	20	20	20	20	20	20

3.5 Reacciones enzimáticas con Lactozym Pure 6500L.

Los ensayos de la actividad transglucosidasa de este enzima comercial se realizó incubando soluciones de sacarosa (250 mg/mL), de sacarosa-lactosa y de sacarosa-lactulosa (500 mg/mL, 1:1), en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de MgCl_2 a pH 6,5 y 50 °C durante 24 h, utilizando diferentes concentraciones de enzima, 1,1; 2,1 y 5,1 Ud/mL. La toma de muestra se realizó a las 0, 1, 3, 5, 7 y 24 h de incubación.

4) TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

4.1 Cromatografía de gases, (GC).

El análisis de los carbohidratos en las mezclas de síntesis se realizó mediante cromatografía de gases (GC). El cromatógrafo de gases utilizado, GC7890A está provisto de un detector de ionización de llama (FID) y un inyector automático 7693A (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA). La separación de los carbohidratos se llevó a cabo con una columna capilar de sílica SPB-17 (30 m \times 0.32 mm \times 0.5 μm) recubierta con 50% difenil y 50% dimetilsilicona (Supelco, Bellefonte, PA, USA). La temperatura inicial del horno fue de 180 °C subiendo hasta 290 °C a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min manteniéndose durante 30 minutos a esta temperatura para la elución de todos los carbohidratos. La temperatura del inyector y del detector fue de 280 °C y 290 °C respectivamente. La inyección de la muestra se realizó en modo split (1:30). El gas portador utilizado fue N_2 a un flujo de 1 mL/min. La adquisición y el procesado de los datos se realizó con el software Agilent ChemStation.

La baja volatilidad de los carbohidratos hace necesario realizar un pretratamiento de derivatización y en este caso se preparan los trimetilsilil derivados de las oximas de los carbohidratos. Para preparar estos derivados, previamente, se toman volúmenes comprendidos entre 10 y 20 μL de las mezclas de reacción que contienen 5 mg de carbohidratos se añaden 400 μL de patrón interno, β -fenil-glucósido (0,5 mg/mL), y se evaporan hasta sequedad en rotavapor. Para la formación de las oximas, siguiendo el método de Brobst y Lott (1996), a la muestra evaporada se le añaden 200 μL de disolución de cloruro de hidroxilamina al 2,5% en piridina, y se mantiene a 70 °C en estufa durante 30 minutos. Posteriormente, para formar los trimetilsilil derivados, se añaden 200 μL de hexametildisilazano (HMDS) y 20 μL de ácido trifluoroacético (TFA), manteniéndose a 50 °C durante 30 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugan durante 2 minutos a 10000 rpm recogiendo el sobrenadante en un vial para su posterior análisis por GC.

El análisis cuantitativo se realizó mediante el método del patrón interno calculando los factores de respuesta de los carbohidratos relativos al β -fenil-glucósido. Para ello se prepararon disoluciones de patrones de galactosa, glucosa, fructosa, lactosa y rafinosa y se realizaron mezclas a distintas concentraciones (0,05 a 2 mg/mL). La preparación de estas mezclas y el análisis por GC se realizó por duplicado.

4.2 Cromatografía de líquidos de alta eficacia, (HPLC).

4.2.1 Cromatografía de Exclusión Molecular, SEC

El análisis de los carbohidratos presentes en las mezclas de síntesis obtenidas mediante reacción enzimática con Lactozym (sección 3.5), se realizó mediante HPLC-SEC en un equipo Agilent 1200 Infinity con detector de índice de refracción (RID). La separación de los carbohidratos, de las mezclas de síntesis, se realizó en una columna termostatazada (80 °C) Sugar KS 801 (Shodex) (8.0 mm \times 300 mm), en forma de Sulfo(Na^+) y con tamaño de partícula de 6 μm . La elución de los carbohidratos se realizó con agua Milli-Q a un flujo de 1 mL/min. Previamente las muestras a analizar se diluyen con agua Milli-Q a una concentración de 10 mg/mL de azúcares y se filtran utilizando un filtro de PVDF de 0,45 μm , inyectándose posteriormente 50 μL en el cromatógrafo. Los datos se procesaron con el software Agilent ChemStation.

La cuantificación de los carbohidratos se llevó a cabo mediante el método de calibración externa. Los patrones empleados fueron glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, lactulosa y rafinosa a una concentración entre 0,01 y 2 mg/mL. En cada caso se construyó la recta de calibrado siendo los coeficientes de regresión superiores a 0,99. El contenido en carbohidratos en las mezclas de reacción se expresó en g por 100 g de carbohidratos totales.

4.2.2 Cromatografía en fase normal, NP-HPLC

Los oligosacáridos de las mezclas de síntesis (apartado 3.5) se analizaron por NP-HPLC utilizando una columna Kromasil NH_2 (250 mm \times 4,6 mm) con tamaño de partícula

5 μm (Alltech). La elución de los carbohidratos se realizó en isocrático y utilizando como fase móvil acetonitrilo:agua 75:25 (v/v) a un flujo de 1 mL/min y en un equipo Agilent 1260 Infinity. El detector utilizado fue de índice de refracción (RID). Previo al análisis, las muestras se diluyeron en una mezcla acetonitrilo:agua 60:40 (v/v) a una concentración de 10 mg/mL de azúcares y se filtraron utilizando filtros de PVDF de 0,45 μm , inyectándose posteriormente en el cromatógrafo 50 μL . Los datos se procesaron con el software Agilent ChemStation. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de calibración externa, como se indica en el apartado anterior (4.2.1.).

4.3 Espectrometría de Masas, MALDI-TOF-MS

Con objeto de conocer el grado de polimerización (GP) de los oligosacáridos presentes en las mezclas de síntesis, fracciones enriquecidas en estos se analizaron mediante Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, acoplada al detector Time-Of-Flight, (MALDI-TOF-MS).

Para eliminar mono- y disacáridos y obtener fracciones enriquecidas en oligosacáridos de alto peso molecular, las mezclas de síntesis obtenidas en la sección 3.5 (3h de incubación), se purificaron utilizando carbón activo (Darco G60 100 mesh, Sigma) según el método descrito por Morales y col., (2006). Para ello, se preparó una solución de azúcares de 5 mg/mL en etanol al 1% a la que se añaden 30 mg/mL de carbón activo y se mantiene en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se filtró a vacío a través de un filtro Millipore de 0,45 μm de poro y se realizaron varios lavados del carbón activo con agua desionizada. Los oligosacáridos, adsorbidos en el carbón se extrajeron con una mezcla etanol:agua 50% (v/v), en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente y posterior filtración a vacío. Finalmente, las muestras se evaporaron en rotavapor hasta sequedad total.

Los análisis mediante MALDI-TOF-MS se realizaron en un espectrofotómetro Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado con un láser de nitrógeno ($\lambda = 337 \text{ nm}$, 3 ns de anchura de pulso y 3 Hz de frecuencia). Los iones generados por el láser de desorción se introdujeron en un analizador de tiempo de vuelo (1,3 m de trayectoria de vuelo) con un voltaje de aceleración de 20 kV. La matriz utilizada fue ácido 2,5-dihidroxibenzoico (Fluka) (100 mg/mL en agua). Para los análisis, previamente la muestra se diluye (1:100, v/v) en agua mezclándose posteriormente con la matriz en una proporción de 1:4 (v/v). Un microlitro de esta solución se añade a una placa plana de acero inoxidable y se seca al aire antes del análisis. Los espectros de masas se obtuvieron en un rango de masas de m/z 100-1500.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LOS PREPARADOS ENZIMATICOS COMERCIALES

Se ha estudiado la actividad hidrolítica de diferentes preparados enzimáticos comerciales ya que al tratarse de extractos pueden presentar otras actividades de interés distintas a las declaradas.

Las condiciones elegidas para llevar a cabo las hidrólisis enzimáticas se seleccionaron basándose en estudios previos sobre la obtención de FOS (Sangeetha y col., 2005) y de GOS (Torres y col., 2010). Además, se han tenido en cuenta trabajos en los que se había optimizado el pH de actuación de enzimas de diferente origen. En el caso de enzimas de origen fúngico como es el preparado enzimático Pectinex Ultra SP-L obtenido de *A. aculeatus*, presentaba una buena actividad β -galactosidasa y β -fructosidasa a pH de 4,5 a 6,5 y a temperaturas entre 40 y 60 °C (Cardelle-Cobas y col. 2008a y b; Montilla y col. 2011). En preparados enzimáticos de levaduras *K. lactis* (Lactozym 3000 L HP G) la actividad β -galactosidasa a pH 5, y a 60 °C resultó ser muy baja (Martínez-Villaluenga y col., 2008a). Por otra parte también se ha considerado el trabajo de Corzo-Martinez y col., (2013) donde se observó la alta actividad β -galactosidasa de *B. circulans* utilizando permeados a pH de 5,5-7,5 y temperaturas de 40 a 60 °C. Teniendo en cuenta estos estudios, las condiciones elegidas para utilizar con una variedad tan amplia de preparados enzimáticos fueron pH de 6,5 (óptimo para un gran número de enzimas) y una temperatura de 50 °C.

Para determinar la actividad hidrolítica de los distintos preparados enzimáticos se realizaron ensayos utilizando soluciones de sacarosa, lactosa y lactulosa a una concentración de 250 mg/mL tal como queda reflejado en el apartado 3.1 (Materiales y Métodos). La actividad hidrolítica se determinó en las mezclas de síntesis mediante la medida de la absorbancia a 560 nm (con el método del DNS), que aumenta por la liberación de monosacáridos reductores procedentes de la hidrólisis de los disacáridos. Las actividades hidrolíticas se han considerado de negativas a muy positivas dependiendo del valor de absorbancias obtenidas para cada una de las soluciones utilizadas (sacarosa, lactosa y lactulosa) tal como se indica en la Tabla R1.

Los resultados obtenidos para cada uno de los preparados enzimáticos estudiados se muestran en las Tabla R2. Considerando la actividad hidrolítica frente a la sacarosa, puede observarse que de los 46 preparados enzimáticos ensayados, la actividad invertasa (β -fructosidasa) fue muy alta en 13, aunque no se trataba de la actividad principal declarada. El resto de los preparados enzimáticos no presentaron esta actividad o fue menor. En las mezclas de reacción de lactosa y lactulosa, solamente 8 (E-18, 27, 28, 33, 35, 37, 42 y 46) en el primer caso y 2 (E-18 y 42) en el segundo mostraron una actividad β -galactosidasa considerable.

Tabla R1: Criterios para clasificar la actividad hidrolítica de los preparados comerciales con soluciones de sacarosa, lactosa y lactulosa.

	Absorbancias		Valoración
	Sacarosa	Lactosa o Lactulosa	
Sin actividad.	< 0,5	< 0,2	(-)
Actividad hidrolítica media.	0,5 - 1	0,2 – 0,4	(+)
Actividad hidrolítica alta.	1 - 2	0,4 – 0,7	(++)
Actividad hidrolítica muy alta.	> 2	> 0,7	(+++)

Tabla R2: Análisis cualitativo, en base a los valores de absorbancia medidos a 560 nm, de la actividad hidrolítica de distintos preparados enzimáticos comerciales frente a sacarosa, lactosa y lactulosa (250 mg/mL) en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de MgCl₂ a pH 6,5 y 50 °C durante 24 h de reacción. Sc: sacarosa; La: lactosa; Lu: lactulosa

Código	Nombre	Actividad de la enzima frente al disacárido:		
		Sc	La	Lu
E-1	Dextranasa Plus L	(-)	(+)	(++)
E-2	Pectinex Ultra SP-L	(+++)	(++)	(++)
E-3	Viscozyme L	(++)	(+)	(+)
E-4	Viscozyme Barley HT	(++)	(++)	(++)
E-5	Acrylaway L	(+)	(+)	(++)
E-6	Alcalasa 2.5 L	(-)	(+)	(-)
E-7	Alcalasa 2.4 L FG	(+)	(+)	(++)
E-8	α-galactosidasa 1000 L	(+++)	(-)	(+)
E-9	Biolactasa NTL*2 (<i>B. circulans</i>)	(-)	(++)	(-)
E-10	Amilasa AG 300 L	(++)	(+)	(++)
E-11	Branchzyme	(+++)	(+)	(+)
E-12	Celluclast 1,5 L	(+++)	(+)	(+)
E-13	Flavourzyme 1000 L	(+++)	(+)	(++)
E-14	Gluconex 200 g	(++)	(+)	(+)
E-15	Invertasa Novozyme IV031051	(++)	(+)	(++)
E-16	Dextrozyme DX	(++)	(+)	(-)
E-17	Mannozyme	(++)	(+++)	(-)
E-18	Lactozym Pure 6500 L	(++)	(+++)	(+++)
E-19	Neutrasa 0.8 L	(-)	(+)	(+)
E-20	Novozym 188	(++)	(-)	(+)

Tabla R2: *Continuación.* Análisis cualitativo, en base a los valores de absorbancia medidos a 560 nm, de la actividad hidrolítica de diversas enzimas frente a sacarosa, lactosa y lactulosa (250 mg/mL) en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de MgCl₂ a pH 6,5 y 50 °C durante 24 h de reacción. Sc: sacarosa; La: lactosa; Lu: lactulosa

Código	Nombre	Actividad de la enzima frente al disacárido:		
		Sc	La	Lu
E-21	Novozym 50070	(++)	(+)	(++)
E-22	Lecitase Ultra	(++)	(-)	(++)
E-23	Amilasa AG 300 L	(++)	(++)	(++)
E-24	NS-37058	(++)	(-)	(++)
E-25	Novozym 33102	(++)	(+)	(++)
E-26	NS-22013 (Inulinasa)	(++)	(+)	(++)
E-27	Maxilact L 2000	(++)	(+++)	(+)
E-28	Novoshape	(+++)	(-)	(-)
E-29	Toruzyme 3.0 L	(-)	(-)	(-)
E-30	Ultraflo L	(-)	(-)	(++)
E-31	Carezyme 4500 L	(++)	(-)	(-)
E-32	Proteasa de <i>Streptomyces griseus</i>	(-)	(-)	(+)
E-33	β -galactosidasa de <i>A. oryzae</i>	(+++)	(+++)	(++)
E-34	Proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	(-)	(+)	(+)
E-35	Glucyme	(+++)	(+++)	(+)
E-36	Pectinasa de <i>Aspergillus niger</i>	(+++)	(-)	(++)
E-37	Celulasa de <i>Trichoderma viridae</i>	(+++)	(+++)	(-)
E-38	Invertasa grado VII from Baker yeast	(+++)	(+)	(-)
E-39	Fosfatasa ácida	(++)	(-)	(++)
E-40	Celulasa de <i>Aspergillus niger</i>	(++)	(+)	(-)
E-41	Amiloglucosidasa <i>A niger_10 mL</i>	(+++)	(-)	(+)
E-42	Lactozym Pure 2600 L	(++)	(+++)	(+++)
E-43	Lisozyme	(-)	(++)	(+)
E-44	α -amilasa	(-)	(-)	(+)
E-45	Amiloglucosidasa	(+++)	(+)	(++)
E-46	Proteasa	(-)	(+++)	(-)

Un resumen de la actividad hidrolítica de todos los preparados enzimáticos sobre los carbohidratos utilizados queda reflejado en la Tabla R3.

Tabla R3. Actividad hidrolítica de los preparados enzimáticos comerciales frente a sacarosa, lactosa y lactulosa considerando los valores de absorbancia obtenidos a 560 nm.

Actividad hidrolítica				
	+++	++	+	—
Sacarosa	13	20	2	11
Lactosa	8	5	20	13
Lactulosa	2	19	14	11

A la vista de los resultados obtenidos se seleccionaron los preparados enzimáticos que mostraron actividad hidrolítica hacia los disacáridos ensayados. Estos son: **E-2**, Pectinex Ultra SP-L; **E-4**, Viscozyme Barley HT; **E-8**, α -galactosidasa 1000 L; **E-11**, Branchzyme; **E-12**, Celluclast 1.5 L y **E-18**, Lactozym Pure 6500 L. Como se observa, salvo este último, el resto de las enzimas presentaban mayor actividad frente a sacarosa que frente a lactosa y lactulosa.

2) DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LOS PREPARADOS SELECCIONADOS

En este apartado, con los preparados enzimáticos seleccionados, se llevaron a cabo reacciones con sacarosa, lactosa, lactulosa y mezclas de sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa, de forma que, al poder ser distintos los carbohidratos que actúan de donantes y aceptores, se amplíe el espectro de los posibles carbohidratos obtenidos. Para llevar a cabo los reacciones enzimáticas, se prepararon soluciones individuales de sacarosa, lactosa y lactulosa (250mg/mL) o mezclas de sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa (500 mg/mL; 1:1 p/p) en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de $MgCl_2$ a pH 6,5 y 50 °C, con cantidades de enzima entre 10 y 100 μ L/mL (según la Tabla M2 de Materiales y Métodos). La toma de muestra se realizó transcurridas 1, 5 y 24 h y las muestras seleccionadas se analizaron mediante GC. Los perfiles cromatográficos de las mezclas de síntesis de los carbohidratos individuales han mostrado que con sacarosa pueden formarse trisacáridos como la kestosa; tetrasacáridos como la nistosa y otros FOS no identificados; con lactosa se forman GOS, y con la lactulosa se forman OsLu. En presencia de las mezclas de sacarosa y lactosa o lactulosa se forman otros trisacáridos, como la lactosacarosa (Figura R1).

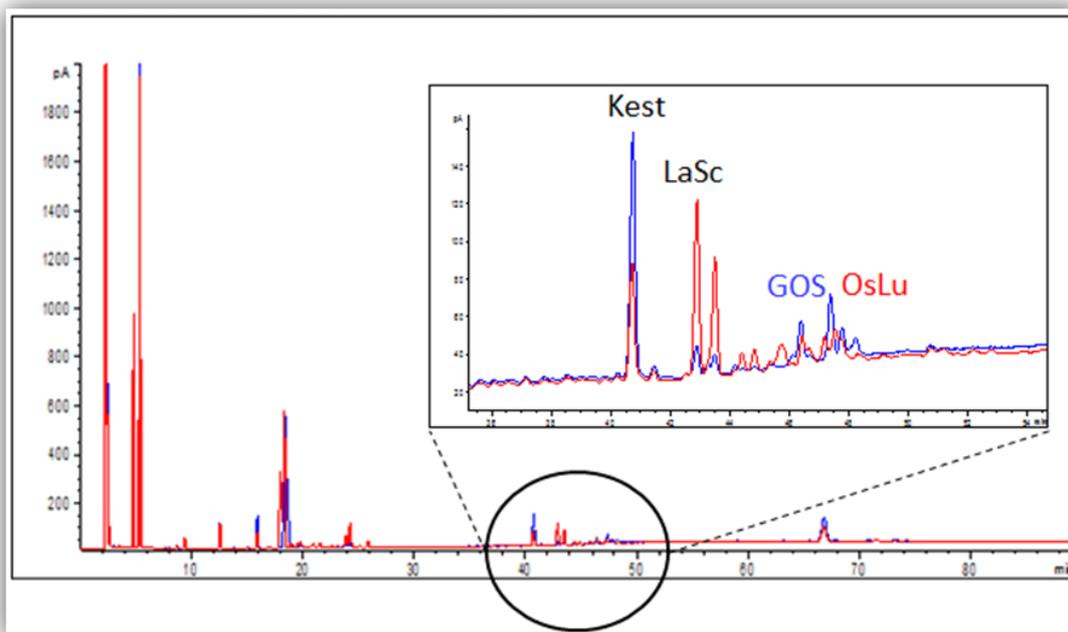


Figura R1: Perfil cromatográfico obtenido del análisis por GC de las mezclas de síntesis obtenidas de la reacción de sacarosa-lactosa (azul) y sacarosa-lactulosa (rojo) con el preparado E-2 Pectinex Ultra SP-L. Ampliación de la región donde se sitúan los trisacáridos (36-54 min). Kestosa (Kest), lactosacarosa (LaSc), galactooligosacáridos (GOS) y oligosacáridos derivados de la lactulosa (OsLu).

En la Tabla R4 se muestra el contenido en carbohidratos de las distintas mezclas de síntesis analizadas. Se han cuantificado los monosacáridos liberados (fructosa, galactosa y/o glucosa), los disacáridos que quedan sin reaccionar sacarosa, lactulosa y lactosa, y el conjunto de disacáridos, trisacáridos y tetrasacáridos formados.

Los resultados obtenidos con las distintas enzimas muestran que el preparado **E-2 (Pectinex Ultra SP-L) de *A. aculeatus***, cuya principal actividad es pectinolítica, es un ejemplo típico de preparado multienzimático. En los ensayos aquí realizados se observa que es la enzima con mayor actividad hidrolítica frente a sacarosa, esto se refleja en el hecho de que tras 1 h de reacción, casi un 80% de disacárido se ha transformado, obteniéndose el trisacárido kestosa (50,7%) y el tetrasacárido nistosa (9,0%). La formación de FOS es debida a la actividad fructosiltransferasa (Hangs y Woodams, 1995) y se pone de manifiesto al observar que en todos los casos se libera mayor cantidad de glucosa (17,5%) que fructosa (1,0%). En la bibliografía también se recoge la alta actividad fructosiltransferasa de este enzima cuando se utiliza estaquiosa como sustrato, al formarse derivados fructosilados de la estaquiosa con $GP \leq 8$, y su actividad fructosidasa, al formarse galactosil-melibiosa (Montilla y col., 2011). Este preparado enzimático también presenta una importante actividad β -galactosidasa frente a lactosa y lactulosa, formándose derivados galactosilados de ambos azúcares. Esta actividad ha sido estudiada en profundidad, caracterizados los oligosacáridos y optimizadas las condiciones de reacción por Cardelle-Cobas y col. (2008a y b).

Tabla R 4: Contenido en carbohidratos de las mezclas de síntesis de sacarosa (Sc), lactosa (La) y lactulosa (Lu) (250 mg/mL), sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa (500 mg/mL; 1:1), en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de MgCl₂, a 50 °C y pH 6,5; durante 1, 5 o 24 h de reacción utilizando E-2 (Pectinex Ultra SP-L); E-4 (Viscozyme Barley HT) y E-8 (α -galactosidasa 1000L). Los datos son expresados en porcentaje sobre el total de carbohidratos encontrados.

Enzima	Sustrato	Carbohidratos en la mezcla de síntesis (mg/mL)	Tiempo de incubación (h)	Cantidad de enzima (μ L/mL)	% Monosacáridos (Glucosa, galactosa y fructosa)	% Disacáridos			% Os* formados
						Sc	Lu	La	
E-2	Sacarosa	250	1	10	18,5	21,2	-	-	60,3
	Lactosa	250	5	50	19,6	-	-	60,3	20,1
Pectinex Ultra SP-L	Lactulosa	250	5	50	47,0	-	33,8	-	19,2
	Sacarosa-Lactosa	500	24	20	33,0	3,7	-	26,9	36,4
	Sacarosa-Lactulosa	500	24	20	37,6	1,6	26,9	-	33,9
E-4	Sacarosa	250	5	50	77,0	2,2	-	-	20,8
	Lactosa	250	24	50	11,5	-	-	75,9	12,6
	Lactulosa	250	24	50	9,9	-	80,5	-	9,6
	Sacarosa-Lactosa	500	24	20	50,5	2,5	-	35,6	11,4
	Sacarosa-Lactulosa	500	24	20	13,4	14,2	48,8	-	23,6
E-8 α -galactosidasa 1000L	Sacarosa	250	24	10	23,0	28,7	-	-	48,3
	Lactulosa	250	24	100	0,6	-	99,4	-	0,0
	Sacarosa-Lactosa	500	24	20	16,9	11,8	-	42	29,3
	Sacarosa-Lactulosa	500	24	20	47,6	0,5	44,9	-	7,0

*Os: Oligosacáridos de nueva formación, tri- y tetrasacáridos (FOS, GOS y otros OS no identificados).

Tabla R 4: Continuación. Contenido en carbohidratos de las mezclas de síntesis: sacarosa (Sc), lactosa (La) y lactulosa (Lu) (250 mg/mL), sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa (500 mg/mL; 1:1), en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de MgCl₂, a 50 °C y pH 6,5; durante 1, 5 o 24 h de reacción utilizando E-11 (Branchzyme); E-12 (Celluclast 1.5 L) ; E-18 (Lactozym pure 6500 L). Los datos son expresados en porcentaje sobre el total de carbohidratos encontrados.

Enzima	Sustrato	Carbohidratos en la mezcla de síntesis (mg/mL)	Tiempo de incubación (h)	Cantidad de enzima (µL/mL)	% Monosacáridos (Glucosa, galactosa y fructosa)	% Disacáridos			% Os* Formados
						Sc	Lu	La	
E-11 Branchzyme	Sacarosa	250	24	10	13,4	48,3	-	-	38,3
	Lactosa	250	24	100	0,1	-	-	97,9	2,0
	Lactulosa	250	24	100	0,5	-	99,3	-	0,2
	Sacarosa-Lactosa	500	24	20	2,0	42,9	-	49,9	5,2
	Sacarosa-Lactulosa	500	24	20	3,8	43,8	49,6	-	2,8
E-12 Celluclast 1.5 L	Sacarosa	250	24	10	3,7	96,3	-	-	-
	Lactosa	250	24	100	0,1	-	-	96,8	3,1
	Lactulosa	250	24	100	0,5	-	99,3	-	0,2
	Sacarosa-Lactosa	500	24	20	2,7	40,5	-	49,8	7,0
	Sacarosa-Lactulosa	500	24	20	4,5	43,3	48,6	-	3,6
E-18 Lactozym Pure 6500L	Sacarosa	250	1	50	94,8	0,5	-	-	4,7
	Lactosa	250	1	10	55,3	-	-	4,5	40,2
	Lactulosa	250	1	10	97,1	-	0,9	-	2,0
	Sacarosa-Lactosa	500	1	20	80,8	4,4	-	1,1	13,7
	Sacarosa-Lactulosa	500	1	20	42,8	26,9	12,9	-	17,4

*Os: Oligosacáridos de nueva formación, tri- y tetrasacáridos (FOS, GOS y otros OS no identificados).

Por otra parte, cuando se utiliza conjuntamente la sacarosa y la lactosa o lactulosa se puede observar en el perfil cromatográfico mostrado en la Figura R1, que se forma una amplia variedad de trisacáridos, entre los que se pueden identificar FOS (kestosa), GOS y OsLu, y trisacáridos derivados de ambos disacáridos entre los que se puede identificar la lactosacarosa, presente en ambas mezclas de reacción. Este hecho puede indicar que el trisacárido se forma por la actividad β -galactosidasa del preparado enzimático. De forma análoga a lo que ocurre con Pectinex Ultra Sp-L, Li y col. (2009) observaron la formación de lactosacarosa y otro homólogo, como resultado de la actividad β -galactosidasa de *B. circulans* en presencia de sacarosa y lactosa.

El preparado enzimático **E-4 (Viscozyme Barley HT) de *Aspergillus sp*** tiene dos actividades principales amilasa y celulasa. En los ensayos aquí realizados se observa una elevada actividad β -fructosidasa, produciendo la hidrólisis de la sacarosa y la formación moderada de kestosa y nistosa. Por otra parte, presenta también actividad β -galactosidasa y, aunque muy reducida, tiene una elevada capacidad de transferir galactosa, como se pudo observar por la baja concentración de galactosa encontrada (0,8% de galactosa y 10,7% de glucosa en la reacción con lactosa y 2,5% de galactosa y 7,4% de fructosa en la reacción con lactulosa) y de GOS (10,7%) y OsLu (9,5%) formados. Como se observa, esta actividad es menor frente a lactulosa que frente a lactosa, quedando sin reaccionar 80,5 y 75,9% respectivamente, transcurridas 24 h de reacción. Este enzima se ha utilizado para hidrolizar almidón (Bressler, 2009), pero dados los resultados aquí obtenidos podría ser objeto de un estudio más amplio para optimizar las condiciones de transgalactosilación.

El preparado **E-8 (α -galactosidasa 1000L)**, obtenido de *A. niger*, y el **E-11 (Branchzyme)**, una glicosiltransferasa ramificante obtenida de *Rhodothermus obamensis* y expresada en *B. subtilis*, presentan un comportamiento muy parecido. Frente a sacarosa tienen una buena actividad fructosidasa y fructosiltransferasa, aunque con una cinética de hidrólisis más lenta que el E-2 (Pectinex-Ultra SP-L), necesitando más tiempo (24 h) para que reaccione el 70% y el 50% de sacarosa con los preparados E-8 y E-11, respectivamente, mientras que se forma con el primero un 40,3% de kestosa y 4,5% de nistosa y con el segundo 36,3% de kestosa y 2,0% de nistosa. Estas enzimas apenas presentan actividad frente a lactosa y lactulosa.

En la bibliografía hay diversos trabajos en los que se ha utilizado el enzima α -galactosidasa (Novozyme) para aumentar la digestibilidad de semillas de altramuces (*Lupinus albus*) (Brenes y col., 1993) y, por su actividad invertasa, para obtener melibiosa y galactosil-melibiosa a partir de la rafinosa y estaquiosa, respectivamente, liberando fructosa (Slominski, 1994).

El preparado comercial **E-12 (Celluclast 1.5L)** presenta diferentes actividades, β -glucosidasa, xilanasa y β -xilosidasa, y se obtiene del hongo *Trichoderma reesei* ATCC 26921. Es el preparado que presenta una menor capacidad hidrolítica, ya que a las 24 h de reacción se ha cuantificado más del 96% de disacáridos sin reaccionar. El resultado contradictorio obtenido al medir el poder reductor generado por la sacarosa con este enzima, puede deberse a que se utilizó poca cantidad de enzima. Esto se ve confirmado

por el hecho de que en las mezclas de sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa mejoran su actividad hidrolítica frente a sacarosa, pero la reacción de transglucosilación es mínima.

El preparado **E-18 (Lactozym Pure 6500L)** es una de las β -galactosidasas más utilizadas en la industria láctea como ya se ha indicado anteriormente. Presenta una excelente capacidad hidrolítica y de transgalactosilación con lactosa y lactulosa, ampliamente estudiada (Martínez-Villaluenga y col., 2008a y b y Cardelle-Cobas y col., 2008a y b), y también presenta actividad fructosiltransferasa frente a sacarosa. En las condiciones estudiadas con los distintos azúcares, el proceso de hidrólisis es demasiado rápido, de tal modo que después de 1 h de incubación, ha reaccionado el 95% de los disacáridos, liberando monosacáridos y formando nuevos di- y trisacáridos. Es relevante también indicar que con este enzima se forman trisacáridos como kestosa y lactosacarosa, entre otros derivados, de sacarosa y lactosa o lactulosa.

A la vista de los resultados obtenidos, el preparado E-18 (Lactozym Pure 6500L) fue el seleccionado para los ensayos posteriores con objeto de sintetizar mezclas más complejas de oligosacáridos bioactivos utilizando sacarosa con lactosa o lactulosa. Hasta el momento no existen trabajos en los que se haya estudiado la formación de kestosa y lactosacarosa con preparados enzimáticos de *K. lactis*. Smrticova y col. (2011) describen la obtención de melibiosa a partir de la hidrólisis de rafinosa con Lactozym 3000L y la formación de alquil β -D-fructofuranósidos a partir de la sacarosa con etanol, propanol o butanol.

3) OBTENCION DE OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE SACAROSA Y LACTOSA UTILIZANDO EL PREPARADO LACTOZYM PURE 6500L.

3.1 Obtención de oligosacáridos utilizando sacarosa.

El primer estudio se centró en la obtención de oligosacáridos derivados de la sacarosa. Teniendo en cuenta las condiciones optimizadas por otros investigadores para la obtención de GOS utilizando la β -galactosidasa de *K. lactis* Lactozym 3000 L (Martínez-Villaluenga y col., 2008a; Montilla y col., 2012), se decidió estudiar la influencia de diferentes concentraciones del enzima (1,1; 2,1 y 5,1 Ud/mL) sobre la actividad β -fructosidasa del preparado. Las condiciones de síntesis con sacarosa fueron las siguientes, 250 mg/mL disacárido, en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de $MgCl_2$ a pH 6,5 y 50 °C. En la Figura R2 se observan los resultados obtenidos.

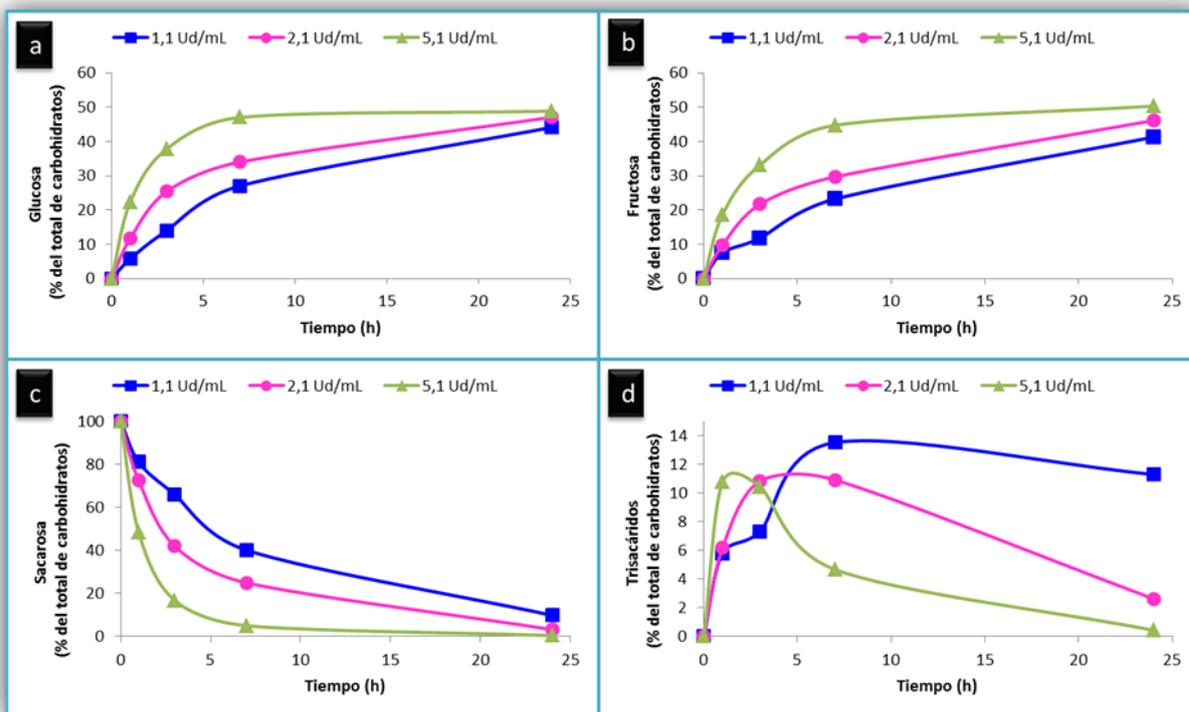


Figura R2: Efecto de la concentración de enzima (1,1; 2,1 y 5,1 Ud/mL) en la liberación de monosacáridos (a y b); y formación de trisacáridos (d), durante la hidrólisis enzimática de sacarosa (250 mg/mL) (c) con el preparado enzimático E-18 Lactozym Pure 6500L de *K. lactis*, en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de $MgCl_2$ a pH 6,5 a 50 °C.

Como puede observarse, cuando aumenta la cantidad de enzima utilizada en las reacciones, aumenta la hidrólisis de la sacarosa, siendo ésta mayor cuando se usan 5,1 Ud/mL y, por lo tanto, se produce un aumento en el contenido de monosacáridos libres, glucosa y fructosa, alcanzando un plató a las 7 h. A las 24 h la concentración de glucosa es prácticamente igual en las 3 mezclas de reacción, no ocurriendo lo mismo en el caso de la fructosa; esto podría indicar que cuando se utiliza una menor concentración de enzima se forma una mayor cantidad de oligosacáridos con fructosa que no son posteriormente hidrolizados.

La formación de los trisacáridos fue muy rápida con la mayor concentración de enzima utilizada (5,1 Ud/mL) obteniendo un rendimiento de un 11% al cabo de una 1 h de reacción. Sin embargo los trisacáridos formados se van hidrolizando y a las 7 h el contenido se reduce a la mitad (4,7%). Con la menor concentración de enzima ensayada se obtiene el máximo rendimiento a las 7 h de reacción (14%) quedando un 60% de sacarosa sin reaccionar. Por otro lado, en estas condiciones los trisacáridos formados son más estables quedando al final del período de incubación estudiado (24h), un 11% de trisacáridos y sólo un 10% de sacarosa sin reaccionar.

Los resultados anteriores ponen de manifiesto que, aunque la capacidad de Lactozym Pure 6500 L de formar FOS es baja, comparada con la que presenta el preparado Pectinex Ultra SP-L, si se podría utilizar en mezclas de sacarosa con lactosa o lactulosa de tal forma que se obtuvieran mezclas de oligosacáridos (GOS y FOS o

OsLu y FOS) con estructuras variadas (distintos enlaces glicosídicos y composición monomérica) y por lo tanto con propiedades prebióticas potencialmente mejoradas o complementarias.

3.2 Obtención de oligosacáridos derivados de sacarosa y lactosa o lactulosa

3.2.1 Estudio de la composición de las mezclas de síntesis

En este apartado se estudiará la formación de oligosacáridos utilizando el preparado enzimático Lactozym Pure 6500 L y soluciones de sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa. Para ello, se llevaron a cabo reacciones enzimáticas utilizando 2,1 Ud/mL de Lactozym con sacarosa (250 mg/mL), sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa (500 mg/mL (1:1)) en las mismas condiciones del apartado anterior.

La evolución de la reacción enzimática, inicialmente, se siguió por HPLC-SEC utilizando una columna Sugar KS 801 (Shodex) y detector de índice de refracción. El cromatograma obtenido se recoge en la Figura R3. Este método es simple y rápido permitiendo detectar la formación de nuevos oligosacáridos en las mezclas de reacción. Pueden observarse los disacáridos sin reaccionar, los monosacáridos liberados durante la hidrólisis y los nuevos oligosacáridos formados que, por comparación con los tiempos de retención de patrones, se pudieron asignar a trisacáridos.

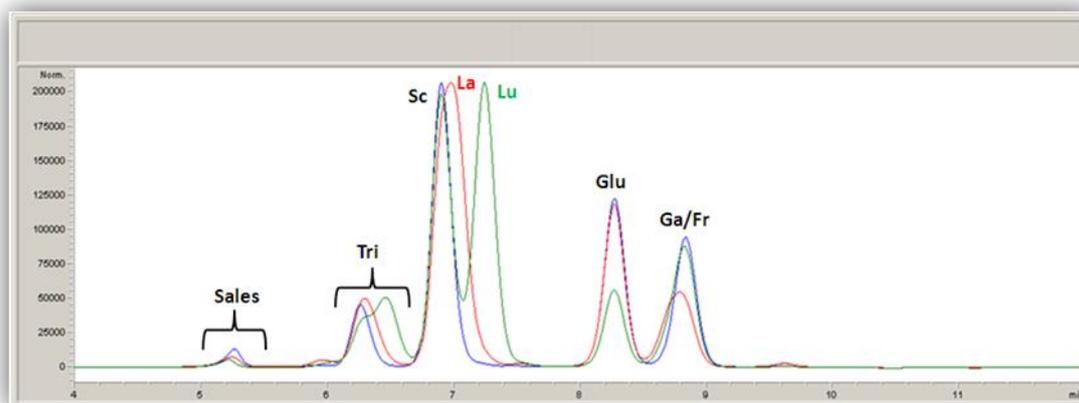


Figura R3: Perfil cromatográfico obtenido del análisis por HPLC-SEC de las mezclas de síntesis resultantes de la hidrólisis enzimática, durante 3 h, de sacarosa (azul) y de soluciones de sacarosa-lactosa (rojo) y sacarosa-lactulosa (verde) con Lactozym Pure 6500 L. Tri: trisacáridos; Sc: sacarosa; La: lactosa; Lu: lactulosa; Glu: glucosa; Ga: galactosa; Fr:fructosa.

Con objeto de identificar los nuevos trisacáridos formados por transglicosilación, las mezclas de síntesis de sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa, obtenidas a las 3 y 24 h de reacción, se analizaron por GC, en la Figura R4 puede observarse un cromatograma. El análisis cualitativo, utilizando patrones comerciales, puso de manifiesto, en todas las mezclas de síntesis, la presencia de un trisacárido con el mismo tiempo de retención que la kestosa, y de lactosacarosa en las mezclas de sacarosa con lactosa o lactulosa. Además en estas mezclas se pudieron identificar, por comparación de tiempos de retención con los patrones sintetizados en nuestro laboratorio, los siguientes trisacáridos, 6' galactosil-lactosa, como oligosacárido mayoritario formado a partir de la

lactosa, y 2 trisacáridos, el 1-galactosil-lactulosa y el 6'galactosil-lactulosa, obtenidos en las mezclas con lactulosa (Martínez-Villaluenga y col., 2008a y b).

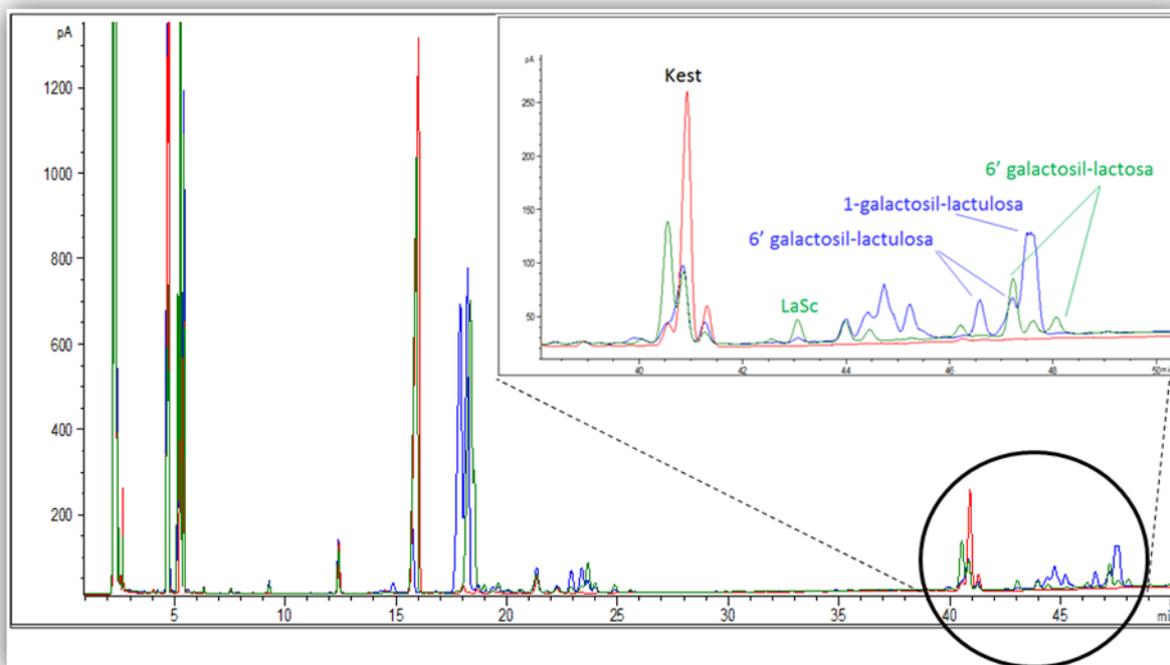


Figura R4: Perfil obtenido del análisis por GC de diferentes mezclas de síntesis de sacarosa (rojo), sacarosa-lactosa (verde) y sacarosa-lactulosa (azul). Se muestra la zona de los trisacáridos ampliada. Kest: kestosa; LaSc: lactosacarosa;

Con objeto de conocer el grado de polimerización (GP) de los oligosacáridos formados las mezclas de síntesis de sacarosa, sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa, las fracciones enriquecidas en oligosacáridos de mayor peso molecular se analizaron por MALDI-TOF-MS. La Figura R5 muestra el espectro de masas de la mezcla de síntesis de sacarosa-lactosa observándose la presencia de oligosacáridos de un GP de hasta 5 (m/z 851,3). Se han obtenido espectros similares del análisis de las otras mezclas de síntesis, siendo la intensidad de las bandas algo menor en el caso de la sacarosa.

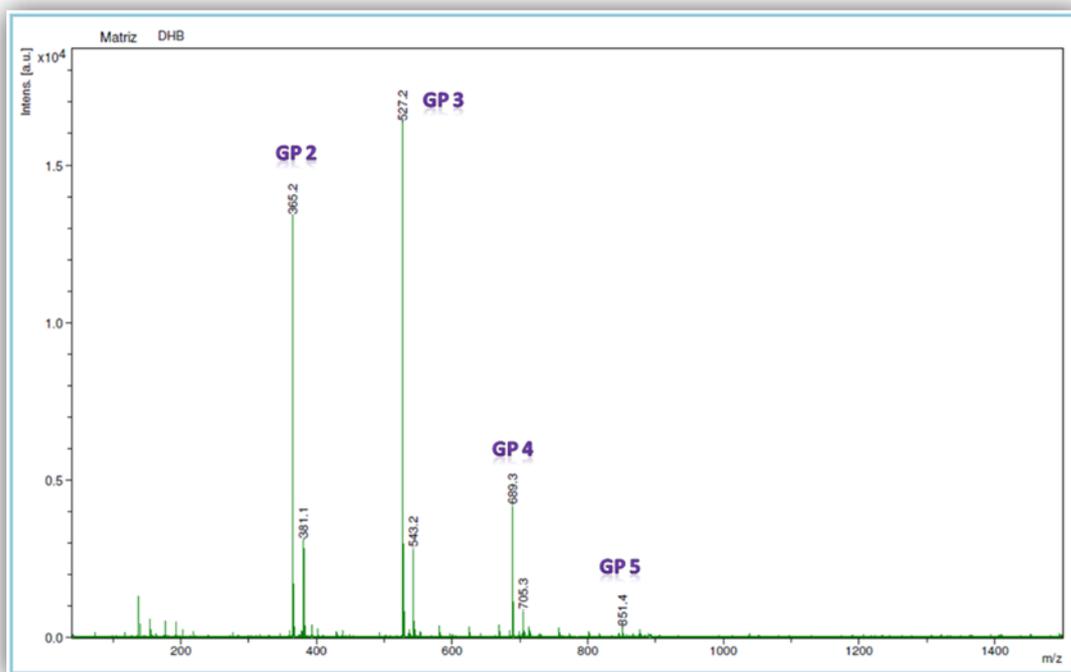


Figura R5: Espectro de masas obtenido por MALDI-TOF-MS de la fracción enriquecida en los oligosacáridos formados durante la hidrólisis enzimática de mezclas de sacarosa-lactosa con Lactozym Pure 6500 L. (GP, Grado de polimerización).

Los picos identificados como mayoritarios correspondían a los aduptos del ion Na^+ de los disacáridos (m/z 365,2), trisacáridos (m/z 527,2), tetrasacáridos (m/z 689,3), además del mencionado pentasacárido. También aparecían los aduptos del ion potasio, K^+ de di- y trisacáridos (Tabla R5).

Tabla R5: Asignación de la composición iónica obtenida por MALDI-TOF-MS de las muestras enriquecidas en oligosacáridos formados en las reacciones de transglucosilación enzimática de sacarosa, sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa con Lactozym.

GP	m/z	Tipo
2	356,2	$[\text{M}+\text{Na}]^+$
2	381,1	$[\text{M}+\text{K}]^+$
3	527,2	$[\text{M}+\text{Na}]^+$
3	543,2	$[\text{M}+\text{K}]^+$
4	689,3	$[\text{M}+\text{Na}]^+$
5	851,3	$[\text{M}+\text{Na}]^+$

3.2.2 Cuantificación de los oligosacáridos formados

La cuantificación de los oligosacáridos formados, en las mezclas de reacción, se realizó por HPLC y detector de índice de refracción utilizando una columna de fase normal Kromasil-NH₂, en la Figura R6 quedan reflejados los cromatogramas obtenidos. Puede observarse, como ya se mencionó anteriormente, que además de los monosacáridos liberados por la hidrólisis de los disacáridos y los disacáridos que quedan sin reaccionar se detecta la formación de nuevos disacáridos, kestosa y otros trisacáridos sin identificar.

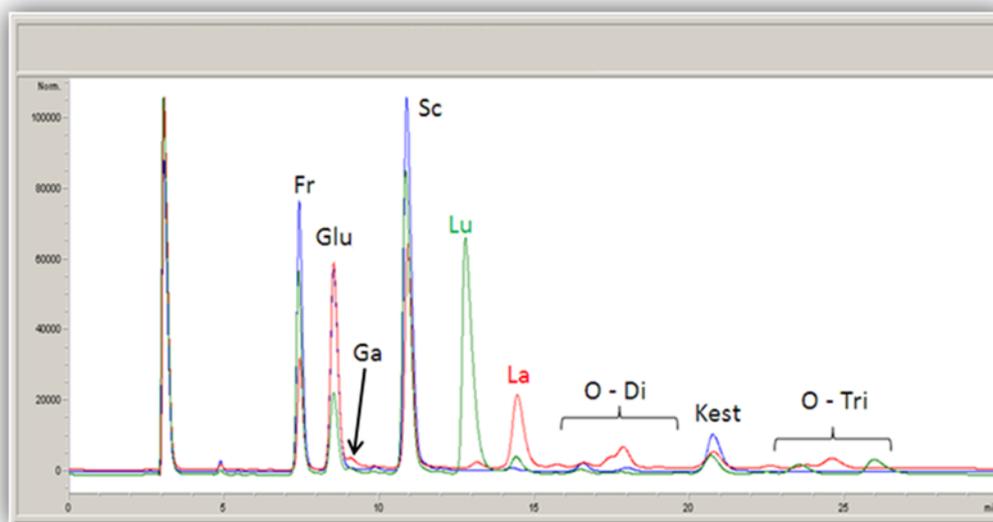


Figura R6: Perfil cromatográfico obtenido del análisis por HPLC (Kromasil-NH₂) de las reacciones enzimáticas obtenidas a las 3 h con Lactozym Pure 6500 L y sacarosa (azul), sacarosa-lactosa (rojo) y sacarosa-lactulosa (verde). Fr: fructosa; Glu: glucosa; Ga: galactosa; Sc: sacarosa; Lu: lactulosa; La: lactosa; O-Di: otros disacáridos formados; Kest: kestosa; O-Tri: otros trisacáridos formados.

El contenido encontrado de cada uno de estos carbohidratos expresado en porcentaje respecto a los carbohidratos totales, se muestra en la Figura R7. Como puede observarse, las hidrólisis enzimáticas avanzan de forma progresiva tal como se refleja en la Figura R7c. Esta figura recoge la hidrólisis de la sacarosa cuando se utiliza individualmente y en las mezclas con lactosa y lactulosa; así como el descenso de la lactosa y la lactulosa. Se puede observar que en la mezcla sacarosa-lactosa la hidrólisis de esta última se produce rápidamente en la primera hora de reacción, a partir de las 3 h es la sacarosa la que se hidroliza en mayor medida, llegando prácticamente a desaparecer a las 24 h (< 2%). Por otra parte, en la reacción sacarosa-lactulosa, observamos cómo después de 3 h la hidrólisis de la lactulosa se detiene. En ese punto la concentración de fructosa es del 18% y puede ser suficiente para inhibir la actividad β -galactosidasa coincidiendo con los resultados obtenidos por Cardelle Cobas y col. (2011a). Aunque este efecto también se observa en el contenido en lactosa (mezclas sacarosa-lactosa), es especialmente importante cuando se trata de mezclas con lactulosa, como lo demuestra los niveles de disacáridos que quedan sin reaccionar (28,4%) al cabo de 24 h, siendo del 10,7% en las mezclas con lactosa. Este hecho podría indicar que la

fructosa puede inhibir en mayor medida la actividad de la enzima que la glucosa. Por el contrario la presencia de los monosacáridos no parece afectar a la actividad β -fructosidasa, ya que, como se ha dicho, en todas las reacciones la sacarosa acaba por reaccionar en su práctica totalidad.

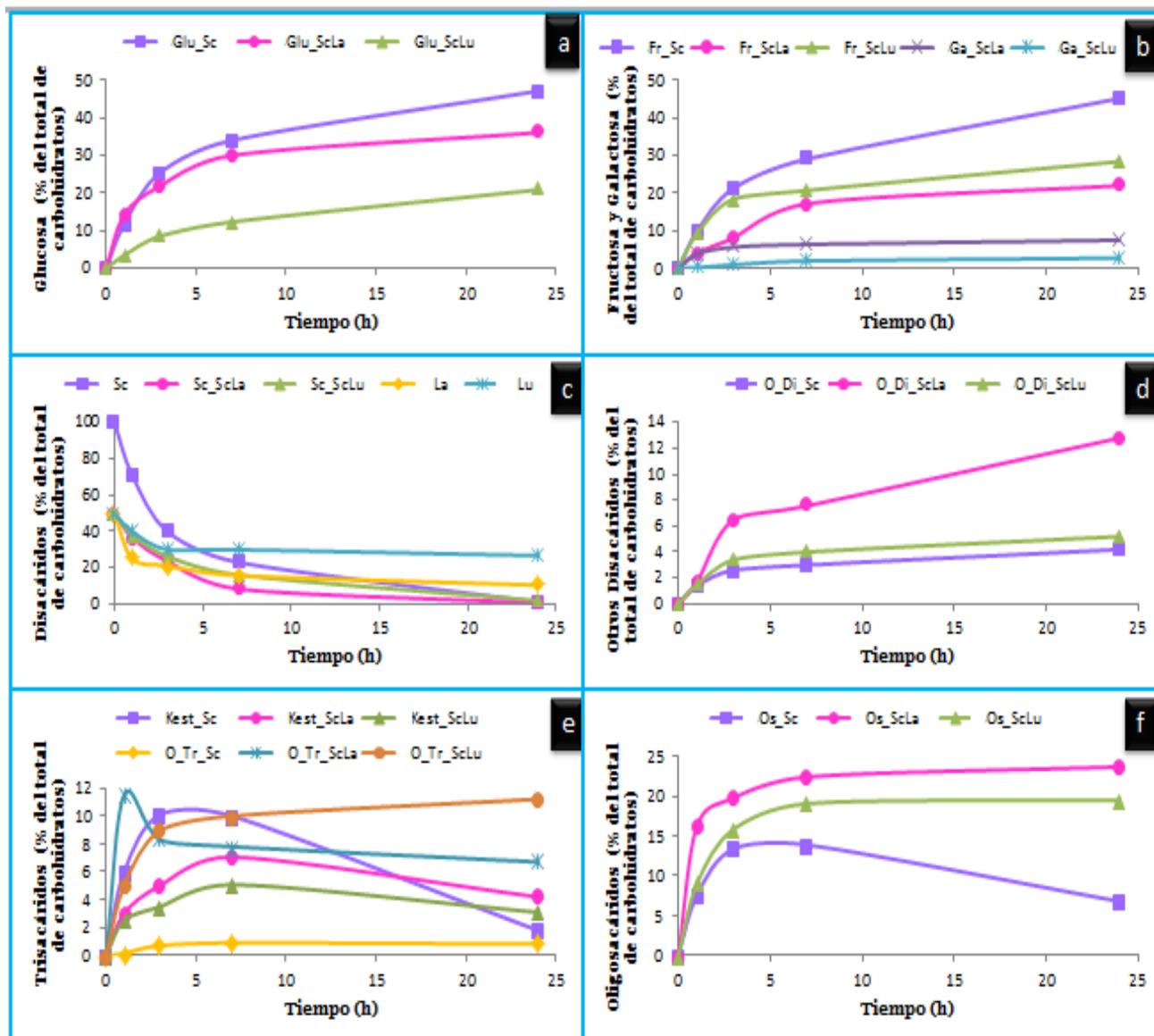


Figura R7: Formación de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de sacarosa (Sc) (250 mg/mL) y mezclas de sacarosa-lactosa (ScLa) o sacarosa-lactulosa (ScLu) (500 mg/mL) con el preparado enzimático E-18 Lactozym Pure 6500L de *K. lactis* (2,1 Ud/mL), en tampón fosfato sódico 0,05 M y 0,001 M de $MgCl_2$ a pH 6,5 y 50 °C. a) glucosa liberada; b) fructosa y galactosa liberadas; c) disacáridos de partida; d) disacáridos formados; e) trisacáridos formados; f) oligosacáridos totales formados. Fr: fructosa; Glu: glucosa; Ga: galactosa; Sc: sacarosa; Lu: lactulosa; La: lactosa; O-Di: otros disacáridos; Kest: kestosa; O-Tr: otros trisacáridos.

En cuanto a la reacción de transglucosilación (Figura R7 d) en las mezclas de síntesis con sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa se forman mayor cantidad de oligosacáridos que con sacarosa sola, siendo los contenidos a las 7 h de 22,4; 19,1 y 13,9%, respectivamente. También se puede observar que los trisacáridos en las reacciones con sacarosa-lactosa y sacarosa-lactulosa son más estables a la hidrólisis,

debido, probablemente, a la inhibición de la actividad β -galactosidasa del preparado Lactozym Pure 6500L

Los resultados obtenidos son muy interesantes ya que ponen de manifiesto que el preparado comercial Lactozym Pure 6500L forma mezclas de oligosacáridos con estructuras variadas, FOS, GOS, OsLu y otros oligosacáridos (no identificados), pudiendo esto ampliar el espectro de propiedades bioactivas, confiriéndole a estas mezclas un valor añadido. Distintos estudios han demostrado que el tipo de enlace glicosídico, la composición en monosacáridos y el GP contribuye a la selectividad de la fermentación por parte de las bacterias beneficiosas (Rowland y Tanaka, 1993; Sanz y col., 2005). También se ha observado el efecto beneficioso, en niños alimentados con fórmulas infantiles adicionadas de una mezcla de GOS y FOS (9:1), sobre la dermatitis atópica (Moro y col., 2006; Gruber y col., 2010) y la estimulación del sistema inmunológico (Van Vlies y col., 2012).

V. CONCLUSIONES

- 1) Se ha detectado la formación de oligosacáridos derivados de la sacarosa, lactosa y lactulosa en todas las mezclas de síntesis utilizando los 6 preparados enzimáticos comerciales seleccionados de los 46 ensayados.
- 2) De los 6 preparados enzimáticos comerciales, el E-2 (Pectinex-Ultra SP-L), fue el que hidrolizó la sacarosa más rápidamente (1 h de incubación) obteniéndose un rendimiento en oligosacáridos del 60%. Cuando se trata de mezclas de sacarosa-lactosa y de sacarosa-lactulosa el rendimiento en oligosacáridos fue de 36 y 34% respectivamente a las 24 h de reacción.
- 3) Por primera vez, se han obtenido conjuntamente FOS y GOS en mezclas de sacarosa-lactosa y de FOS y OsLu en mezclas de sacarosa-lactulosa utilizando el preparado Lactozym Pure 6500 L.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aronson, M. (1952)** Transgalactosidation during lactose hydrolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 39: 370-378.
- Ashwell, M. (2005)** Conceptos sobre Alimentos Funcionales. *ILSI Europe Concise Monograph Series, ILSI Press*.
- Avigad, G. (1957)** Enzymatic synthesis and characterization of a new trisaccharide, α -lactosyl- β -fructofuranoside. *Journal of Biology and Chemistry*, 229: 121-129.
- Bode, L. (2009)** Human milk oligosaccharides: Prebiotics and beyond. *Nutrition Reviews*, 67: S183–S191.
- Borromei, C., Cavazza, A., Corradini, C., Vatteroni, C., Bazzini, A. & Ferrari, R. (2010)** Validated HPAEC-PAD method for prebiotic determination in symbiotic fermented milks during shelf life. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397: 127-35.
- Brenes, R., Marquardt, R., Guenfer, W. & Roiter, B. A. (1993)** Effect of enzyme supplementation on the nutritional value of raw, autoclaved and dehulled lupina (*lupinus sibus*) in chicken diets. *Poultry Science*, 72: 2281-2293.
- Bressler, D. (2009)** Patente: Isolation and characterization of distiller grains derived from starch hydrolysis of agricultural products. *World Intellectual Property Organization*.
- Brobst, K. M. & Lott, C.E. (1996)** Determination of some component in corn syrup by gas liquid chromatography of the trimethylsilyl derivatives. *Cereal Chemistry*, 43: 35-39.
- Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Martínez-Villaluena, C., Olano, A. & Villamiel, M. (2011a)** Effect of reaction conditions on lactulose-derived trisaccharides obtained by transgalactosylation with β -galactosidase of *Kluyveromyces lactis*. *European Research and Technology*, 233: 89-94.
- Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., Peláez, C., Requena, T. & Ávila, M. (2011b)** Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. *International Journal of Food Microbiology*, 149: 81–87.
- Cardelle-Cobas, A., Fernández, M., Salazar, N., Martínez-Villaluenga, C., Villamiel, M., Ruas-Madiedo, P. & De los Reyes-Gavilá, C. (2009)** Bifidogenic effect and stimulation of short chain fatty acid production in human faecal slurry cultures by oligosaccharides derived from lactose and lactulose. *Journal Dairy Research*, 76: 317-325.
- Cardelle-Cobas, A., Martínez-Villaluenga, M., Villamiel, M., Olano, A. & Corzo, N. (2008a)** Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and Pectinex Ultra SP-L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 3328-3333.
- Cardelle-Cobas, A., Olano, A., Corzo, N., Villamiel, M., Collins, M., Kolida, S. & Rastall, R. A. (2012)** In vitro fermentation of lactulose-derived oligosaccharides by mixed fecal microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 2024-2032.

- Cardelle-Cobas, A., Villamiel, M., Olano, A. & Corzo, N. (2008b)** Study of galacto-oligosaccharide formation from lactose using Pectinex Ultra SP-L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88, 954-961.
- Choi, H. J., Kim, C. S., Kim, P., Jung, H. C. & Oh, D. K. (2004)** Lactosucrose by whole cells of *Paenibacillus polymyxa* harboring levansucrase activity. *Biotechnology Progress*, 20: 1876-1879.
- Corzo-Martínez, M., Copoví, P., Olano, A., Moreno, F. J. & Montilla, A. (2013)** Synthesis of prebiotic carbohydrates derived from cheese whey permeate by a combined process of isomerisation and transgalactosylation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93: 1591–1597. .
- Del Val, M. I., Hill, C. G., Jiménez-Barbero, J. & Otero, C. (2001)** Selective enzymatic synthesis of 6'-galactosyl lactose by Pectinex Ultra SP in water. *Biotechnology Letters*, 23: 1921-1924.
- Depeint, F., Tzortzis, G., Vulevic, J., Anson, K. & Gibson, G. R. (2008)** Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *B. bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 87: 785-791.
- FOODSME-HOP, Mercado y tendencias. (2013)** <http://www.foodsme-hop.eu/bases/food.nsf>
- Forchielli, M. L. & Walker, W. A. (2005)** The role of gut associate lymphoid tissues and mucosal defense. *Journal of Nutrition*, 93: S41-S48.
- Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985)** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85.
- Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. (1995)** Dietary modulation of the human colonic microbiote. Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Van Loo, J. Rastall, R. A. & Roberfroid, M. B. (2004)** Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Review*, 17: 259-275.
- Gopalakrishnan, A., Clinthorne, J. F., Rondini, E. A., McCaskey, S. J., Gurzell, E. A., Langohr, I. M., Gardner, E. M. & Fenton, J. I. (2012)** Supplementation with galactooligosaccharides increases the percentage of NK cells and reduces colitis severity in Smad3-Deficient Mice. *Journal of Nutrition*, 142: 1336-1342.
- Goulas, A., Tzortzis, G. & Gibson, G. R. (2007)** Development of a process for the production and purification of α - and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *International Dairy Journal*, 17: 648-656.
- Gruber, C., Van Stuijvenberg, M., Mosca, F., Moro, G., Chirico, G. & Braegger, C. P. (2010)** Reduced occurrence of early atopic dermatitis because of immunoactive prebiotics among low-atopy-risk infants. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 126: 791-797.

- Guerrero, C., Vera, C. & Illanes, A. (2013)** Optimization of synthesis of oligosaccharides derived from lactulose (fructosyl-galactooligosaccharides) with β -galactosidases from different origin. *Food Chemistry*, 128 (10).
- Guio, F., Rodriguez, M. A, Almeciga-Diaz, C. J. & Sánchez, O. F. (2009)** Recent trends in fructooligosaccharides production. *Recent Pat Food Nutrition Agricultural*, 1(3): 221-30.
- Hangs, Y.D. & Woodams, E.E. (1995)** Fructosyltransferase activity of commercial enzyme preparations used in fruit juice processing. *Biotechnology Letters*, 17: 741-745.
- Heine, W., Uihemann, M. & Mohr, C. (1998)** Physiological colonization of the intestinal tract in infants, pathological variations and nutritional influences. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 146 (8): S7-S8.
- Hernández-Hernández, O., Marín-Manzano, M. C., Rubio, L. A., Moreno, F. J., Sanz, M. L. & Clemente, A. (2012)** Monomer and linkage type of galacto-oligosaccharides affect their resistance to ileal digestion and prebiotic properties in rats. *The Journal of Nutrition*, 142: 1232-1239.
- Honda, K., Matsumoto, T., Kuroki, F., Iida, M., Oka, M. & Sawatani, I. (1999)** Protective effect of lactosucrose on intracolonic indomethacin-induced small-intestinal ulcers in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34: 264-269.
- Hopper, L.V., Midtvedt, T. & Gordon, J.L. (2002)** How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Reviews*, 22: 283-307.
- Hsu, C.A., Lee, S.L. & Chou, C.C. (2007)** Enzymatic production of galactooligosaccharides by beta-galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 2225-2230.
- Huebner, J., Wehling, R. L., Parkhurst, A. & Hutkins, R. W. (2008)** Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 18: 287-293.
- Husain, Q. (2010)** β -Galactosides and their potential applications: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1): 41-62.
- Kaplan, H. & Hutkins, W. (2000)** Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2682-4.
- Kishino, E., Norii, M., Fujita, K., Hara, K., Teramoto, F. & Fukunaga, M. (2006)** Enhancement by lactosucrose of the calcium absorption from the intestine in growing rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70: 1485-1488.
- Klewicki, R. (2007)** The stability of gal-polyols and oligosaccharides during pasteurization at a low pH. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 1259-1265.
- Kolida, S., Gibson, G. R., De Vos, W. M., Molenaar, D. & Saulnier, D. M. A. (2007)** Identification of Prebiotic Fructooligosaccharide Metabolism in *Lactobacillus*

plantarum WCFS1 through Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (6): 1753-1765.

- Kozempel, M. F., Kurantz, M. J., Craig, J. C. & Hicks, K. B. (1995)** Development of a Continuous Lactulose Process, Separation and Purification. *Biotechnology Progress*, 11: 592-595.
- Krutmann, J. (2009)** Pre-and probiotics for human skin. *Journal of Dermatology Science*, 54: 1-5.
- Lamsal, B. P. (2012)** Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 2020-2028.
- Lee, J. H., Lim, J. S., Song, Y. S., Kang, S. W., Park, C. & Kim, S. W. (2007)** Optimization of culture medium for lactosucrose 4^G-β-D-galactosylsucrose production by *Sterigmatomyces elviae* mutant using statistical analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 1996-2004.
- Li, W., Xiang, X., Tang, S., Hu, B., Tian, L., Sun, Y., Ye, H. & Zeng, X. (2009)** Effective enzymatic synthesis of lactosucrose and its analogues by β-D-galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3927-3933.
- Mahoney, R. R. (1998)** Galatosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. *Food Chemistry*, 63: 147-154.
- Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A. & Villamiel, M. (2008a)** Optimization of conditions for galactooligosaccharides synthesis during lactose hydrolysis by β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*, 107: 258-264.
- Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Olano, A., Corzo, N., Villamiel, M. & Jimeno, M. L. (2008b)** Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides produced from lactulose by transgalactosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 557-563.
- Matella, N. J., Dolan, K. D. & Lee, Y. S. (2006)** Comparison of galactooligosaccharide production in free-enzyme ultrafiltration and in immobilized-enzyme systems. *Journal of Food Science*, 71: C363-C368.
- Mendez, A. & Olano, A. (1979)** Lactulose. Chemical properties and applications in infant nutrition and medicine. A review. *Dairy Science Abstract*, 41: 531-535.
- Mizote, A., Taniguchi, Y., Takei, Y., Koya-Miyata, S., Kohno, K., Iwaki, K., Kurose, M., Oku, K., Chaen, H. & Fukuda, S. (2009)** Lactosucrose inhibits body fat accumulation in rats by decreasing intestinal lipid absorption. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 73: 582-587.
- Monsan, P. & Paul, F. (1995)** Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiology Reviews*, 16: 185-192.

- Montgomery, E. M. & Hudson, C.S. (1930)** Relation between rotary power and structure in the sugar group. XXVII. Synthesis of a new disaccharide ketose (lactulose) from lactose. *Journal of American Chemistry Society*, 52: 2101–2106.
- Montilla, A., Corzo, N. & Olano, A. (2012)** Effects of monovalent cations (Na⁺ and K⁺) on galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Milchwissenschaft*, 67 (1): 14-18.
- Montilla, A., Olano, A., Martínez-Villaluenga, C. & Corzo, N. (2011)** Study of influential factors on oligosaccharide formation by fructosyltransferase activity during stachyose hydrolysis by Pectinex Ultra SP-L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 10705-10711.
- Morales, V., Sanz, M. L., Olano, A. & Corzo, N. (2006)** Rapid separation on activated charcoal of high oligosaccharides in honey. *Chromatographia*, 64: 233–238.
- Moro, G., Arslanoglu, S., Stahl, B., Jelinek, J., Wahn, U. & Boehm, G. (2006)** A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Archives of disease in childhood*, 91: 814-819.
- Mussatto, S. I. & Mancilha, I. M. (2006)** Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68: 587-597.
- Nguyen, T. T., Nguyen, H. A., Arreola, S. L., Mlynek, G., Djinovic-Carugo, K., Mathiesen, G., Nguyen, T. H. & Haltrich, D. (2012)** Homodimeric β -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* DSM 20081: Expression in *Lactobacillus plantarum* and biochemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 1713-1721.
- Ohkusa, T., Ozaki, Y., Sato, C., Mikuni, K. & Ikeda, H. (1995)** Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora. *Digestion*, 56: 415-420.
- Olano, A. & Juárez, M. (2005)** Alimentos funcionales. *Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT)*.
- Osman, A., Tzortis, G., Rastall, R. A. & Charalampopoulos, D. (2012)** BbgIV is an important *Bifidobacterium* β -galactosidase for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides at high temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 740-748.
- Padilla, B., Ruiz-Matute, A. I., Belloch, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N. & Manzanares, P. (2012)** Evaluation of oligosaccharide synthesis from lactose and lactulose using β -galactosidases from *Kluyveromyces* isolated from artisanal cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 5134-5141.
- Panesar P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F. & Kumar, H. (2006)** Microbial production, immobilization and applications of β -galactosidase. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, 81: 530-543.
- Panesar, P. S. & Kumari, S. (2011)** Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnology Advances*, 29: 940-948.

- Patel, S. & Goyal, A. (2011)** Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 27:1119-1128.
- Petuely, F. (1957)** The bifidus factor. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 82: 1957–1960.
- Playne, M. J. & Crittenden, R. G. (2009)** Galacto-oligosaccharides and other products derived from lactose. *Advanced Dairy Chemistry: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents (P.L.H. McSweeney & P.F. Fox.)*, 3: 121-201.
- Prata, M. B., Mussatto, S. L., Rodrigues, L. R. & Teixeira, J. A. (2010)**. Fructooligosaccharides production by *Penicillium expansum*. *Biotechnology Letters*, 32: 837-40.
- Rabiu, B. A., Jay, A. J., Gibson, G. R. & Rastall, R. A. (2001)** Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by β -galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2526-2530.
- Rastall, R. A., Gibson, G. R. & McCartney, A. L. (2005)** Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. *British Journal of Nutrition*, 93 (S1): S31-S34.
- Rivero-Urgell, M. & Santamaria-Orleans, A. (2001)** Oligosaccharides: Application in infant food. *Early Human Development*, 65: S43–S52.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Waltzi, B., Szajewska, H., Stahi, B., Guaner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M. J., Leotoing, L., Wittrant, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M. & Meheust, A. (2010)** Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104 (2).
- Roberfroid, M., Reid, G., Sanders, M. E., Gaskins, H., Gibson, G., Mercenier, A., Rastall, R., Rowland, I., Cherbut, C. & Klaenhammer, T. (2003)** New Scientific Paradigms for Probiotics and Prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*.
- Rowland, I. R. & Tanaka, R. (1993)** The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human fecal microflora. *Journal of applied bacteriology*, 74: 667-674.
- Ruan, Z., Liu, S. Q., Cui, Z., Su, D. D., Wu, X. S., Dai, Z. K., Luo, C. Y., Liao, C. L. & Yin, Y. L. (2012)** Optimization of fermentation medium for β -fructofuranosidase production from *Arthrobacter* sp 10138 using artificial neural network and genetic algorithms. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 10: 176-181.
- Ruttloff, H., Tafel, A., Krause, W., Haenel, H. & Tafel, K. (1967)** The intestinal enzymatic decomposition of galacto-oligosaccharides in the human and animal intestine, with particular regard to *Lactobacillus bifidus*. Part I. On the microbiology of the intestinal flora of the suckling. *Nahrung*, 11: 31-37.
- Saarela, M., Lahteenmaki, R., Crittenden, R., Salminen, S. & Mattila-Sandholm, T. (2002)** Gut bacteria and health foods-the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 99-117.

- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. & Prapulla, S. G. (2005)** Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 442-457.
- Sanz, M. L., Gibson, G. R. & Rastall, R. A. (2005)** Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5192-5199.
- Savaiano, D. A., Ritter, A. J., Klaenhammer, T., Walker, A., Carlson, M. R., Foyt, H. L. & Ruckle, J. (2012)** A Novel high purity short-chain galacto-oligosaccharide (RP-G28) improves lactose digestion and symptoms of lactose intolerance. *Gastroenterology CT Digestive Disease Week (DDW), San Diego*, S182-S182.
- Schumann, C. (2002)** Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. *European Journal of Nutrition*, 41: 17-25.
- Schuster-Wolff-Bühning, R., Fischer, L. & Hinrichs, J. (2010)** Production and physiological action of the disaccharide lactulose. *International Dairy Journal*, 20: 731-741.
- Sharma, P., Sharma, B. C., Puri, V. & Sarin, S. K. (2008)** An open-label randomized controlled trial of lactulose and probiotics in the treatment of minimal hepatic encephalopathy. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 20: 506-511.
- Sharon, N. (2006)** Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760(4): 527-537.
- Slominski, B. A. (1994)** Hydrolysis of galactooligosaccharides by commercial preparations of α -galactosidase and β -fructofuranosidase: Potential for use as dietary additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65: 323-330.
- Smrlicova, H., Canigova, M., Mastihubova, M. & Mastihuba, V. (2011)** Enzymatic preparation of melibiose and alkyl β -D-fructofuranosides by commercial lactase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72: 53-56.
- Sriphannam, W., Lumyong, S., Niumsap, P., Ashida, H., Yamamoto, K. & Khanongnuch, C. (2012)** A selected probiotic strain of *Lactobacillus fermentum* CM33 isolated from breast-fed infants as a potential source of β -galactosidase for prebiotic oligosaccharide synthesis. *The Journal of Microbiology*, 50: 119-126.
- Stanton, C., Desmond, C., Coakley, M., Collins, J. K., Fitzgerald, G. & Ross, R. P. (2003)** Challenges facing development of probiotic-containing foods. *Handbook of Fermented Functional Foods*. Farnworth, E.R. editor, CRC Press, Boca Raton, 27-58.
- Sullivan, A. & Edlund, C. (2001)** Nord CE Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infectious diseases*, 1: 101-114
- Sumner, J. B. & Howell, S. F. (1935)** Method for determination of saccharase activity. *The Journal of Biological Chemistry January*. 108 (1): 51-54.
- Swennen, K., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2006)** Non-digestible Oligosaccharides with Prebiotic Properties. *Critical Reviews in Food Science and nutrition*, 46: 459-471.

- Tamura, Y.**, Mizota, T., Shimamura, S. & Tomita, M. (1993) Chapter 10: Lactulose and its application to the food and pharmaceutical industries. *Bulletin of the IDF*, 289: 43-53.
- Teramoto, F.**, Rokutan, K., Sugano, Y., Oku, K., Kishino, E., Fujita, K., Hara, K., Kishi, K., Fukunaga, M. & Morita, T. (2006) Long-term administration of 4^G-β-D-galactosylsucrose (lactosucrose) enhances intestinal calcium absorption in young women: A randomized, placebo-controlled 96-wk study. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 52: 337-346.
- Torres, D.**, Gonçalves, M., Teixeira, J. & Rodrigues, L. (2010) Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 438-454.
- Trindade, M. I.**, Abratt, V. R. & Reid, S. J. (2006) Induction of sucrose utilization genes from *Bifidobacterium lactis* by sucrose and raffinose. *Microbial Biotechnology*, 33: 1003-9.
- Tuohy, K. M.**, Rouzaud, G. C. M., Brück, W. M. & Gibson, G. R. (2005) Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-Assessment of efficacy. *Current Pharmaceutical Design*, 11: 75-90.
- Tuohy, K. M.**, Ziemer, C. J., Cherie, J., Klinder, A., Knoebel, Y., Pool-Zobel, B. L. & Gibson, G. R. (2002) A human volunteer study to determine the prebiotic effects of lactulose powder on human colonic microbiota. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14: 165–173.
- Tzortzis, G.** (2009) Functional properties of the second generation prebiotic Galactooligosaccharide (B-GOS). *Agro Food Industry Hi-Tech*, 20(3): 43-6.
- Van der Meulen, R.**, Makras, L., Verbrugghe, K., Adriany, T. & De Vuyst, L. (2006) In vitro kinetic analysis of oligofructose consumption by *Bacteroides* and *Bifidobacterium* spp. indicates different degradation mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1006-12.
- Van Vlies, N.**, Hogenkamp, A., Thijssen, S., Dingjan, G.M., Knipping, K. & Garssen, J. (2012) Effects of short-chain galacto- and long-chain fructo-oligosaccharides on systemic and local immune status during pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, 94: 161-168.
- Walton, G. E.**, Van den Heuvel, E. G. H. M., Kusters, M. H. W., Rastall, R. A., Tuohy, K. M. & Gibson, G. R. (2012) A randomised crossover study investigating the effects of galacto-oligosaccharides on the faecal microbiota in men and women over 50 years of age. *British Journal of Nutrition*, 107: 1466-1475.
- Wang, Y.** (2009) Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, 42: 8-12.
- Weijers, C. A. G. M.**, Franssen, M. C. R. & Visser, G. M. (2008) Glycosyltransferase catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 26: 436–456.