

Oligosacáridos derivados de la lactosa: síntesis, análisis y bioactividad

A. Montilla Corredera, N. Corzo Sánchez, F.J. Moreno Andújar, A. Olano Villén, M. Villamiel Guerra

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN (CIAL) (CSIC-UAM).
CEI (UAM+CSIC). MADRID

RESUMEN

Este artículo de revisión aborda en primer lugar la obtención, análisis y caracterización de una serie de oligosacáridos derivados de la lactosa como los galacto-oligosacáridos (GOS) y los derivados de la lactulosa (OsLu). Igualmente, se describen los efectos beneficiosos más relevantes que pueden ejercer sobre la salud estos oligosacáridos no digeribles, haciendo especial hincapié en aquellos relacionados con el sistema gastrointestinal. Teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas y bioactivas que presentan, los oligosacáridos derivados de la lactosa son ingredientes que pueden fácilmente incorporarse a un amplio número de alimentos y/o bebidas funcionales, evidenciando su indudable interés comercial. No obstante, es necesario realizar más estudios que confirmen la estabilidad de estos carbohidratos durante el procesado y conservación, así como las modificaciones organolépticas que puedan producirse una vez añadidos a la matriz alimentaria.

Palabras clave: Transgalactosilación. Análisis de carbohidratos. Galactooligosacáridos. Oligosacáridos derivados de la lactulosa. Bioactividad. Efecto prebiótico.

INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los alimentos que tomamos habitualmente se digieren en el estómago y en el intestino delgado mediante la intervención de diversas enzimas. Algunos ingredientes no se digieren o lo hacen parcialmente y pasan al colon, donde son sometidos a la acción de la microbiota intestinal. Los denominados carbohidratos prebióticos son oligosacáridos que llegan inalterados al colon y estimulan selectivamente el crecimiento de un número limitado de microorganismos considerados beneficiosos para la salud, fundamentalmente lactobacilos y bifidobacterias.

Desde que en 1995 Gibson y Roberfroid (1) introdujeron el concepto de prebiótico, han sido numerosos los

ABSTRACT

This review firstly addresses the production, analysis and characterization of a range of lactose-derived oligosaccharides such as galacto-oligosaccharides (GOS) and oligosaccharides derived from lactulose (OsLu). Secondly, the most relevant beneficial effects exerted by this type of non-digestible oligosaccharides on human health, especially in regard to the gastrointestinal system, are also described. Taking into account their physico-chemical and bioactive properties, lactose-derived oligosaccharides can be easily incorporated as a high-value ingredient into a wide number of functional foods and/or beverages, highlighting their commercial importance. However, it is necessary to carry out further studies on the stability of these oligosaccharides under the processing conditions and applied storage, as well as on the potential organoleptic modifications produced by their addition to real food products.

Key words: Transgalactosylation. Carbohydrate analysis. Galactooligosaccharides. Oligosaccharides derived from lactulose. Bioactivity. Prebiotic effect.

estudios realizados en los que se demuestran los beneficios que aportan para la salud (2) y, por ello, han adquirido gran popularidad entre los consumidores, aumentando de modo constante su producción mundial (3). De la gran variedad de carbohidratos que se están considerando como potenciales prebióticos, la inulina, los fructooligosacáridos (FOS), la lactulosa y los galactooligosacáridos (GOS) son los primeros reconocidos como tales debido al gran número y solidez de los trabajos científicos que existen sobre ellos (4-7). Los GOS son oligosacáridos derivados de la lactosa que se encuentran presentes de forma natural en la leche materna a muy bajas concentraciones (del orden de ppm). Los GOS, al igual que los FOS, son reconocidos legalmente en la Unión Europea como ingredientes alimentarios y no como aditivos, como GRAS en EE. UU. y como FOSHU en

Japón (8). Su incorporación en fórmulas maternizadas, de larga tradición en Japón y más reciente y menos frecuente en Europa, ha permitido imitar los efectos de la leche humana en la microbiota de los lactantes.

Los GOS pueden obtenerse por transgalactosilación enzimática a partir de la lactosa presente, por ejemplo, en el permeado procedente del suero, subproducto muy abundante de la industria quesera. Por ello, la obtención de oligosacáridos prebióticos semejantes a los presentes en la leche humana constituye un método atractivo y eficaz de aprovechamiento del suero, muy estudiado en los últimos años. Además, recientemente se ha propuesto que los GOS así obtenidos pueden posteriormente isomerizarse originándose oligosacáridos derivados de la lactulosa (OsLu), con propiedades bioactivas mejoradas respecto a los GOS y a la propia lactulosa (9,10).

El presente artículo pretende revisar los principales métodos de obtención y análisis de GOS, OsLu y otros oligosacáridos derivados de la lactosa, así como los principales efectos beneficiosos que, para la salud del consumidor, pueden tener estos ingredientes con el fin de disponer de información actualizada que contribuya a ampliar y diversificar sus aplicaciones en la industria alimentaria.

SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTOSA Y LA LACTULOSA

Los GOS son derivados galactosilados de la lactosa que pueden obtenerse mediante reacciones de transgalactosilación catalizadas por β -galactosidasas (EC 3.2.1.23) de diversos orígenes (levaduras, hongos y bacterias) durante la hidrólisis de la lactosa. Un esquema del mecanismo general se muestra en la figura 1. Los oligosacáridos formados se convierten, a su vez, en sustratos para la enzima y son lentamente hidrolizados o actúan como aceptores de nuevas

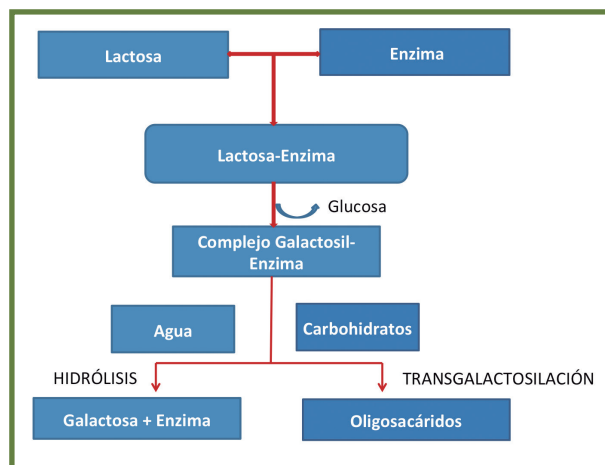


Fig. 1. Esquema del mecanismo general de hidrólisis y transgalactosilación enzimática de carbohidratos.

moléculas de galactosa. La importancia de ambas reacciones va a depender, en gran medida, de la concentración de sustrato, a mayor concentración, mayor formación de GOS y a menor concentración, mayor porcentaje de hidrólisis.

Los productos así obtenidos son mezclas complejas de GOS con enlaces $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ y $\beta(1\rightarrow6)$ y un grado de polimerización entre 2 y 8, dependiendo de las condiciones de reacción (concentración de sustrato y enzima, temperatura, tiempo, pH) y de la fuente de la enzima. En estas mezclas los trisacáridos son los principales productos de reacción, siendo la 6'-galactosil lactosa y la 4'-galactosil lactosa los compuestos mayoritarios (11,12). Además, también pueden originarse cantidades importantes de disacáridos, siendo la alolactosa (6-O- β -D-galactopiranosil-D-glucosa) el que se forma en mayores concentraciones (13).

Aunque la lactulosa es un conocido derivado de la lactosa con múltiples beneficios para la salud (14), su utilización como sustrato para la síntesis de oligosacáridos no ha sido abordada hasta hace pocos años (15). La β -galactosidasa tiene la capacidad de hidrolizar la lactulosa y transferir el residuo galactosil a la galactosa de otra molécula de lactulosa. Como ocurre en el caso de la transgalactosilación de la lactosa, la galactosa liberada se une por enlaces $\beta(1\rightarrow6)$, $\beta(1\rightarrow3)$ o $\beta(1\rightarrow4)$ originándose los correspondientes OsLu. Los estudios de Martínez-Villaluenga y cols. (15) y Cardelle-Cobas y cols. (16) han puesto de manifiesto que los principales OsLu que se originan utilizando enzimas de *Aspergillus aculeatus*, *A. oryzae* y *Kluyveromyces lactis* son la 6'-galactosil lactulosa y la 1-galactosil lactulosa.

Dado que los GOS son carbohidratos reductores, los OsLu pueden también formarse por isomerización química de aquellos, utilizando aluminato sódico como catalizador, al convertirse las aldosas en los correspondientes cetozúcares (17).

Otros oligosacáridos derivados de la lactosa también pueden obtenerse vía transglicosilación catalizada por glicosiltransferasas empleando diferentes glicosil o fructosil donadores, como la sacarosa, y la lactosa como aceptor. Este método ha permitido la obtención de lactosacarosa, trisacárido producido de la transferencia de un residuo fructosilo de la sacarosa a la lactosa, reacción catalizada por β -fructofuranosidasas (EC 3.2.1.26) o levansacarasas (EC 2.4.1.10) (18,19). De modo similar, la 2- α -D-glucopiranosil-lactosa se produce utilizando dextrantransferasa (EC 2.4.1.5) que transfiere la glucosa de la sacarosa a la lactosa mediante un enlace $\alpha(1\rightarrow2)$ (20).

ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS

Tal y como se ha indicado anteriormente, los productos obtenidos tras las reacciones de transglicosilación suelen comprender una mezcla compleja de carbohidratos que hay que analizar y caracterizar de forma exhaustiva, dada la necesidad de información detallada sobre la composición de los ingre-

dientes alimentarios que exige la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria o European Food Safety Authority (EFSA) para el reconocimiento de las propiedades funcionales que se demandan. Por ello, en los últimos años ha habido numerosos estudios sobre este tema, en los que se han empleado tanto técnicas cromatográficas y espectrométricas clásicas como otras combinadas más avanzadas (9). Dado que las reacciones de transglucosilación de la lactosa pueden realizarse en diferentes condiciones, con distintos enzimas y distintos aceptores o donantes, nuevos derivados de la lactosa están continuamente aislándose y caracterizándose. Aunque los di- y trisacáridos han sido, en general, bien caracterizados, las estructuras químicas de oligosacáridos de mayor peso molecular presentan mayores dificultades analíticas y aún no han sido investigadas en detalle (9).

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA EL ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS

Debido a la gran variedad y similitud estructural de los carbohidratos, para su análisis es necesario el uso de técnicas de alto poder de resolución, tales como las cromatográficas. Entre las principales técnicas analíticas que se emplean actualmente, la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son las

más utilizadas. También, aunque más raramente utilizada, la electroforesis capilar (CE) proporciona un análisis de alta resolución de mezclas heterogéneas de oligosacáridos, como los GOS. En este caso los carbohidratos se derivatizan previamente para detectarse, posteriormente, mediante radiación UV o fluorescencia inducida por láser (21,22).

El análisis mediante GC de estos oligosacáridos implica también una derivatización previa convirtiéndolos en sus derivados volátiles, sin embargo la GC es ampliamente utilizada para el análisis de carbohidratos debido a su rapidez, simplicidad y su relativo bajo coste. Se trata de una técnica de alto poder resolutivo, sensibilidad y selectividad que, acoplada a un detector simple y casi universal como el de ionización de llama (FID), permite la cuantificación de oligosacáridos en alimentos presentes en baja concentración (23). Esta técnica se ha utilizado para el análisis de los GOS presentes en leches comerciales sin lactosa (24) (Fig. 2), los carbohidratos formados en permeado de suero isomerizado con cáscara de huevo y posteriormente transgalactosilado (12), así como para comprobar la pureza de la kojibiosa obtenida en un proceso biotecnológico eficaz y económico que utiliza sacarosa y lactosa como materias primas (25,26).

En el caso de la determinación de carbohidratos mediante HPLC, las muestras pueden analizarse directamente sin derivatización previa. Además, el desarrollo durante las últimas décadas de un gran número de materiales y de fases estacio-

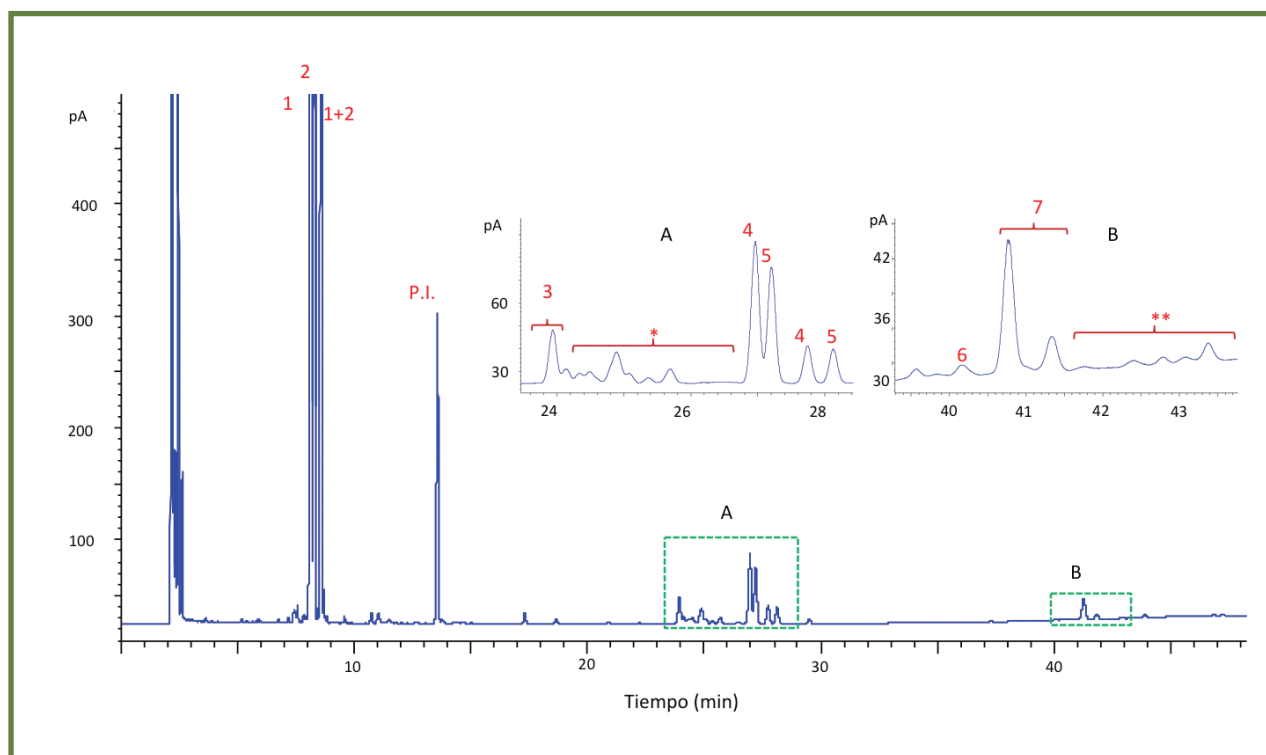


Fig. 2. Perfil cromatográfico (GC-FID) de los trimetilsilil derivados de los carbohidratos presentes en una leche con lactosa hidrolizada. Cromatograma completo: galactosa (picos 1), glucosa (picos 2) y patrón interno (P.I., β -fenilglucósido). (A) Disacáridos: lactosa (picos 3), alolactosa (picos 4), 6-galactobiosa (pico 5). (B) Trisacáridos: 4'-galactosil-lactosa (pico 6), 6'-galactosil-lactosa (picos 7). *Disacáridos y **trisacáridos no identificados.

narias para trabajar en diferentes modos de separación ha permitido que esta técnica sea la más extendida para el análisis de oligosacáridos prebióticos (9). La técnica de HPLC con detección por índice de refracción (RID) ha sido muy utilizada para la determinación de derivados de la lactosa por ser sencilla, rápida y económica (27), sin embargo presenta una baja sensibilidad, selectividad y resolución, siendo especialmente adecuada para el análisis de mezclas no muy complejas. La cromatografía de alta eficacia de intercambio aniónico con detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD) es una de las técnicas más empleadas en el análisis de carbohidratos prebióticos por su alta resolución y sensibilidad, tal y como se ha puesto de manifiesto recientemente en el análisis de las mezclas obtenidas en la síntesis de 2- α -D-glucopiranosil-lactosa (28). Existe, por tanto, en la bibliografía un número elevado de trabajos en los que se ha empleado HPAEC-PAD en el análisis de GOS y OsLu (13,15,16,29,30).

Recientemente, también se ha utilizado la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), que utiliza fases estacionarias hidrofílicas y fases móviles hidrofóbicas, para el análisis de oligosacáridos de leche humana (31) y de diferentes GOS comerciales (32).

FRACCIONAMIENTO DE CARBOHIDRATOS

Debido a que en las reacciones enzimáticas se obtienen mezclas muy complejas de carbohidratos, con una elevada concentración de mono- y disacáridos sin propiedades prebióticas y con alto poder calórico, en muchas ocasiones es necesario un paso adicional para su fraccionamiento. La finalidad de esta etapa puede ser la obtención de productos comerciales enriquecidos en oligosacáridos prebióticos u obtener compuestos aislados para proceder a una posterior caracterización. En el primer caso, si se pretende obtener grandes cantidades de oligosacáridos para una aplicación industrial, la filtración por membrana y más concretamente la nanofiltración puede ser la técnica de elección (33,34), o tratamientos microbiológicos, con levaduras, como en el nuevo proceso de obtención de kojibiosa que posibilita su uso como ingrediente alimentario (25,26). Aunque también se han estudiado tecnologías emergentes tales como la extracción con fluidos presurizados (35) o con fluidos supercríticos (36). Sin embargo, si el fraccionamiento es previo a la caracterización se pueden utilizar distintos métodos de separación (carbón activo, HILIC, RP-HPLC, SEC) que permiten obtener compuestos casi puros, lo que posibilita en gran medida la caracterización de los mismos (34).

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE CARBOHIDRATOS

Dada la estrecha relación que existe entre las características estructurales de los carbohidratos (composición monomérica, enlace glicosídico, grado de polimerización) y sus propiedades funcionales resulta de gran importancia

elucidar de forma exacta dicha estructura. Para dicho fin se han utilizado diferentes técnicas como cristalografía por rayos X, espectroscopía infrarroja y Raman o microscopía electrónica; sin embargo, la espectroscopía de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (NMR) son las más empleadas. Los métodos basados en el análisis por MS proporcionan una mayor sensibilidad que los de NMR y son preferidos cuando existe limitación en la cantidad de muestra, aunque la NMR es más adecuada para nuevos compuestos y para el estudio de procesos dinámicos, ya que se puede determinar la estructura a nivel atómico (9). Ambas técnicas espectroscópicas pueden acoplarse a las de separación cromatográfica antes referidas, pudiéndose desarrollar métodos muy potentes para el análisis estructural de los carbohidratos.

Espectrometría de masas (MS). Hay una gran variedad de técnicas aplicables al análisis de carbohidratos dependiendo de la técnica de separación, los modos de ionización y el/los analizadores de masas acoplados. La fuente de ionización normalmente acoplada a GC es la de impacto electrónico (EI) con un analizador cuadrupolo (Q). Esta técnica proporciona información cualitativa de gran interés, aunque al ser moléculas muy semejantes los perfiles de fragmentación son muy similares, encontrándose las mayores diferencias en la intensidad de algunos fragmentos (m/z); estos datos facilitan información acerca del tamaño del anillo y los enlaces glicosídicos (37). Hernández y cols. (38) utilizaron GC-MS para el análisis de los carbohidratos presentes en el Vivinal®GOS. Más recientemente se han analizado de forma exhaustiva los OsLu formados mediante la transgalactosilación de la lactulosa con 3 β -galactosidasas comerciales (39). También se ha utilizado GC-MS para confirmar la identidad y pureza de la kojibiosa obtenida por un nuevo proceso biotecnológico (26).

La fuente de ionización más ampliamente utilizada con cromatografía líquida es la ionización por electronebulización (ESI), acoplada a distintos analizadores de masa, cuadrupolo (Q), de tiempo de vuelo (TOF), de trampa de iones (IT), entre otros, y sistemas múltiples con combinación de estos y otros analizadores (MSⁿ).

Mediante la técnica HPLC-ESI-Q se determinó la presencia hasta de hexasacáridos en OsLu obtenidos utilizando una β -galactosidasa de *A. oryzae* (39). Pero para obtener mayor información estructural se necesita fragmentaciones adicionales, como en el análisis de distintos GOS comerciales por HILIC-ESI(+)-MSⁿ, con una IT como analizador de masas, que permitió determinar los enlaces glicosídicos según los distintos fragmentos característicos formados y su abundancia (32).

Otra fuente de ionización muy utilizada es la de desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI). Mediante MALDI-TOF se pudo determinar, en una fracción enriquecida en oligosacáridos de los OsLu obtenidos a partir de Duphalac® y una β -galactosidasa de *A. oryzae*, la presencia de compuestos con grado de polimerización de hasta 8 (40).

En los últimos años, estas técnicas multidimensionales acopladas están posibilitando la caracterización de un gran número de compuestos presentes en distintas mezclas de GOS (41), así como de oligosacáridos de leche humana, que presentan estructuras mucho más complejas (42).

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR). Esta técnica se utiliza habitualmente para la caracterización completa de los nuevos oligosacáridos obtenidos en los distintos procesos biotecnológicos, pero es necesario aislarlos con un alto grado de pureza. Para la caracterización se obtienen normalmente los espectros mononucleares 1D de carbono (^{13}C) y de protón (^1H) y los heteronucleares 2D (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC). Esta técnica ha posibilitado en los últimos años la elucidación completa de la estructura de diversos derivados de la lactosa (28-30) y de la lactulosa (15,27).

BIOACTIVIDAD DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTOSA Y LA LACTULOSA

Como se ha comentado en la introducción, durante los últimos años se ha prestado especial atención a los ingredientes prebióticos debido al efecto beneficioso que ejercen sobre la microbiota intestinal. Entre los diferentes prebióticos reconocidos, los GOS constituyen una adecuada elección para ser incorporados a diferentes tipos de alimentos siendo las fórmulas infantiles unos de los más destacados (43). Existe un gran número de estudios científicos que avalan los beneficios de los GOS sobre la salud humana (44). Los dos mecanismos más importantes relacionados con el efecto de los GOS en el hospedador son los siguientes (45,46):

1. Estimulación del crecimiento de bacterias beneficiosas en el colon tales como lactobacilos y bifidobacterias.
2. Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC; acetato, propionato, butirato) durante la fermentación de los carbohidratos. Estos productos del metabolismo de las bacterias pueden ejercer su efecto beneficioso en el intestino y se pueden absorber produciendo otros efectos deseables.

Los efectos positivos de los GOS se han revisado extensamente en la literatura en los últimos años, pero se conoce mucho menos sobre los beneficios de oligosacáridos recientemente descritos tales como los OsLu. Dada su similitud desde el punto de vista estructural, es presumible que ambos tipos de compuestos presenten propiedades bioactivas similares, que podrían ser mejoradas en los OsLu al tener como núcleo estructural a la lactulosa, de reconocido carácter prebiótico, en vez de la lactosa. A continuación se describen los principales efectos de ambos tipos de oligosacáridos sobre la salud humana.

DIGESTIBILIDAD

Diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*, tanto con animales como con humanos, han demostrado que los GOS son estables a la digestión enzimática y llegan mayoritariamente al colon donde son fermentados, cumpliendo así uno de los

requisitos primordiales para que un compuesto sea considerado como prebiótico (47,48). Respecto a la digestibilidad de los OsLu, Hernández-Hernández y cols. (49) pusieron de manifiesto en ratas una mayor resistencia a la digestión gastrointestinal y a la absorción en el intestino delgado de los OsLu en comparación con los GOS, debido probablemente al enlace $\beta(1\rightarrow4)$ entre la galactosa y la fructosa en los primeros.

EFFECTO PREBIÓTICO

Como ya se ha dicho, un prebiótico es un ingrediente que es selectivamente fermentado y origina cambios en la composición y/o en la actividad de la microbiota intestinal, lo cual beneficia a la salud y al bienestar del individuo (4,45). Existe un gran número de estudios, incluyendo los de intervención con humanos, que demuestran el efecto prebiótico de los GOS, tal y como han revisado muy recientemente Moreno y cols. (9). Aunque de forma menos extensa, también se ha estudiado el efecto prebiótico de los OsLu, tanto en ensayos *in vitro* con cultivos puros (50), con muestras fecales humanas (51,52), como *in vivo* con animales (53). Estos estudios han puesto de manifiesto que los nuevos OsLu pueden constituir una alternativa como prebióticos al disacárido de origen, la lactulosa, y también a los GOS. Actualmente, se encuentran en curso ensayos de intervención en humanos para establecer definitivamente las propiedades prebióticas de los OsLu.

ABSORCIÓN DE MINERALES

Varias investigaciones en animales y en humanos han puesto de manifiesto la capacidad de los GOS para mejorar la absorción de minerales, principalmente Ca, tras su fermentación en el colon. Una de las explicaciones plausibles es la bajada del pH que se origina, por la mayor formación de AGCC, mejorando la solubilidad de los minerales y su absorción a través de las células epiteliales del intestino grueso. Otro de los posibles mecanismos está relacionado con el incremento de la superficie disponible para la absorción, debido a la proliferación de las células epiteliales (9). Recientemente, Takasugi y cols. (54) han encontrado que la combinación de leche fermentada y GOS mejora en ratas la absorción de Ca, Fe y Zn y disminuye la excreción urinaria del P. También en humanos, concretamente en mujeres adolescentes sanas, se ha visto una mayor absorción de Ca tras la ingestión diaria durante tres semanas de 5 g de GOS incorporados a bebidas refrescantes (55).

EFFECTO FRENTE A PATÓGENOS

Los prebióticos pueden interferir en la unión de patógenos a la superficie de las células epiteliales del intestino

mediante diferentes mecanismos de acción (56), tal y como se muestra en la Figura 3.

Tzortzis y cols. (57), en un ensayo *in vitro* con Bimuno® GOS, mostraron una fuerte inhibición de la adhesión de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* a células HT29. Shoaf y cols. (58), en células Hep-2 y Caco-2, encontraron una mayor capacidad antiadherente frente a *E. coli* E2348/69 en el caso de los GOS, en comparación con FOS, inulina, lactulosa y rafinosa. En líneas celulares humanas Hep-2, también se ha visto la capacidad antiadherente de los GOS frente a *Cronobacter sakazakii*, un patógeno oportunista implicado en infecciones graves en neonatos (59). Drakoularakou y cols. (60), en un estudio con 159 voluntarios sanos, evaluaron la capacidad de Bimuno® GOS para reducir la diarrea del viajero, debido probablemente a la inhibición de la adhesión del patógeno a la mucosa intestinal.

MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

Los microorganismos intestinales y los AGCC que se producen durante el metabolismo sacarolítico pueden afectar positivamente al sistema inmune y proteger frente a enfermedades inflamatorias. Durante la fermentación de los GOS, el butirato y el propionato producidos pueden participar en varios mecanismos relacionados con la modulación de la respuesta inmune tales como la estimulación de apoptosis y la regulación de la producción de citoquinas, entre otros (46).

Estudios con ratas con pancreatitis demostraron un efecto positivo al administrar GOS por vía enteral, ya que se mantenía la función de la barrera intestinal debido a una estimulación de la IgA secretora de la mucosa (61). En un ensayo clínico con personas mayores sanas se evidenció que el consumo de Bimuno® GOS provocaba una disminución en la secreción de citoquinas proinflamatorias, un incremento en la secreción de citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y una mejora de la actividad en las células NK (62). La administración conjunta de GOS/FOS/pectinolíigosacáridos, POS (15-20 g/día) ha demostrado que mejora la actividad citolítica de las células NK y reduce la respuesta inmune en individuos adultos infectados con HIV-1 (63).

En relación a los OsLu, sólo existe un estudio llevado a cabo *in vitro* con células Caco-2 y HT29-MTX en el que se comprobó un incremento de las citoquinas anti-inflamatorias IL-6 y IL-10 y una reducción de los factores TNF- α , IL-1 β (64).

EFFECTO SOBRE LAS ALERGIAS

Durante los últimos años se ha observado en los países desarrollados un incremento en la incidencia de enfermedades alérgicas, atribuyéndose, entre otros factores, a un menor contacto con los microorganismos desde la infancia. Por los estudios realizados se ha comprobado que los niños alérgicos presentan menor número de bifidobacterias y lactobacilos, por tanto es de suponer que el consumo de

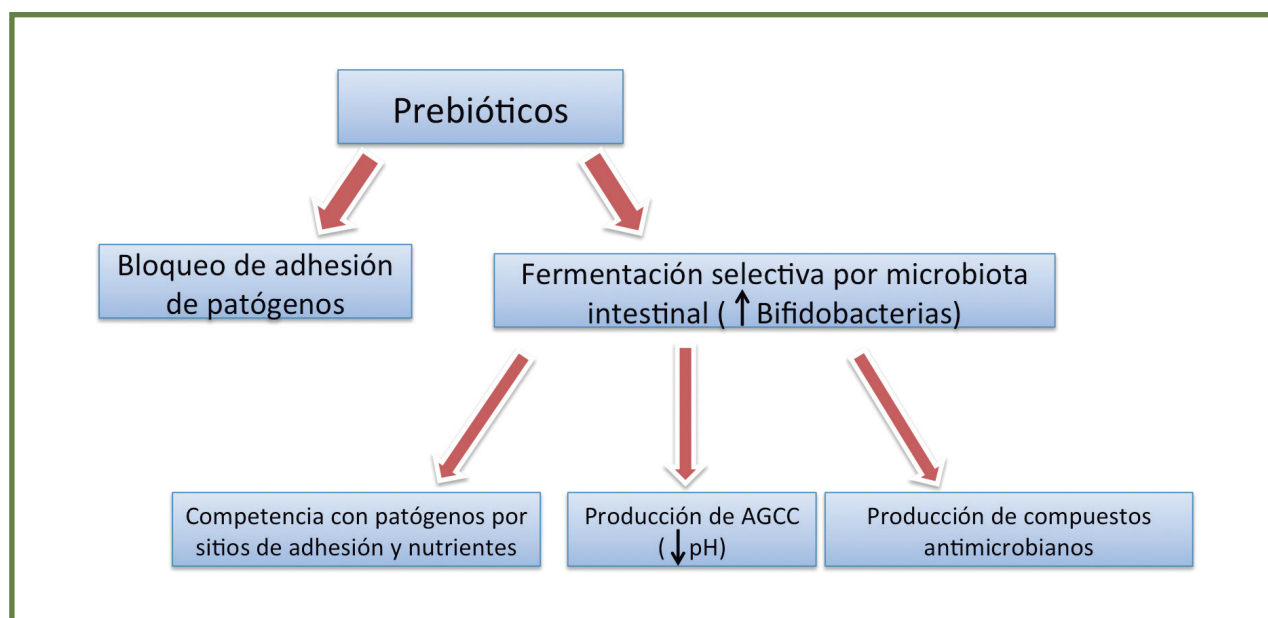


Fig. 3. Esquema de los diferentes mecanismos de acción de los carbohidratos prebióticos frente a microorganismos patógenos. Figura modificada y basada en Steed y Macfarlane (56).

prebióticos puede mejorar el estado de su microbiota intestinal y, por lo tanto, de las enfermedades de tipo alérgico. Los efectos de los prebióticos sobre las alergias se han estudiado tanto en ensayos con animales como en humanos. La administración de fórmulas infantiles con una mezcla de GOS/FOS (8 g/L) durante los primeros 6 meses de vida provocó, no sólo un efecto bifidogénico, sino también una disminución de la incidencia de dermatitis atópica en bebés y de diversas infecciones, encontrándose una disminución en los niveles de IgG1, IgG2, IgG3 e IgE (65-66). En otro estudio, realizado también con niños, se observó que el consumo de fórmulas infantiles con una mezcla de GOS/FOS/POS (8 g/L) ejercía un efecto preventivo sobre el desarrollo de dermatitis atópica e infecciones del tracto respiratorio, disminuyendo el número de tratamientos con antibióticos (67).

EFFECTO SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO Y LA OBESIDAD

El continuo aumento del número de personas obesas y los efectos negativos que pueden llegar a originarse en la salud humana como consecuencia de la obesidad es uno de los temas de mayor preocupación, tanto de las autoridades sanitarias como de los consumidores. Durante los últimos años, la obesidad se ha asociado con la alteración en la expresión de genes y de rutas metabólicas, así como con cambios en la microbiota intestinal tales como la reducción de la diversidad bacteriana. Dados los efectos positivos de los GOS sobre la microbiota intestinal, se ha planteado que la administración de estos oligosacáridos podría ejercer ciertos efectos que modificaran parámetros relacionados con la obesidad. Aunque este efecto no está totalmente clarificado y ha sido uno de los menos estudiados, se ha visto recientemente que la administración de Vivinal® GOS durante tres semanas a ratas jóvenes macho mostró una reducción de grasa e incrementó la expresión génica de péptidos relacionados con la saciedad (68). También, en individuos con sobrepeso y con síndrome metabólico, el consumo de GOS disminuyó los niveles de colesterol total y triglicéridos, mientras que los niveles de colesterol LDL y HDL no se vieron afectados (69).

APLICACIONES

Las aplicaciones de los GOS han sido ampliamente revisadas en los últimos años (46,70) y vienen determinadas por sus propiedades físico-químicas que, a la vez, dependen de su estructura química. Como se ha indicado anteriormente la estructura variará según las condiciones en las que tiene lugar la reacción de transgalactosilación (origen de la enzima, concentración de sustrato y enzima, pH, temperatura, tiempo). Los GOS poseen las mismas propiedades físico-químicas que el resto de oligosacáridos por lo que

pueden incorporarse a numerosas matrices alimentarias. En general, la solubilidad, osmolalidad, capacidad de formar cristales, poder edulcorante y reactividad disminuyen al aumentar el tamaño de la cadena. Son menos solubles en agua, menos dulces y tienen menor poder calórico que la sacarosa (71). Comparándolos con los mono- y disacáridos el mayor peso molecular da lugar a un incremento en la viscosidad mejorando el cuerpo y la palatabilidad del producto (72). Otra característica muy importante para su aplicación es que son estables a las condiciones de temperatura y pH utilizados en el procesado de alimentos (tratamientos térmicos, horneado, deshidratación, etc.) (73).

Los GOS y, teóricamente los OsLu, pueden incorporarse a leches fermentadas, yogur, zumos y otras bebidas ácidas, barras de cereales, productos de panadería y repostería, derivados cárnicos, sopas, salsas, complementos nutricionales, fórmulas infantiles y alimentos para mascotas. Además, en otros sectores como los relacionados con farmacia y cosmética también pueden emplearse, por ejemplo, en formulaciones para la piel.

CONCLUSIONES/TENDENCIAS FUTURAS

A pesar de los numerosos trabajos existentes relacionados con la síntesis de carbohidratos bioactivos derivados de la lactosa, es preciso seguir avanzando en el conocimiento de nuevas estrategias que permitan la obtención a gran escala de nuevos oligosacáridos que sean utilizados como ingredientes funcionales en los alimentos. El constante avance de técnicas analíticas robustas contribuirá a la elucidación de las nuevas estructuras sintetizadas para poder establecer en cada caso el binomio estructura-función. En este sentido, es preciso servirse de ensayos no sólo *in vitro* o con animales, sino también realizar estudios de intervención en humanos para esclarecer, con suficiente evidencia científica, las propiedades bioactivas que se les atribuyen, de forma que puedan ser reconocidas por las autoridades alimentarias. En el desarrollo de nuevos oligosacáridos bioactivos no debe olvidarse tampoco su aplicación directa a alimentos, que va a venir determinada por las propiedades físico-químicas de los mismos. Se requiere de más estudios que confirmen la estabilidad de estos carbohidratos durante el procesado y la conservación, así como sobre las modificaciones organolépticas que pueden producirse cuando estos ingredientes funcionales sean incorporados a los alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación AGL2011-27884 del Ministerio de Economía y Competitividad, y ALIBIRD 2009/AGR-1469 de la Comunidad de Madrid●

CORRESPONDENCIA:

F. Javier Moreno Andújar
 Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación,
 CIAL (CSIC-UAM)
 C/ Nicolás Cabrera, 9
 Campus de la Universidad Autónoma de Madrid
 28049 Madrid
 e-mail: javier.moreno@csic.es

BIBLIOGRAFÍA

- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401-12.
- Di Bartolomeo F, Startek JB, Van den Ende W. Prebiotics to fight Diseases: Reality or fiction. *Phytother Res* 2013;27:1457-73.
- Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter M, Bressollier P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Sci Technol* 2013;50:1-16.
- Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 2004;17:259-75.
- Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J Appl Microbiol* 2008;104:305-44.
- Rastall R A. Functional Oligosaccharides: Application and manufacture *Annu Rev Food Sci Technol* 2010;1:305-39.
- Watson D, Motherway MO, Schoterman MHC, van Neerven RJJ, Nauta A, van Sinderen D. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *J Appl Microb* 2013;114:1132-46.
- Tzortzis G, Vulevic J. Galacto-oligosaccharide prebiotics. En *Prebiotics and Probiotics. Science and Technology*. Charabampopoulos D, Rastall RA (Eds.) Springer (New York). XXIV, 1265p, 2009.
- Moreno FJ, Montilla A, Villamiel M, Corzo N, Olano A. Analysis, structural characterization and bioactivity of oligosaccharides derived from lactose. *Electrophoresis* 2014;1519-34.
- Villamiel M, Montilla A, Olano A, Corzo N. Production and bioactivity of oligosaccharides derived from lactose. En *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. Moreno FJ, Sanz ML (Eds.). Wiley-Blackwell (Chichester, Reino Unido), 2014. p. 137-67.
- Cardelle-Cobas A, Villamiel M, Olano A, Corzo N. Study of galacto-oligosaccharide formation from lactose using Pectinex-Ultra SP-L. *J Sci Food Agric* 2008;88:954-61.
- Corzo-Martínez M, Copoví P, Olano A, Moreno FJ, Montilla A. Synthesis of prebiotic carbohydrates derived from cheese whey permeate by a combined process of isomerisation and transgalactosylation. *J Sci Food Agric* 2013;93:1591-97.
- Martínez-Villaluenga C, Cardelle-Cobas A, Corzo N, Olano A, Villamiel M. Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chem* 2008;107:258-64.
- Olano A, Corzo N. Lactulose as a Food ingredient. *J Sci Food Agric* 2009;89:1987-90.
- Martínez-Villaluenga C, Cardelle-Cobas A, Olano A, Corzo N, Villamiel M, Jimeno ML. Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides produced from lactulose by transgalactosylation. *J Agric Food Chem* 2008;56:557-63.
- Cardelle-Cobas A, Martínez-Villaluenga C, Villamiel M, Olano A, Corzo N. Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and Pectinex Ultra SP-L. *J Agric Food Chem* 2008;56:3328-33.
- Cardelle-Cobas A, Corzo N, Villamiel M, Olano A. Isomerization of lactose-derived oligosaccharides: A case study using sodium aluminate. *J Agric Food Chem* 2008;56:10954-59.
- Fujita K, Hara K, Hashimoto H, Kitahata S. Transfructosylation catalyzed by β -fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp. K-1. *Agric Biol Chem* 1990;54:2655-61.
- Park NH, Choi HJ, Oh DK. Lactosucrose production by various microorganisms harbouring levansucrase activity. *Biotechnol Lett* 2005;27:495-97.
- Bailey RW, Barker SA, Bourne EJ, Stacey M. Enzymic synthesis of a branched trisaccharide. *Nature*, 1955;176:1164-65.
- Splechtna B, Nguyen TH, Steinbock M, Kulbe KD, Lorenz W, Haltrich D. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem* 2006;54:4999-06.
- Albrecht S, Schols HA, Klarenbeek B, Voragen AGJ, Gruppen H. Introducing Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence (CE-LIF) as a Potential Analysis and Quantification Tool for Galactooligosaccharides Extracted from Complex Food Matrices. *J Agric Food Chem* 2010;58:2787-94.
- Montilla A, van de Lagemaat J, Olano A, del Castillo MD. Determination of oligosaccharides by conventional high-resolution gas chromatography. *Chromatographia* 2006;63:453-8.
- Ruiz-Matute AI, Corzo-Martínez M, Montilla A, Olano A, Copoví P, Corzo N. Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. *J Food Comp Anal* 2012;28:164-9.
- Díez-Municio M, Moreno FJ, Herrero M, Montilla A. Procedimiento de síntesis de kojibiosa y su aplicación en la elaboración de composiciones alimentarias y farmacéuticas. 2013; Patente Española P201331333.
- Díez-Municio M, Montilla A, Moreno FJ, Herrero M. A sustainable biotechnological process for the efficient synthesis of kojibiose. *Green Chem* 2014;16:2219-26.
- Díez-Municio M, Herrero M, Jimeno ML, Olano A, Moreno FJ. Efficient synthesis and characterization of lactulosucrose by *Leuconostoc mesenteroides* B-512F Dextranucrase. *J Agric Food Chem* 2012;60:10564-71.
- Díez-Municio M, Montilla A, Jimeno ML, Corzo N, Olano A, Moreno FJ. Synthesis and characterization of a potential prebiotic trisaccharide from cheese whey permeate and sucrose by *Leuconostoc mesenteroides* dextranucrase. *J Agric Food Chem* 2012;60:1945-53.
- Rodríguez-Colinas B, Abreu MA, Fernández-Arrojo L, Beer R, Poveda A, Jiménez-Barbero J, Haltrich D, Ballesteros AO, Fernández-Lobato M, Plou FJ. Production of Galacto-oligosaccharides by the beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. *J Agric Food Chem* 2011;59:10477-84.
- Rodríguez-Colinas B, Poveda A, Jiménez-Barbero J, Ballesteros AO, Plou F J. Galacto-oligosaccharide synthesis from lactose solution or skim milk using the beta-galactosidase from *Bacillus circulans*. *J Agric Food Chem* 2012;60:6391-8.
- Ruhaak LR, Lebrilla CB. Advances in analysis of human milk oligosaccharides. *Advan Nutr* 2012;3:406-14.
- Hernández-Hernández O, Calvillo I, Lebrón-Aguilar R, Moreno FJ, Sanz ML. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the characterization of prebiotic galactooligosaccharides. *J Chromatogr A*. 2012;1220:57-67.
- Sanz ML, Ruiz-Matute AI, Corzo N, Martínez-Castro I. Analysis of prebiotic oligosaccharides. En *Prebiotics and Probiotics. Science and Technology*. Charabampopoulos D, Rastall RA (Eds.) Springer (New York), 2009. p. 465-534.
- Moreno FJ, Carrero-Carralero C, Hernández-Hernández O, Sanz ML. Fractionation of food bioactive oligosaccharides. En

- Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. Moreno FJ, Sanz ML (Eds.), Wiley-Blackwell (Chichester, Reino Unido), 2014. p. 255-83.
35. Ruiz-Matute AI, Sanz ML, Corzo N, Martín-Alvarez PJ, Ibanez E, Martínez-Castro I, Olano A. Purification of lactulose from mixtures with lactose using pressurized liquid extraction with ethanol-water at different temperatures. *J Agric Food Chem* 2007;55:3346-50.
 36. Montañes F, Fornari T, Olano A, Ibanez E. Isolation of prebiotic carbohydrates by supercritical fluid extraction. Scaling-up and economical feasibility. *J Chromatogr A* 2012;1250:92-8.
 37. Sanz ML, Sanz J, Martínez-Castro I. Characterization of O-trimethylsilyl oximes of disaccharides by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 2002;56:617-22.
 38. Hernandez O, Ruiz-Matute AI, Olano A, Moreno FJ, Sanz ML. Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. *Int Dairy J* 2009;19:531-6.
 39. Hernandez O, Montañes F, Clemente A, Moreno FJ, Sanz ML. Characterization of galactooligosaccharides derived from lactulose. *J Chromatogr A* 2011;1218:7691-6.
 40. Anadón A, Martínez MA, Ares I, Castellano V, Martínez-Larrañaga MR, Corzo N, Olano A, Montilla A, Recio I, Martínez-Maqueada D, Miralles B, Fornari T, García-Risco MR, Gonzalez M, Reglero G. Acute and repeated dose (28 days) oral safety studies of ALIBIRD in rats. *J Food Protect* 2013;76:1226-39.
 41. Barboza M, Sela DA, Pirim C, Locascio RG, Freeman SL, German JB, Mills DA, Lebrilla CB. Glycoprofiling bifidobacterial consumption of galacto-oligosaccharides by mass spectrometry reveals strain-specific, preferential consumption of glycans. *App Environ Microbiol* 2009;75:7319-25.
 42. Bao Y, Chen C, Newburg DS. Quantification of neutral human milk oligosaccharides by graphitic carbon high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2013;433:28-35.
 43. Cilla A, Lacomba R, García-Llatas G, Alegría A. Prebiotics and nucleotides in infant nutrition; review of the evidence. *Nutrición Hospitalaria* 2012;27:1037-48.
 44. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Léotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Brit J Nutr* 2010;104:S1-63.
 45. Sangwan V, Tomar SK, Singh RR, Singh AK, Ali B. Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. *J Food Sci* 2011;76:R103-11.
 46. Barile D, Rastall RA. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Curr Opin Biotech* 2013;24:214-9.
 47. Ohtsuka K, Tsuji K, Nakagawa Y, Ueda H, Ozawa O, Uchida T, Ichikawa T. Availability of 4'-galactosylactose (O- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-O- β -D-galactopyranosyl-(1-4)-D-glucopyranose) in rat. *J Nutr Sci Vitaminol* 1990;36:265-76.
 48. Torres DPM, Gonçalves MPF, Teixeira JA., Rodrigues LR. Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2010;9:438-54.
 49. Hernández-Hernández O, Marín-Manzano MC, Rubio LA, Moreno FJ, Sanz ML, Clemente A. Monomer and linkage type of galacto-oligosaccharides affect their resistance to ileal digestion and prebiotic properties in rats. *J Nutr* 2012;142:1232-9.
 50. Cardelle-Cobas A, Corzo N, Olano A, Peláez C, Requena T, Ávila M. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. *Int J Food Microbiol* 2011;149:81-7.
 51. Cardelle-Cobas A, Fernández M, Salazar N, Martínez-Villalunga C, Villamiel M, Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Galván CG. Bifidogenic effect and stimulation of short chain fatty acid production in human faecal slurry cultures by oligosaccharides derived from lactose and lactulose. *J Dairy Res* 2009;76:317-25.
 52. Cardelle-Cobas A, Olano A, Corzo N, Villamiel M, Collins M, Kolida S, Rastall RA. In vitro fermentation of lactulose-derived oligosaccharides by mixed fecal microbiota. *J Agric Food Chem* 2012;60:2024-32.
 53. Marín-Manzano MC, Abecia L, Hernández-Hernández O, Sanz ML, Montilla A, Olano A, Rubio LA, Moreno FJ, Clemente A. Galacto-oligosaccharides derived from lactulose exert a selective stimulation on the growth of *Bifidobacterium animalis* in the large intestine of growing rats. *J Agric Food Chem* 2013;61:7560-7.
 54. Takasugi S, Ashida K, Maruyama S, Matsukiyo Y, Kaneko T, Yamaji T. A combination of a dairy product fermented by lactobacilli and galactooligosaccharides shows additive effects on mineral balances in growing rats with hypochlorhydria induced by a proton pump inhibitor. *Biol Trace Elem Res* 2013;153:309-18.
 55. Whisner CM, Martin BR, Schoterman MH, Nakatsu CH, McCabe LD, McCabe GP, Wastney ME, van den Heuvel EG, Weaver CM. Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: a double-blind cross-over trial. *Brit J Nutr* 2013;110:1292-303.
 56. Steed H, Macfarlane S. Mechanisms of prebiotic impact on health. En *Prebiotics and Probiotics. Science and Technology*. Charabampopoulos D, Rastall RA (Eds.) Springer (New York), 2009. p. 135-61.
 57. Tzortzis G, Goulas AK, Gee JM, Gibson GR. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous *in vitro* fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo*. *J Nutr* 2005;135:1726-31.
 58. Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, Hutkins RW. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infect Immun* 2006;74:6920-8.
 59. Quintero M, Maldonado M, Pérez-Muñoz ME, Jiménez R, Fangman T, Wittke A, Russell M, Hutkins R. Adherence Inhibition of *Cronobacter sakazakii* to Intestinal Epithelial Cells by Prebiotic Oligosaccharides. *Curr Microbiol* 2011;62:1448-54.
 60. Drakoularakou A, Tzortzis G, Rastall RA, Gibson GR. A double-blind, placebo-controlled, randomized human study assessing the capacity of a novel galacto-oligosaccharide mixture in reducing travellers' diarrhoea. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:146-52.
 61. Zhong Y, Cai D, Cai W, Geng S, Chen L, Han T. Protective effect of galactooligosaccharide-supplemented enteral nutrition on intestinal barrier function in rats with severe acute pancreatitis. *Clin Nutr* 2009;28:575-80.
 62. Vulevic J, Drakoularakou A, Yaqoob P, Tzortzis G, Gibson GR. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1438-46.
 63. Gori A, Rizzardini G, van't Land B, Amor KB, van Schaik J, Torti C, Quirino T, Tincati C, Bandera A, Knol J, Benlhasan-Chahour K, Trabattoni D, Bray D, Vriesema A, Welling G, Garssen J, Clerici M. Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naive HIV-infected adults: results of the "COPA" pilot randomized trial. *Mucosal Immunol* 2011;4:5:554-63.
 64. Clemente A, Hernández-Hernández O, Laparra M, Montilla A, Moreno FJ, Olano A, Ruiz L, Sanz ML, Sanz Y. Galacto-oligosacáridos derivados de lactulosa multifuncionales con actividad inmunomoduladora y prebiótica. 2011;Patente Española P201130784.

65. Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G. Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. *J Nutr* 2007;137:2420-4.
66. Arslanoglu S, Moro GE, Schmitt J, Tandoi L, Rizzardi S, Boehm G. Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life. *J Nutr* 2008;138:1091-5.
67. Grüber C, van Stuijvenberg M, Mosca F, Moro G, Chirico G, Braegger CP, Riedler J, Boehm G, Wahn U. Reduced occurrence of early atopic dermatitis because of immunoreactive prebiotics among low-atopy-risk infants. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:791-7.
68. Overduin J, Schoterman MHC, Calame W, Schonewille AJ, Ten Bruggencate SJM. Dietary galacto-oligosaccharides and calcium: effects on energy intake, fat-pad weight and satiety-related, gastrointestinal hormones in rats. *British J Nutr* 2013;109:1338-48.
69. Vulevic J, Juric A, Tzorzis G, Gibson G. Mixture of trans-Galactooligosaccharides Reduces Markers of Metabolic Syndrome and Modulates the Fecal Microbiota and Immune Function of Overweight Adults. *J Nutr* 2013;143:324-31.
70. Lamsal BP. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *J Sci Food Agric* 2012;92:2020-8.
71. Roberfroid M, Slavin J. Nondigestible oligosaccharides: *Crit Rev Food Sci Nutr* 2000;40:461-80.
72. Crittenden RG, Playne MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Tech* 1996;7:353-61.
73. Van Leusen E, Torringa E, Groenink P, Kortleve P, Geene R, Schoterman M, Klarenbeek B. Industrial applications of galactooligosaccharides. En *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. Moreno FJ, Sanz ML (Eds.), Wiley-Blackwell (Chichester, Reino Unido), 2014. p. 470-91.