

CIAL



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



*Instituto de Investigación en Ciencias de la
Alimentación*

**CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS
LÁCTEOS**

**"CARBOHIDRATOS PREBIÓTICOS DE ORIGEN LÁCTEO.
DESARROLLO Y APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA"**

**Instituto de Investigación en Ciencias
de la Alimentación**

Madrid, 7-18 Mayo 2012



CIAL



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

Química y Funcionalidad de Carbohidratos y Derivados Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos

Agustín Olano Villén
Nieves Corzo Sánchez
Mar Villamiel Guerra
Fco. Javier Moreno Andújar
Antonia Montilla Corredera

Ana Isabel Ruiz Matute
Juliana Gamboa Santos
Marina Diez Municio
Roberto Megías Pérez





CARBOHIDRATOS PREBIÓTICOS

CARBOHIDRATOS PREBIÓTICOS de ORIGEN LÁCTEO:

**I. EFECTOS SOBRE LA FLORA INTESTINAL Y LA
FISIOLOGÍA DEL HUÉSPED**

II. EN LA ALIMENTACIÓN. PRESENTE Y FUTURO

*Antonia Montilla Corredera
Instituto de Investigación en Ciencias
de la Alimentación*



**NUEVOS ESTILOS
DE VIDA**



**ABANDONO DE HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN
SALUDABLES**



**DESEQUILIBRIOS Y DESAJUSTES
ALIMENTARIOS**



APARICIÓN DE ENFERMEDADES



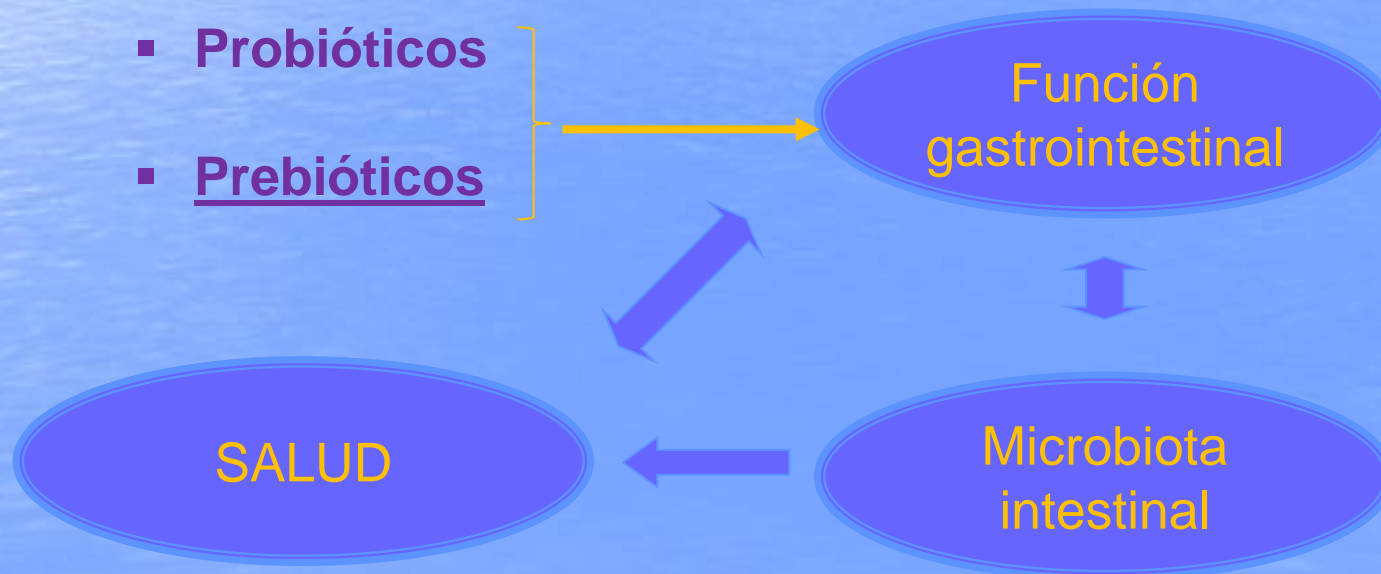
ALIMENTOS FUNCIONALES



“Afectan beneficiosamente a una o más funciones del organismo mejorando el estado de bienestar o reduciendo el riesgo de enfermedad”

Gran variedad de ingredientes:

- Fitoquímicos
- Ácidos grasos poliinsaturados
- Péptidos/proteínas bioactivas
- Probióticos
- Prebióticos





MICROBIOTA INTESTINAL

Existe una clara evidencia de que la **composición y efectos** metabólicos de la **microflora** gastrointestinal (intestino grueso) son de importancia clave para la **salud** humana

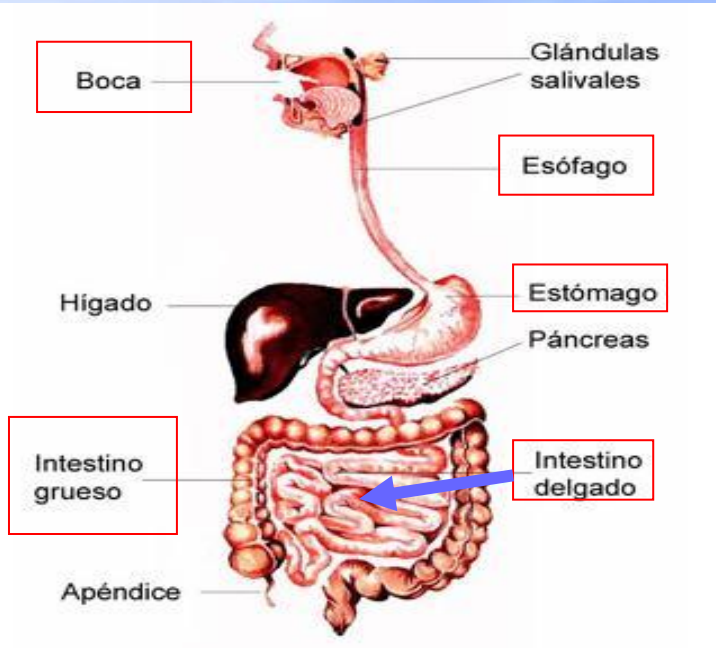


TRACTO GASTROINTESTINAL



Importantes funciones biológicas:

- Mejora la biodisponibilidad de nutrientes
- Absorción y secreción de electrolitos y agua
- Degradación de compuestos no digeribles
- Almacenamiento y excreción de materiales de desecho (perjudiciales y antinutrientes)



ÚLTIMOS AÑOS:



Funciones colónicas que afectan a la salud y nutrición.



MICROBIOTA INTESTINAL



Recuperación de la **energía** de los sustratos que no se han digerido en el intestino delgado mediante fermentación



Distribución y composición de las diferentes especies bacterianas en el tracto gastrointestinal

El ecosistema va variando en cada tramo del aparato gastrointestinal:

- En número
- En composición de especies

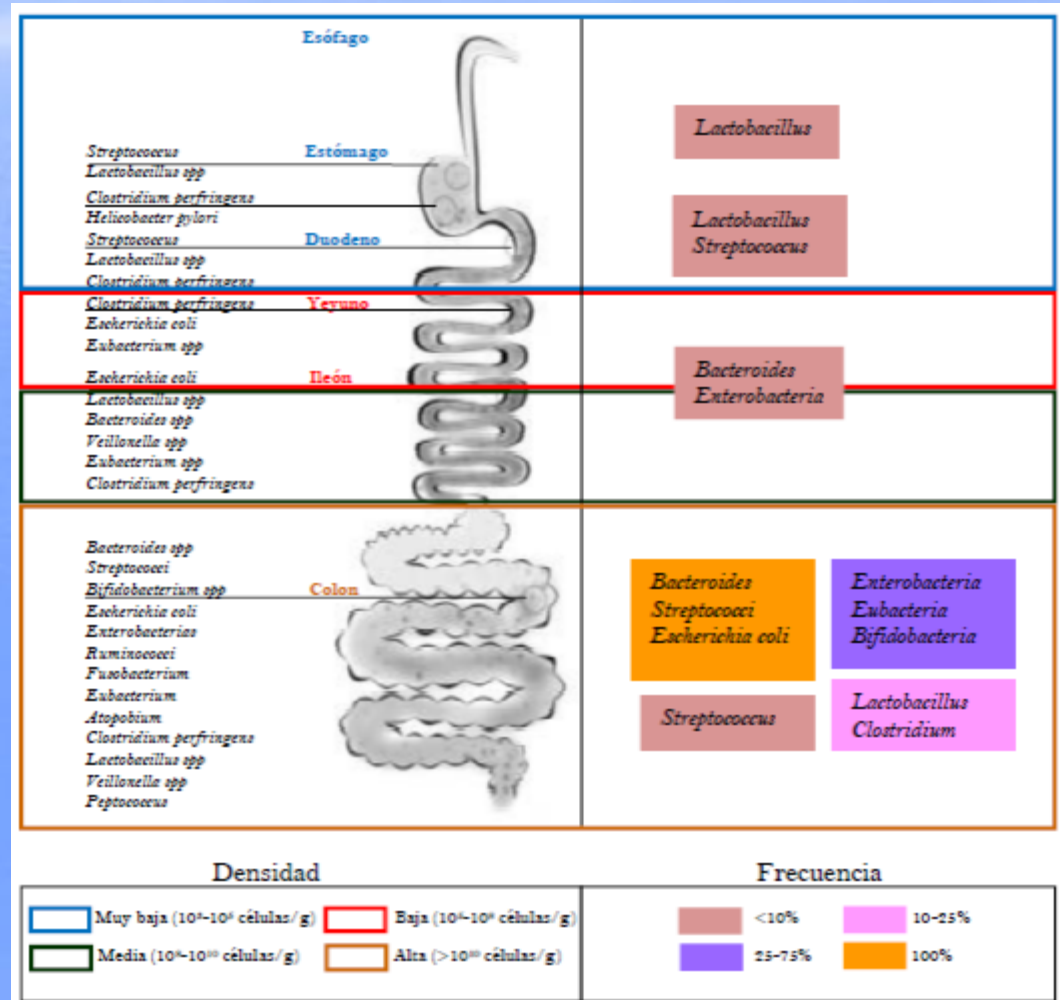
- **Colon:**

- 50 géneros,
- 500-1000 especies
- $10^{11} - 10^{12}$ ufc/g

- **Dominante:** bacteroides, bifidobacterias, eubacterias, peptoestreptococos

- **Secundaria:** streptococos, lactobacillus, enterococos, clostridia, bacillus y levaduras

< densidad



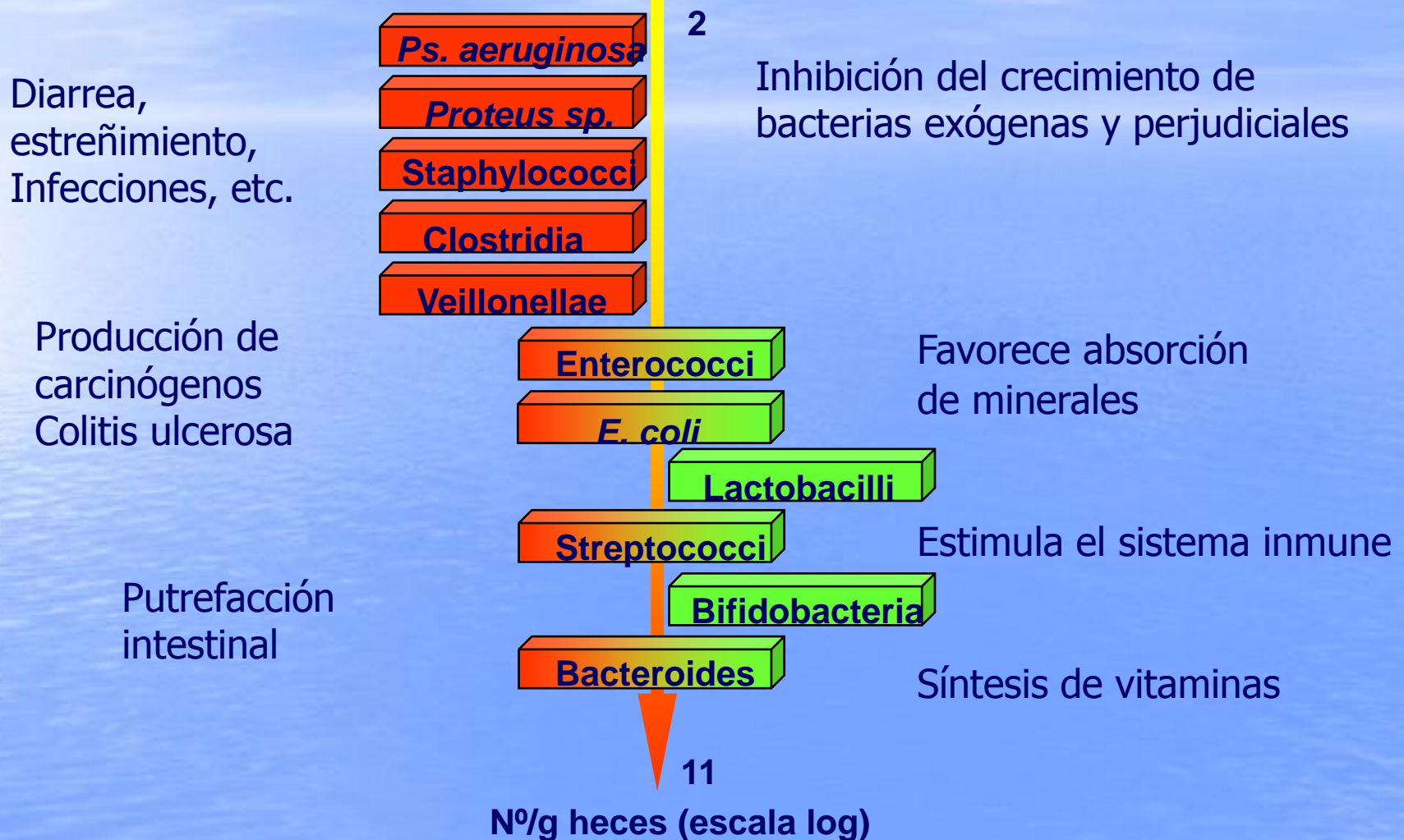
> densidad



COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL

EFFECTOS PERJUDICIALES

EFFECTOS BENEFICIOSOS



ACTIVIDADES COMBINADAS



COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL

- Flora gastrointestinal:
 - Microorganismos **patógenos o beneficiosos** (comensalismo o simbiosis) según su relación con el huésped
 - Se establecen múltiples interacciones
- Intestino grueso → órgano metabólicamente muy activo
- Un balance adecuado en el ecosistema es fundamental para nuestro organismo
- Estado de '**normobiosis**' → en el "ecosistema" intestinal los microorganismos potencialmente beneficios predominan
 - Géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*; en estudio: *Eubacterium*, *Faecalibacterium* y *Roseburia*.
- Estado de '**disbiosis**' → dominan microorganismos potencialmente dañinos, creando una situación propensa a la enfermedad
 - Bacterias indeseables: géneros *Clostridia* y *Veionella*



Tracto gastrointestinal del recién nacido

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación



- Microorganismos de la **vagina** y heces de la madre: bacteroides, bifidobacterias
- Diferente en niños nacidos con **cesárea**: enterobacterias, retraso colonización
- Medio ambiente
- Tipo de lactancia
 - Materna: bacteroides, **bifidobacterias y lactobacilos**
 - Fórmulas infantiles: bacteroides, **enterobacterias**, bifidobacterias, clostridios y estreptococos
- Después del destete semejante a la del adulto



Tracto gastrointestinal del recién nacido



Posibles causas del aumento de bifidobacterias en lactantes de leche materna:

- Composición en carbohidratos y particularmente **oligosacáridos**
 - Tercer constituyente (8-12 g/L)
 - 130 compuestos diferentes
- Ciertos constituyentes tales como **lactoferrina** y lípidos que pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos



Evolución de la flora gastrointestinal

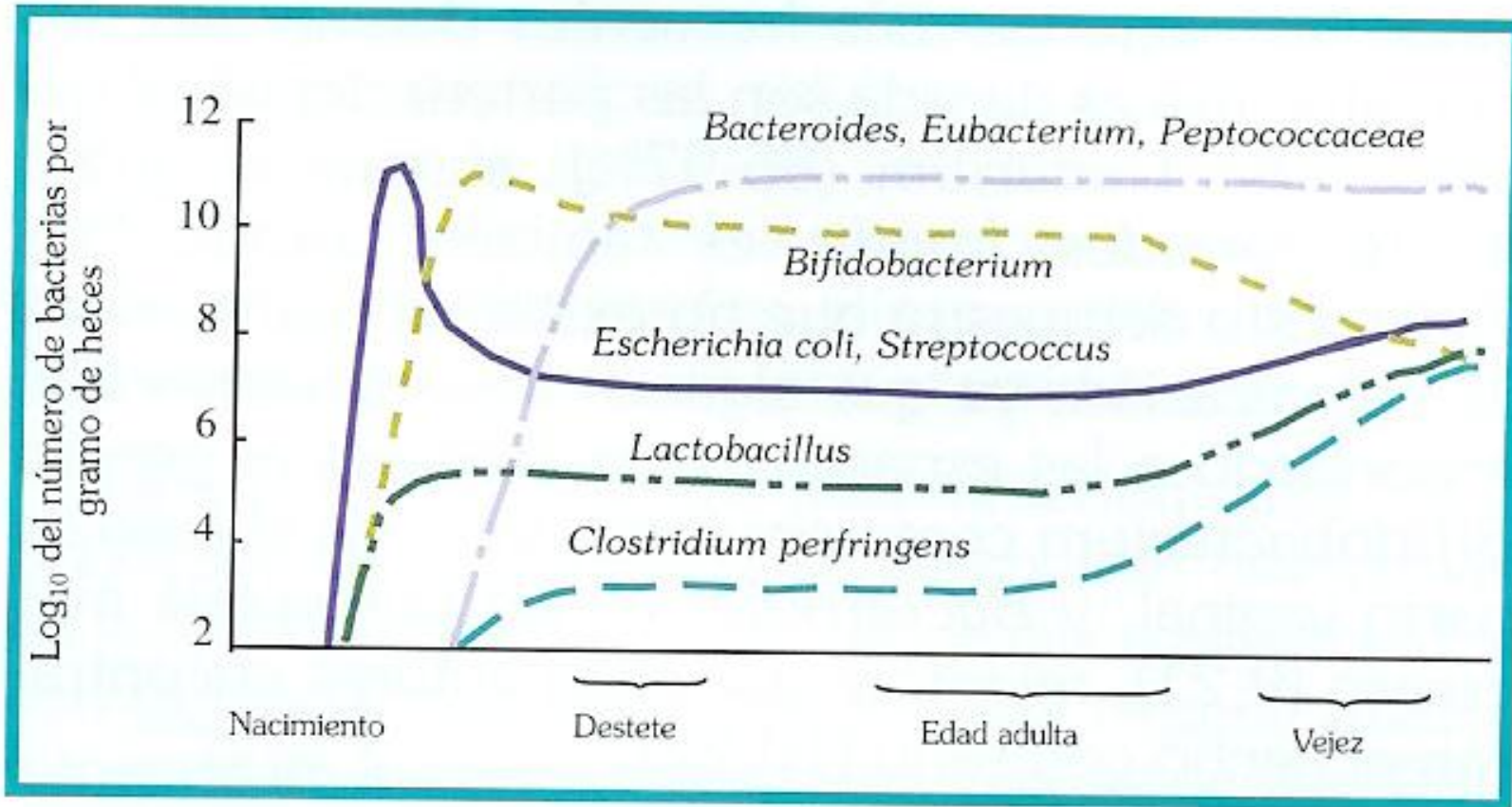


Fig. 1. Cambios de la flora intestinal desde el nacimiento hasta la vejez (Mitsuoka, 1984).

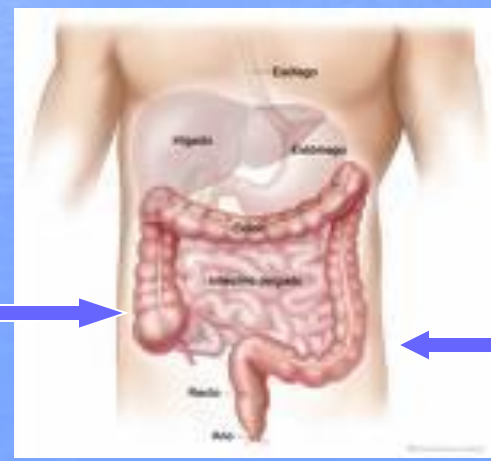


Variaciones en la composición de la flora intestinal dependiendo de la zona

- ✦ La mayor parte de estudios se han realizado en **heces**
- ✦ Existen **diferencias** significativas
 - Entre el lumen y la mucosa
 - Entre las diferentes partes del colon

Colon **ascendente**:

- Mayor disponibilidad de sustrato
- Bajo pH (AGCC y lactato)
- Tránsito rápido
- Más sacarolítico



Colon **descendente**:

- Menor concentración de sustrato
- pH neutro
- Crecimiento bacteriano más lento
- Más proteolítico



MICROBIOTA INTESTINAL: METABOLISMO



Principales sustratos fermentables en el intestino adulto

-**Carbohidratos y/o derivados:** fibra dietética, almidones resistentes, **oligosacáridos**, edulcorantes alimentarios (polialcoholes) y otros azúcares no absorbibles

-**Compuestos nitrogenados:** proteínas (elastina, colágeno y albúmina; proteínas bacterianas liberadas en la lisis celular) y aminoácidos

Secreciones pancreáticas, bacterianas, productos de lisis, desechos de células epiteliales y mucinas

Disponibilidad diaria total del sustrato en el colon adulto:
20-30 g carbohidratos y 5-25 g de proteína



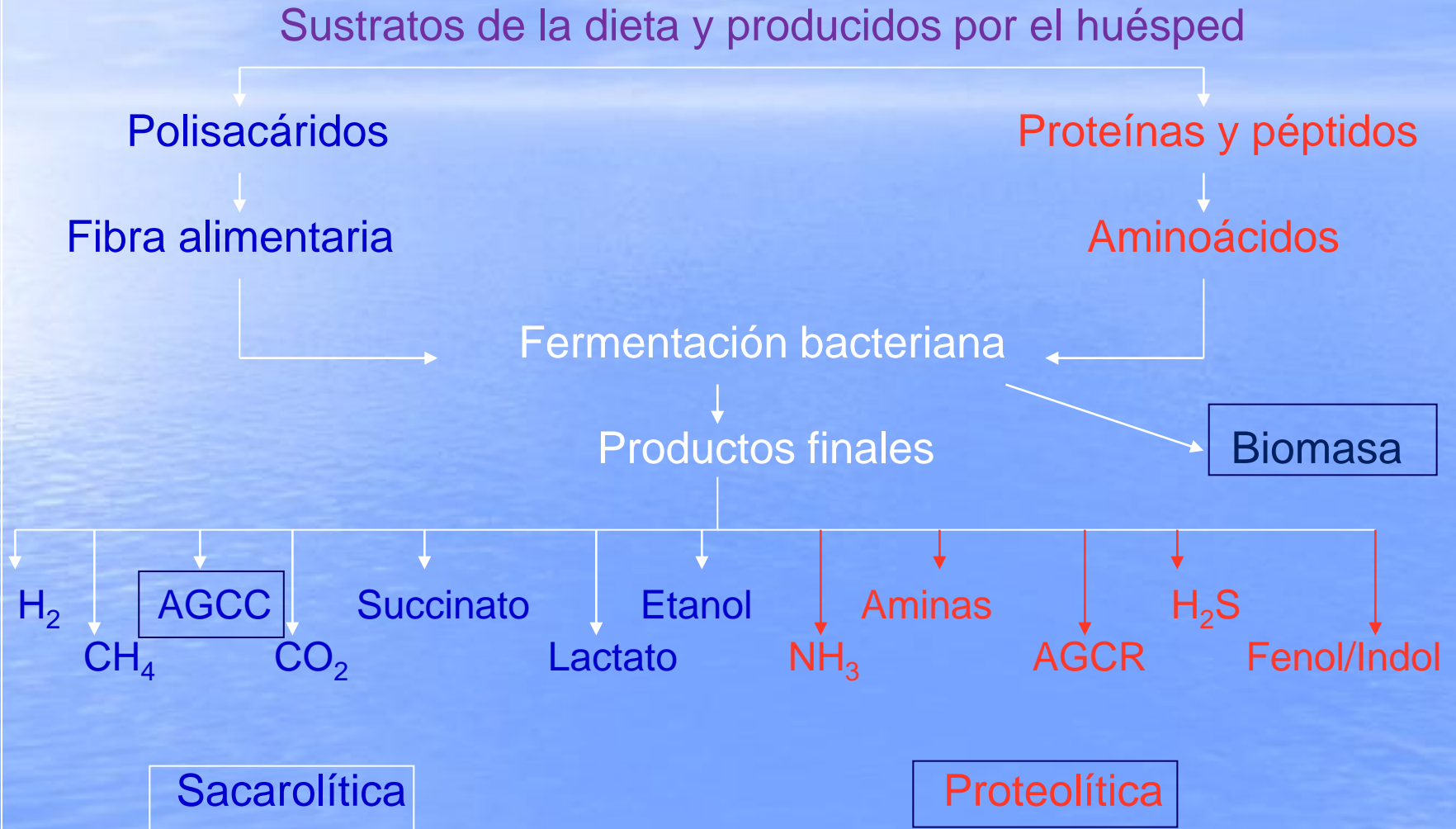
Factores que afectan a la fermentación bacteriana en el intestino grueso (*Gibson y col., 2000*)

- Composición química del sustrato
- Cantidad de sustrato disponible para la fermentación
- Forma física del sustrato
- Tiempo del tránsito en el colon
- Composición de la flora bacteriana: diversidad en las especies y número relativo de los diferentes tipos de bacterias
- Interacciones competitivas y cooperativas entre bacterias
- Velocidad de despolimerización del sustrato
- Especificidad del sustrato
- Estrategias de fermentación de los sustratos por las bacterias
- pH
- Uso de antibióticos



El metabolismo en el intestino grueso

(Gibson y Roberfroid, 1995)



HUESPED: Absorción o metabolismo / Excreción: respiración, heces, orina



Fermentación y ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

- **Acetato, Propionato, Butirato**, Succinato, Formiato, Valerato, Caproato, **Lactato**
- La proporción entre ellos depende del sustrato (40-60 g/100g), 0.3-0.5 mol/día
- Se absorben y estimulan la absorción de sales y agua
- Son metabolizados por las células epiteliales del colon, hígado o músculo
- No aparecen trazas en orina
- Aparecen pequeñas cantidades en heces



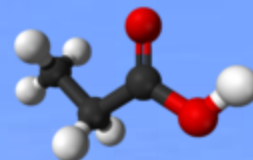
Fermentación y AGCC

ACETATO

- * Principal AGCC producido en el intestino, **pectinas**
- * Metabolizado en el **músculo**
- * Vía principal del organismo para utilizar la **energía** de los carbohidratos no digeridos
- * Puede actuar como lipogénico y **colesterolémico** en el hígado

PROPIONATO

- * **Arabinogalactanos** y gomas
- * Eliminado en el hígado
- * Podría actuar inhibiendo la **lipogénesis**
- * *In vitro*, **inhibe** la utilización de acetato en la síntesis del **colesterol**
- * En ratas y cerdos su suplementación reduce niveles de colesterol en sangre
- * En humanos, no evidencias de su efecto sobre el colesterol
- * Disminución de lípidos en sangre

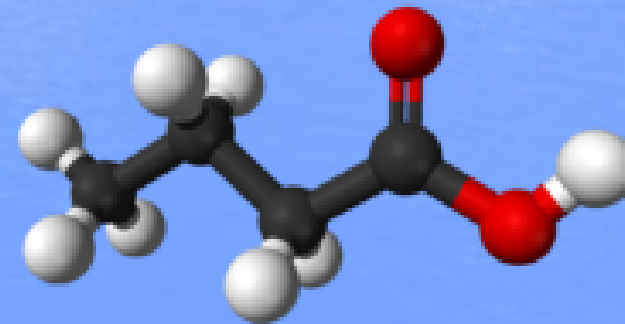




Fermentación y AGCC

BUTIRATO

- * Almidones
- * Efecto trófico
- * Se consume en su totalidad en el **epitelio intestinal**
- * Fuente de **energía** de las células epiteliales
- * Regula la **apoptosis**, el crecimiento y la diferenciación celular
- * Puede proteger frente al **cáncer** colon → apoptosis
- * En **colitis** ulcerosa → defecto en el metabolismo del butirato



LACTATO

- *Reducción pH
- *Control del crecimiento microbiano
- *Mejora la absorción de Ca, Mg, Fe



- **Fermentación sacarolítica:**
 - **AGCC:** Son **absorbidos** en el colon
 - Estimulan la absorción de **cationes y agua**
 - Son metabolizados por las células epiteliales del **colon, el hígado y el músculo**
 - No aparecen en orina y pequeñas cantidades en heces.
 - **Efecto trófico** sobre el epitelio intestinal y el **intestino delgado** (*pacientes con nutrición parenteral*). > butirato y < propionato.
 - **Gases:** $H_2 \rightarrow CH_4$ y $CO_2 \rightarrow$ respiración y flatos.
 - Producción rápida \rightarrow desventaja sustratos fermentables.
- **Fermentación proteolítica:**
 - Productos: aminas, amonio, fenoles, cresoles \rightarrow perjudiciales



Actividades enzimáticas bacterianas perjudiciales para la salud:

β -glucuronidasa: conjugados del **ácido glucurónico** → carcinógenos

Azoreductasas: sustratos nitrogenados → **aminas** tóxicas

Nitratorreductasa: genera iones **nitrito** de gran toxicidad.

Otros metabolitos: amonio, fenoles y cresoles

Bifidobacterias y lactobacilos

No producen cantidades significativas de dichas enzimas

Fermentación sacarolítica

Síntesis de vitaminas: K y del grupo B

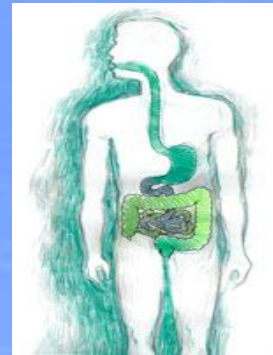
Organismos beneficiosos o **bacterias probióticas**

Flora intestinal saludable: previene la invasión de patógenos



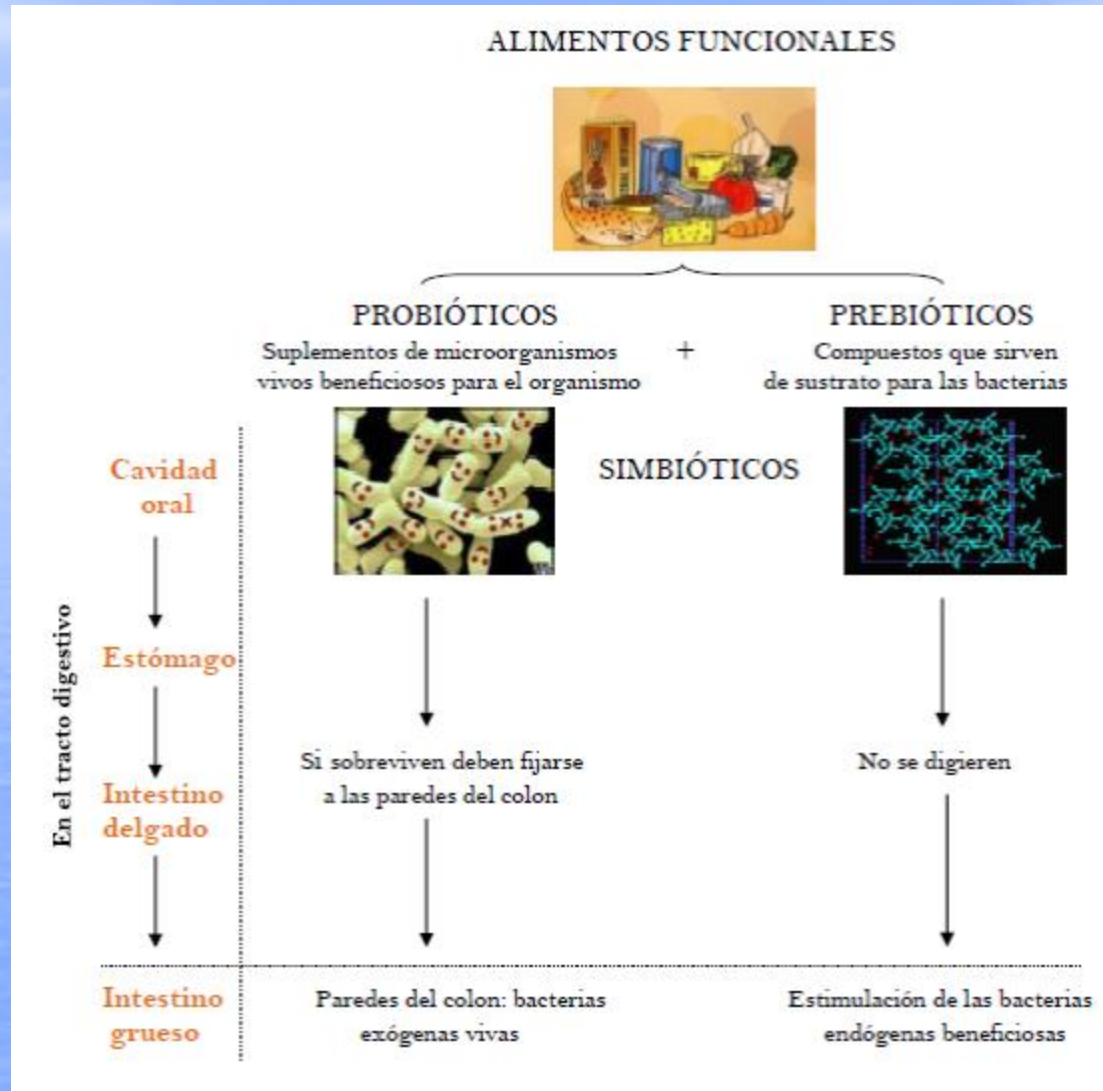
El concepto de flora saludable

- Desde **Metchnikoff** → bacterias intestinales beneficiosas y perjudiciales.
- Bacterias **perjudiciales**:
 - Costridios, bacterias reductoras de sulfato...
 - Causan diarrea, invasión de la mucosa y activación de carcinógenos. Fermentación proteolítica
- Bacterias potencialmente **saludables**:
 - Bifidobacterias y lactobacilos.
 - Protegen de infecciones, protegen la barrera intestinal y estimulan el sistema inmune. Actúan en **simbiosis** con el organismo mediante la fermentación sacarolítica
- El tracto gastrointestinal humano, especialmente el colon, constituye un **COMPLEJO ECOSISTEMA BACTERIANO** con cientos de especies beneficiosas y patógenas.
- Es preciso mantener un **BALANCE ADECUADO.**





Probióticos y prebióticos



Principales diferencias entre probióticos y prebióticos.



Probióticos, prebióticos y simbióticos

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

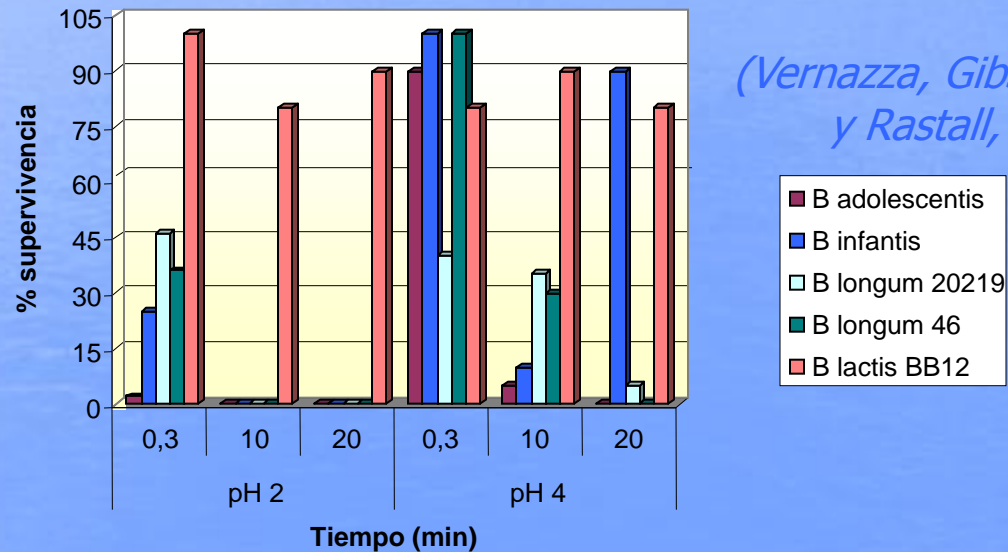
Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

PROBIÓTICOS: son microorganismos vivos que, en cantidad suficiente, poseen efectos benéficos superando los efectos de la simple nutrición.

(Teitelbaum y Walker, 2002; Tuohy y col. 2003)

Existen dudas sobre su **supervivencia** y del tiempo que pueden permanecer activos en el colon, al no formar parte de la microflora asociada al epitelio

Supervivencia de bifidobacterias / pH



*(Vernazza, Gibson
y Rastall, 2006)*

PREBIÓTICOS: promueven el crecimiento selectivo de bacterias endógenas

SIMBIÓTICOS: promueven la supervivencia de los probióticos y el crecimiento selectivo de bacterias endógenas



Flora intestinal, uso de prebióticos

- **Prebióticos, ventajas:**

- Estimulan *in situ* el desarrollo de **bacterias endógenas**, asociadas a la pared intestinal y no sólo del lumen
- Activan el metabolismo bacteriano
- Ejercen efectos fisiológicos propios
- Son seguros
- Se pueden utilizar como ingredientes en gran variedad de alimentos
- Baratos
- Características sensoriales

*(Gopal, Prasad y Gill 2003;
Bakker-Zierikzee y col. 2005)*





CARBOHIDRATOS PREBIÓTICOS



DEFINICIÓN DE PREBIÓTICO

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

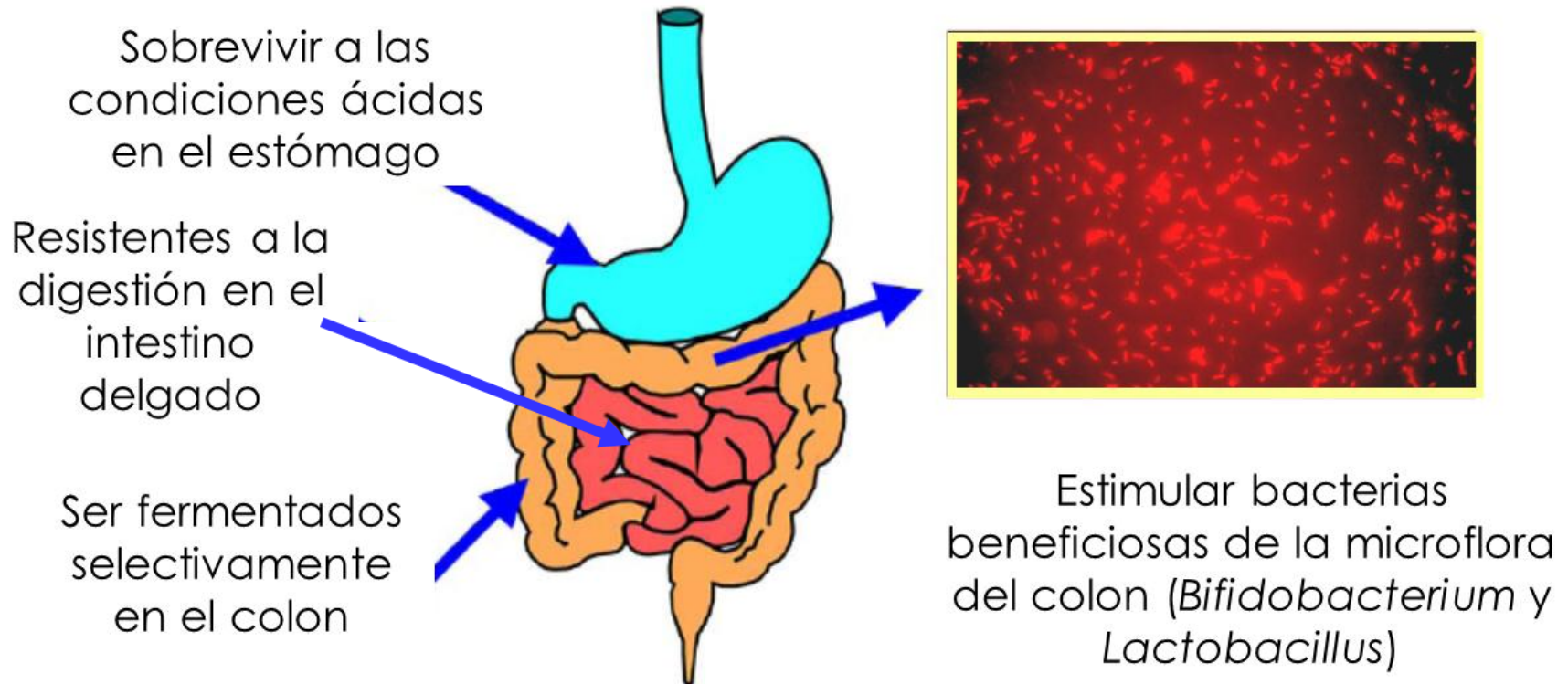
*"Un ingrediente alimentario **no digerible** que es capaz de alcanzar el colon sin ser hidrolizado o absorbido en la parte más alta del tracto gastrointestinal. Su aspecto clave reside en su **selectividad** para promover el crecimiento de bacterias beneficiosas tales como bifidobacterias y lactobacilos a expensas de otras indeseables tales como clostridia"* (Gibson y Roberfroid, 1995)

*"Un ingrediente que, al ser fermentado selectivamente, da lugar a cambios específicos tanto en la **composición** como en la **actividad** de la microflora intestinal confiriendo beneficios tanto en la salud como en el bienestar del individuo"* (Gibson y col., 2004)

*"El **efecto prebiótico** identifica o hace referencia a los cambios selectivos en la composición de la microbiota intestinal, así como a determinados efectos fisiológicos, tanto en modelos experimentales y en estudios de intervención humana".* (Roberfroid y col., 2010)



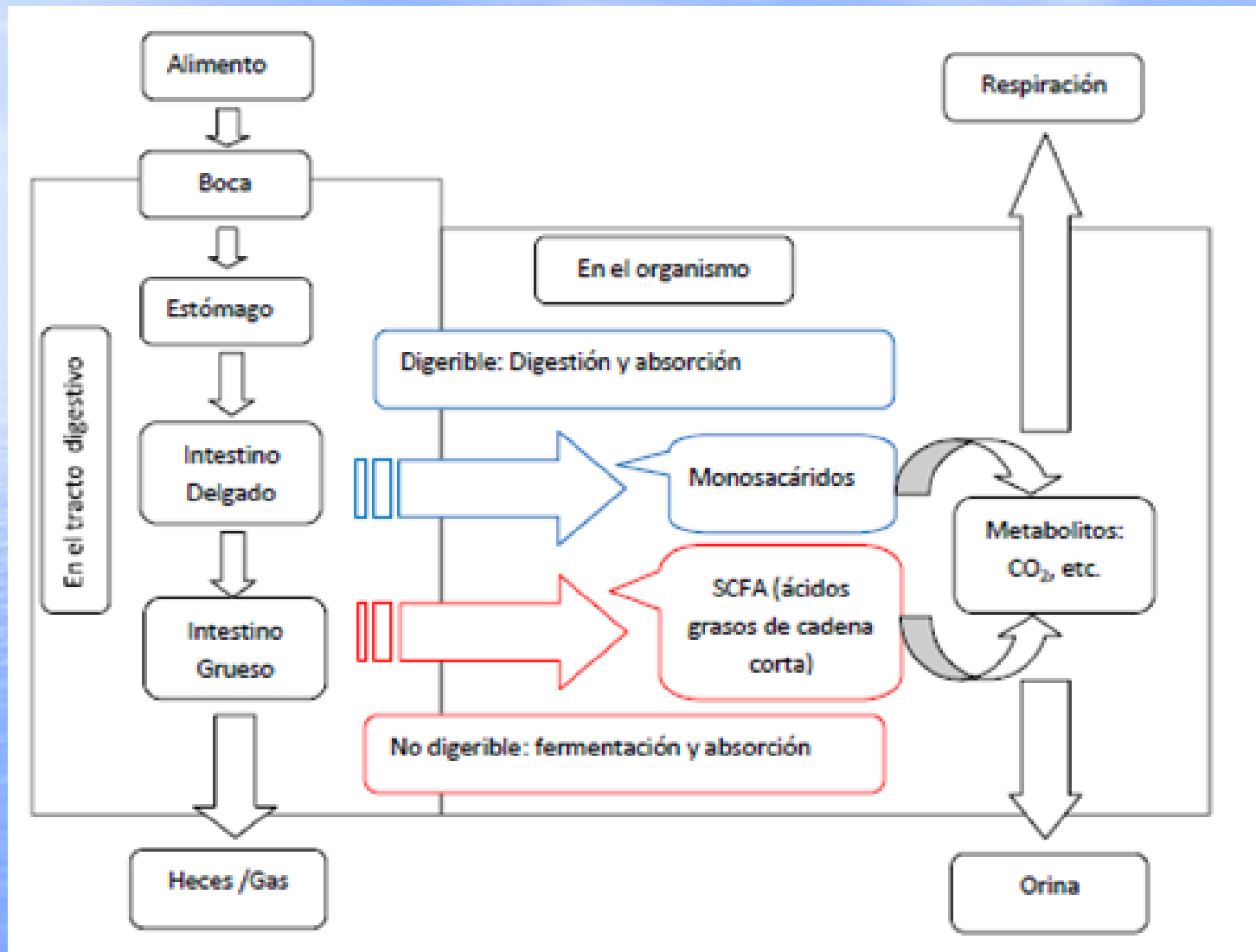
CONDICIONES QUE HAN DE CUMPLIR LOS INGREDIENTES PARA SER CONSIDERADOS PREBIÓTICOS





Esquema de las principales diferencias en las vías metabólicas de oligosacáridos digeribles y no digeribles

(Hirayama, 2002)





Carbohidratos: alimentos colónicos o prebióticos

CARBOHIDRATOS NO DIGERIBLES	Ingrediente/alimento colónico	Prebiótico
Almidón resistente	Sí	No
Polisacáridos (no almidones)		
-Polisacáridos estructurales	Sí	No
-Hemicelulosas	Sí	No
-Pectinas	Sí	No
-Gomas	Sí	No
Oligosacáridos no digeribles:		
-Fructooligosacáridos (FOS)	Sí	Sí
-Galactooligosacáridos (GOS)	Sí	Sí
-Lactulosa	Sí	Sí
-Oligosacáridos de la soja	Sí	?
-Glucooligosacáridos	Sí	No
-Arabinoooligosacáridos	Sí	?



Oligosacáridos como prebióticos

- GRADO DE POLIMERIZACIÓN (GP):
 - 3-10 (IUB-IUPAC)
 - 2-20 (British Nutrition Foundation)

- CLASIFICACIÓN FISIOLÓGICA :
 - Digeribles
 - No digeribles

- VELOCIDAD DE FERMENTACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS
 - Enlace glicosídico
 - Grado de ramificación
 - Monómeros constituyentes
 - Relación sustrato-bacteria
 - Productos de fermentación

Componentes naturales



Oligosacáridos bifidogénicos en industria alimentaria

OLIGOSACARIDO	SUSTRATO	PROCESO QUÍMICO O ENZIMÁTICO
β-galacto-oligosacáridos	Lactosa (Glu-Gal)	β-1,6-galactosidasa (EC3.2.1.23)
Lactulosa	Lactosa	Alcali
Lactosacarosa	Lactosa y Sacarosa	β-fructo-furanosidasa (EC 3.2.1.26)
Oligosacáridos de palatinosa	Sacarosa (Glu-Fruc)	Sintetasa de isomaltulosa (EC5.4.99.11)
Fructo-oligosacaridos	Sacarosa	β-fructo-furanosidasa (EC 3.2.1.26 y β-fructosil-transferasa (EC 2.4.1.9)
	Inulina (Glu-Fruc _n)	Inulinasa (EC 3.2.1.7)
Isomalto-oligosacaridos	Almidón (α-Gluc _n)	α-amilasa (EC3.2.1.1.), α-amilasa (EC3.2.1.2 y α-glucosidasa (EC 3.2.1.20)
Gentio-oligosacaridos	Almidón	Hidrólisis ácida o enzimática y transglucosilación
Xilo-oligosacaridos	Xilano (β-Xil _n)	β-1,4-endo-xilanasa (EC3.2.1.8)
α-galacto-oligosacaridos	Soya	Solubilización directa



Resumen general de obtención de oligosacáridos

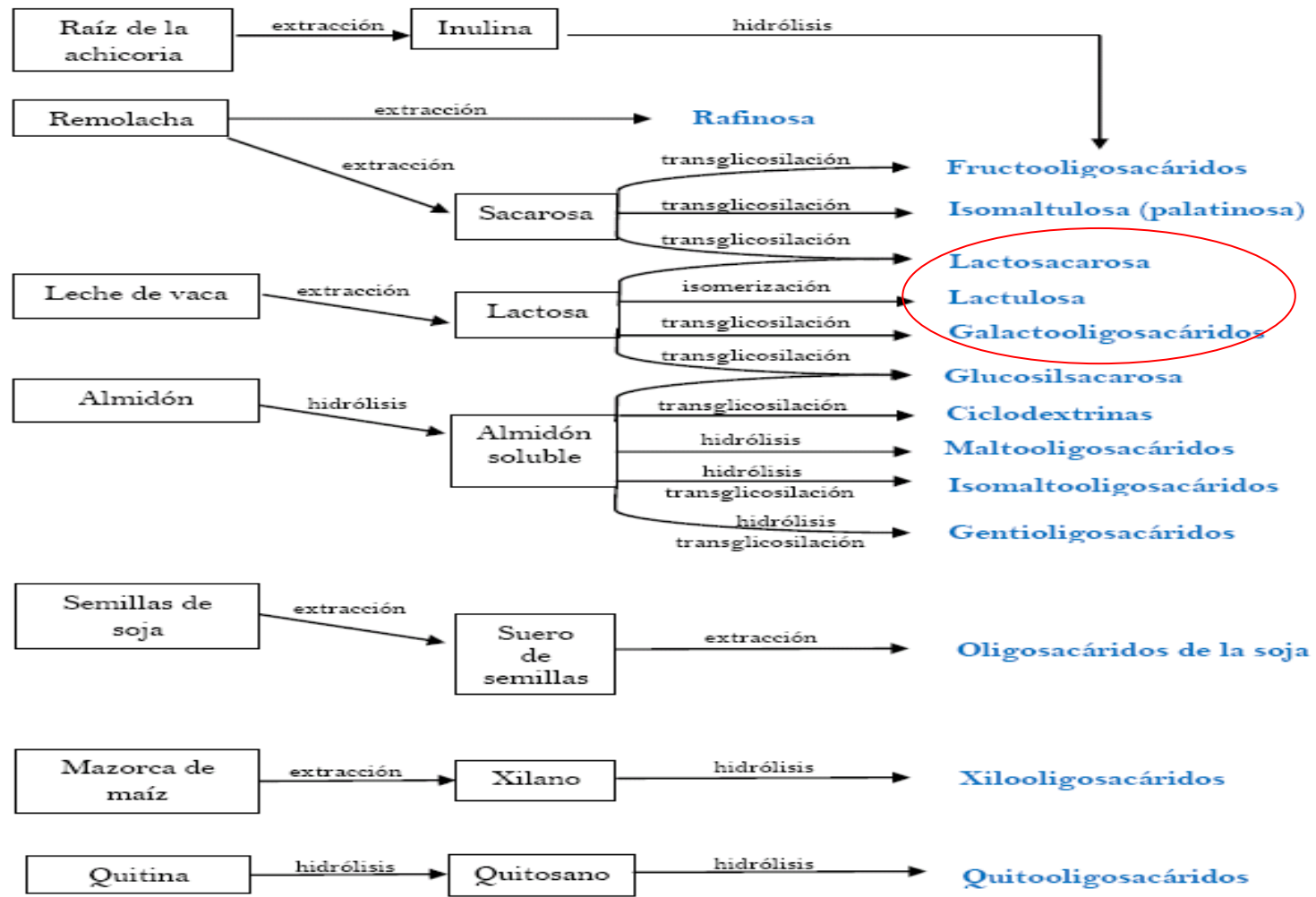


Figura 17.- Representación esquemática de la producción de los oligosacáridos no digeribles (Sako y col., 1999, modificado)



Obtención de carbohidratos prebióticos

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

- **Extracción** con agua caliente de materias primas de origen vegetal (inulina de achicoria o pataca, SOS de soja)
- **Hidrólisis enzimática** parcial de oligo- o polisacáridos → FOS o XOS
- **Síntesis enzimática** mediante glicosidasas → FOS, GOS, lactulosa
- **Isomerización química** → lactulosa
- Obtención:
 - Sistemas discontinuos o continuos, inmovilizando el enzima o utilizando reactores de membrana.
 - Medio con agua y solventes orgánicos.
- Purificación:
 - Métodos enzimáticos
 - Fraccionamiento.
- Rendimientos: enzima, concentración de sustrato, condiciones de reacción (pH, T, soporte, etc.).



Propiedades fisicoquímicas de los oligosacáridos no digeribles

- **Menor poder edulcorante** que la sacarosa (0.3-0.6 veces), según estructura y GP
- Modifican la **viscosidad** , mejorando el cuerpo y la palatabilidad, espesantes
- Solubles y muy **estables**, dependiendo de la composición y estructura
- Modifica el punto de **congelación** de los alimentos
- Modificar el color de los alimentos, son más estables a la reacción de **Maillard**, **no pierden actividad**
- Actúan como **humectantes, emulsificantes y gelificantes**
- Propiedades bacteriostáticas, agentes **anticaries**
- Bajo contenido en **calorías** (40-50% de la sacarosa), apropiado para **diabéticos**
- No son productos puros, son **mezclas** de oligosacáridos con distintos GP, conteniendo además mono- y disacáridos
- Existen en el mercado mundial cerca de 20 tipos de oligosacáridos no digeribles

Propiedades similares o mejores que las de las **fibras dietéticas**



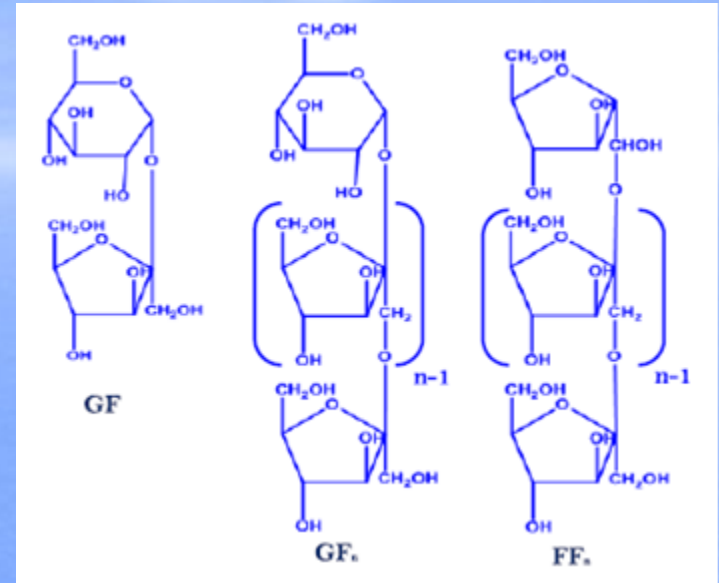
PRINCIPALES PREBIÓTICOS



Inulina y fructooligosacáridos (FOS)



Cichorium intybus



- **Inulina** → GP < 60
 - **FOS** → GP 2-8
 - Extracción con agua caliente (fructosiltransferasas en plantas) → **GF_n**
 - Hidrólisis enzimática de inulina (fructosidasas) → **GF_n** ó **FF_n**
 - Transfructosilación enzimática de la sacarosa (β-fructosidasas) → **GF_n**
- Ingredientes alimentarios naturales reconocidos como seguros:**
- GRAS (Generally Recognised As Safe): USA
 - FOSHU (Food of Specific Health Use): Japón

Contenido en inulina y oligofruktosa de diversos productos

Producto	Inulina (%)	Oligofruktosa (%)
Cebolla	2-6	2-6
Pataca	16-20	16-20
Achicoria	15-20	5-10
Espárrago	1-30	1-20
Puerro	3-10	2-5
Ajo	9-16	3-6
Alcachofa	3-10	<1
Plátano	0.3-0.7	0.3-0.7
Trigo	1-4	1-4
Centeno	0.5-1	0.5-1
Cebada	0.5-1.5	0.5-1.5
Diente de León	12-15	n.d.

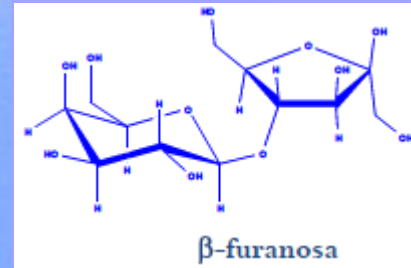
Gibson y col., 1994



LACTULOSA

SE CONOCE SU EFECTO BIFIDOGÉNICO DESDE HACE MÁS
DE CINCUENTA AÑOS

β -DGal(1 \rightarrow 4)-D-Fru



No es hidrolizada por las enzimas del TGI
(muy baja absorción parte alta del TGI)

SI ES METABOLIZADA POR BACTERIAS LÁCTICAS

PRIMER OLIGOSACÁRIDO COMERCIALIZADO POR SUS BENEFICOS
SOBRE EL TGI

Utilizada para el tratamiento del estreñimiento crónico y la
encefalopatía hepática



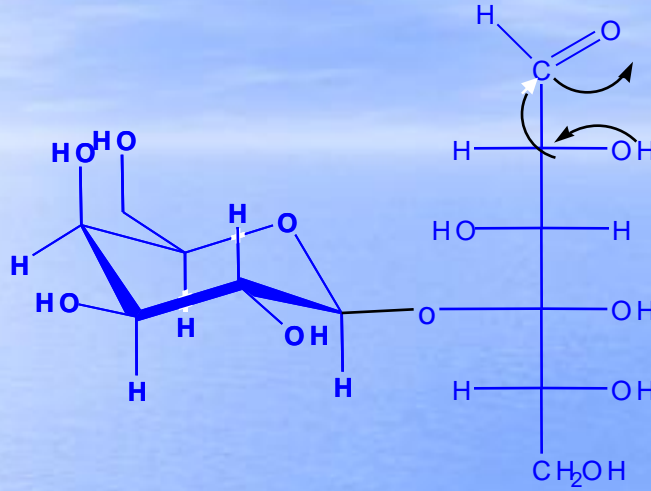
Lactulosa

- No se encuentra libre en la naturaleza
- Se obtiene a partir de lactosa mediante **isomerización** en medio básico
- Rendimientos con hidróxidos 20-30%
- Dificultad: **purificación** ya que parte de la lactulosa se degrada a compuestos de bajo peso molecular que posteriormente se polimerizan (purificación con decolorantes, resinas de intercambio iónico...)
- Con **boratos** o **aluminatos** como catalizadores aumenta el rendimiento (**80%**) y se evita la degradación al formar complejos estables con la lactulosa. Pero es difícil la **eliminación** del catalizador
- Más dulce y más soluble que la lactosa



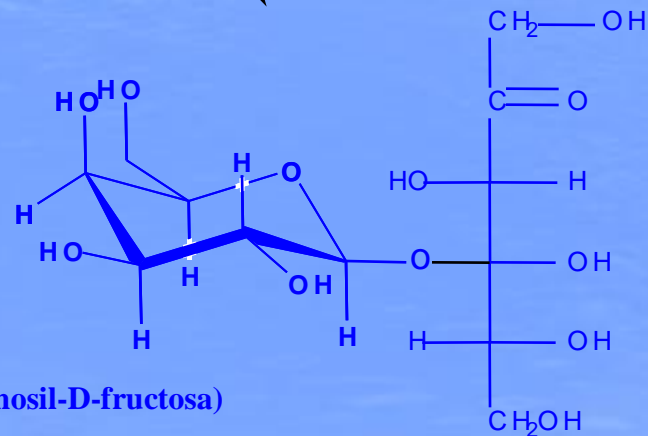


Isomerización de la lactosa



LACTOSA (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucosa)

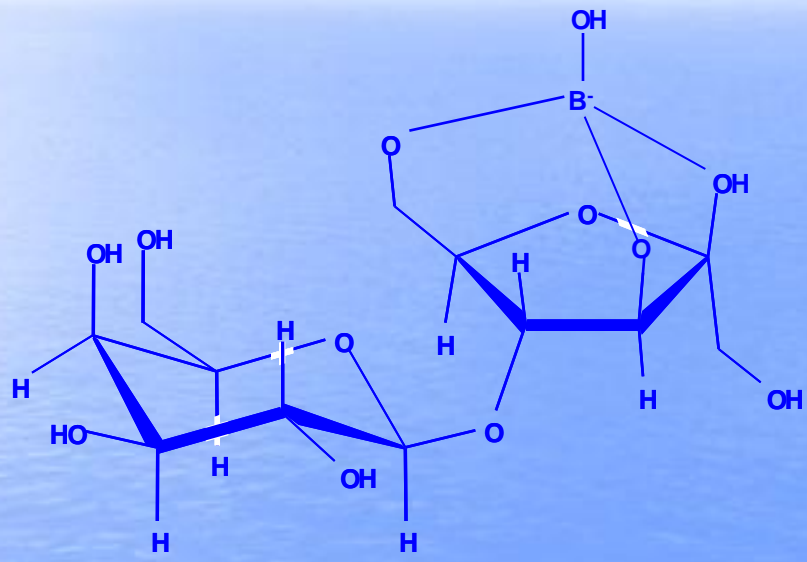
Montgomery y Hudson en 1930



LACTULOSA (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructosa)



Isomerización de la lactosa con boratos o aluminatos



Complejo de la lactulosa con iones borato

- Síntesis enzimática: β -galactosidasa de: *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus oryzae* \rightarrow Relación molar lactosa/fructosa 1/8, rto máximo 28% respecto a la lactosa inicial (Guerrero y col., 2011)



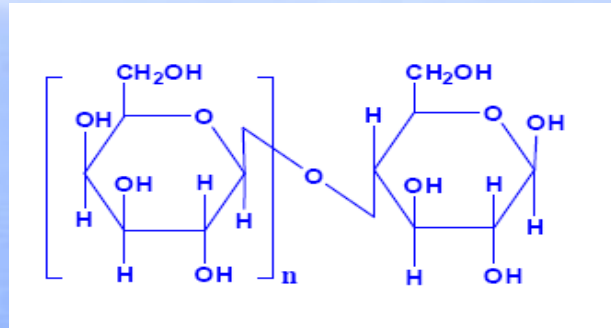
GALACTOOLIGOSACÁRIDOS (GOS)

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

→ Mezclas de oligosacáridos obtenidos a partir de LACTOSA por **transgalactosilación enzimática** catalizada por β -galactosidasas (levaduras, hongos, bacterias). Enlaces $\beta(1 \rightarrow 6)$, $\beta(1 \rightarrow 3)$ y $\beta(1 \rightarrow 4)$,



→ GOS 2-8 moléculas de galactosa con una de glucosa terminal

→ Presentes de forma natural en **leche humana** y en menor proporción en leche de otros mamíferos

→ Son **ingredientes alimentarios GRAS** y FOSHU



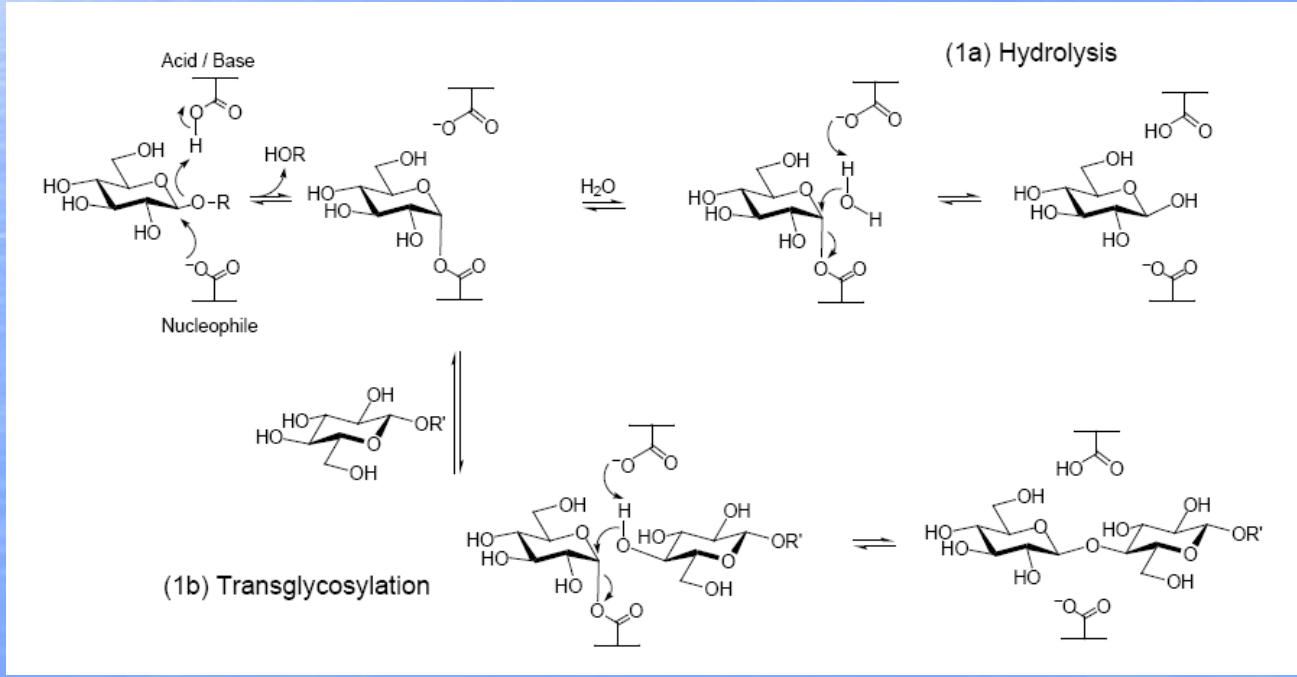
→ Microflora de bifidobacterias en niños alimentados con **leche materna** atribuible a los GOS presentes → FI con **GOS/FOS**



Obtención de GOS

- Antecedentes:

- *Wallenfels y Malhotra (1960)*, mecanismo de β -galactosidasa
- *Burvall y col. (1979)*, presencia de GOS en leche con lactosa hidrolizada
- En el pasado fueron considerados como **productos no deseados** de la industria láctea
- Final de los 80, GOS como **“factores bifidogénicos”**



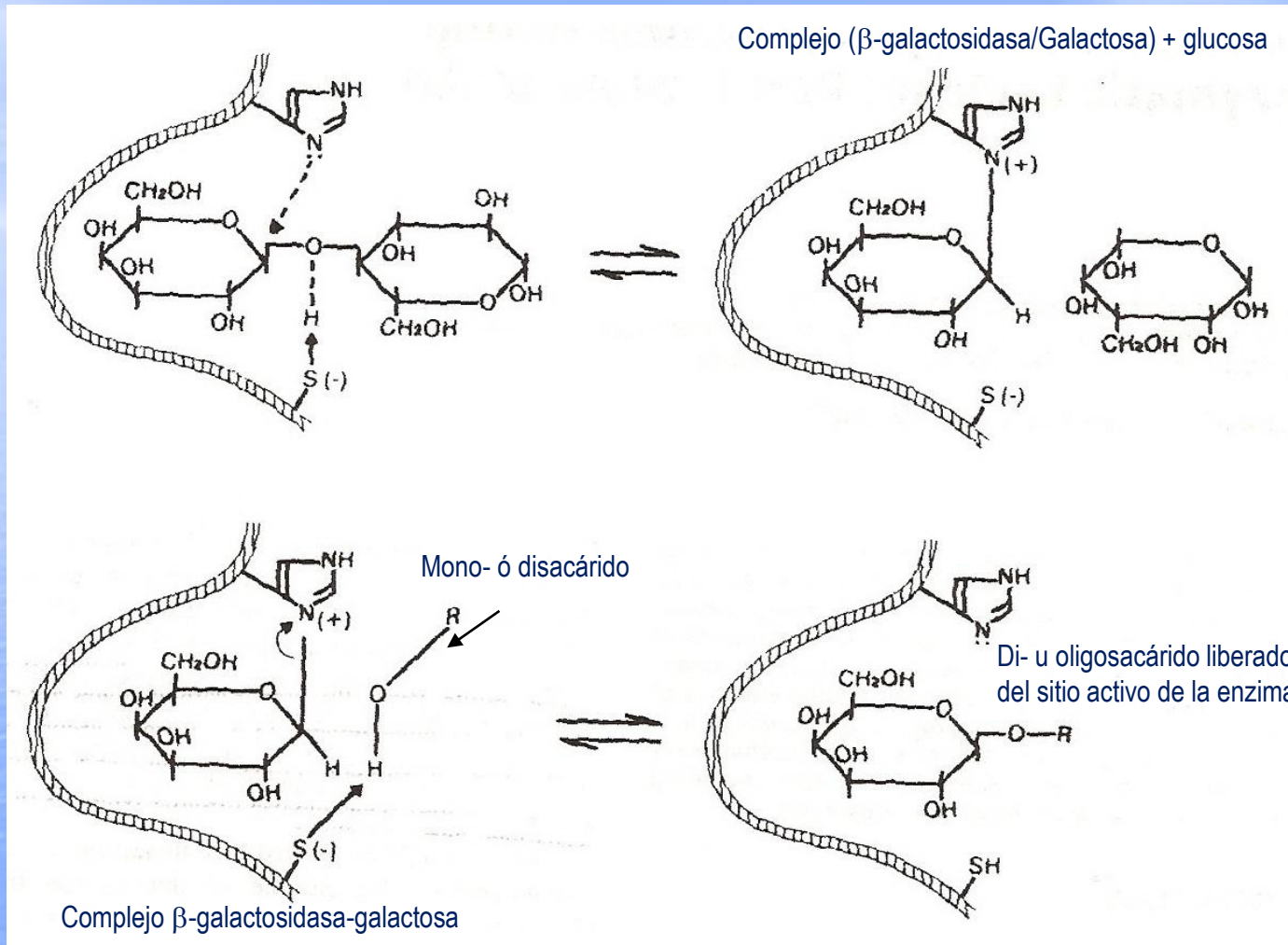


Mecanismos de la acción enzimática

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

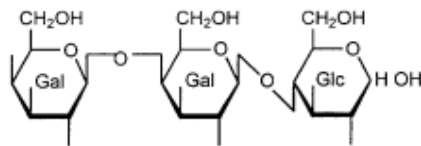


Mecanismo de acción de distintas β -galactosidasas: dos residuos de ácido glutámico (Glu482 y Glu551) actúan como **donante de protones** y **nucleófilo**, de manera simultánea en la reacción enzimática.
(Wallenfels y Weil, 1972, Prenosil y col., 1987)

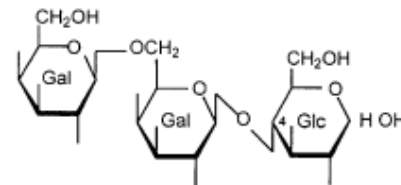


Obtención y purificación de GOS

- **Procesos de obtención**
 - Sistemas discontinuos
 - Sistemas continuos
 - Inmovilización de enzimas
 - Reactores de membrana
 - **Medio de reacción: agua con solventes orgánicos**
- **Procesos de purificación**
 - Métodos enzimáticas
 - Métodos de fraccionamiento



4'-galactosil-lactosa

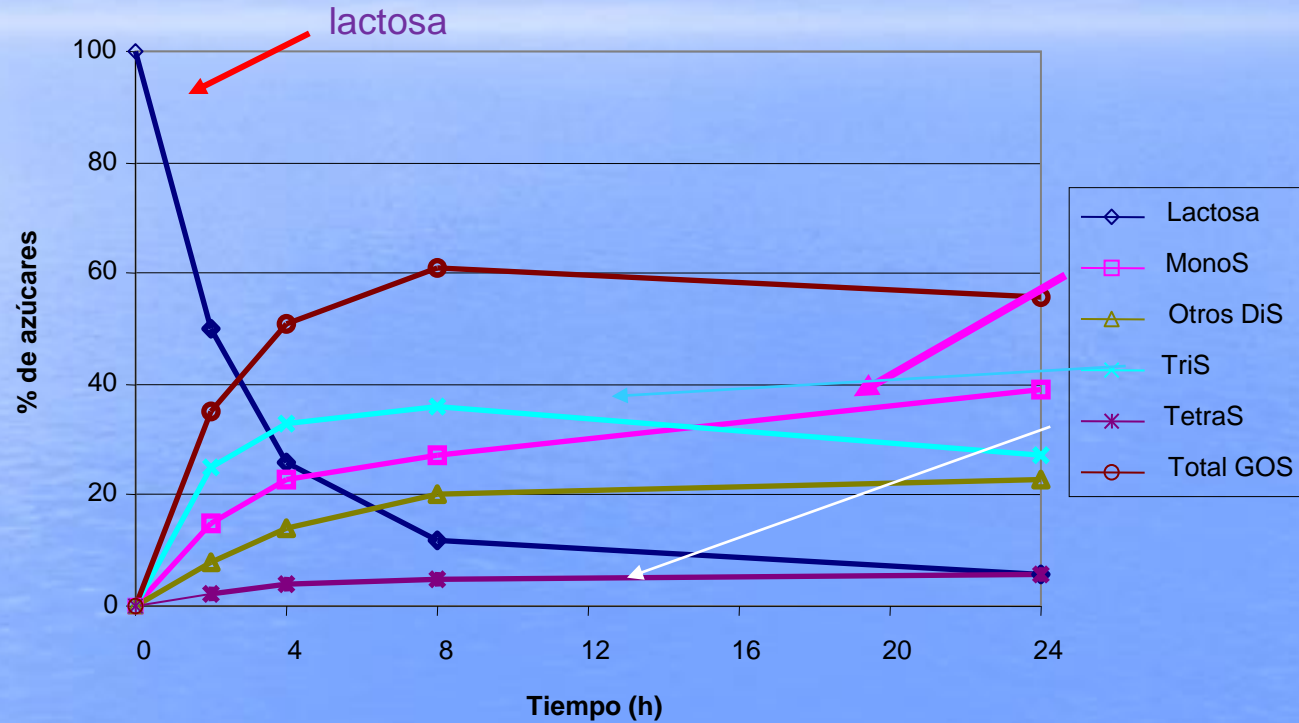


6'-galactosil-lactosa



Obtención de GOS. Procesos discontinuos

Gráfica de formación de GOS



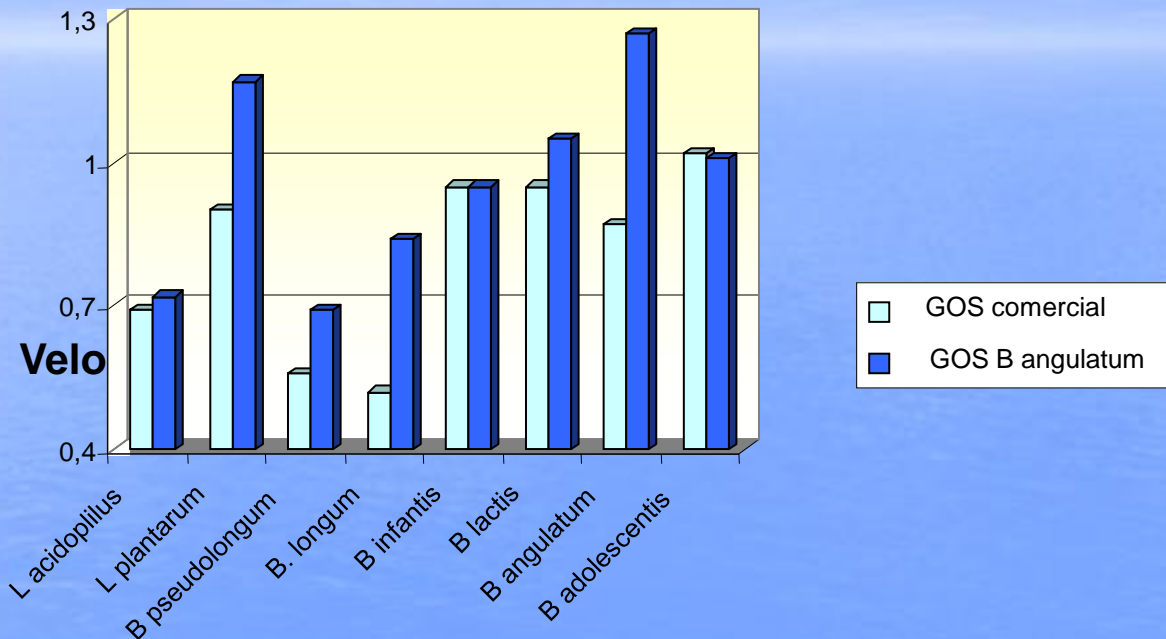
β -galactosidasa hipertermófila de *Caldocellum saccharolyticum* a 70°C, 70% La \rightarrow GOS **60%**; **selectividad 2.0**



Obtención de GOS. Procesos discontinuos

- β -galactosidasas de **microorganismos probióticos** β -GOS sintetizados mejor metabolizados por probióticos (*Rastall y col. 2005*)

(*Rabiau y col 2001*)



- Células enteras, enzimas modificadas, adsorción del aceptor...
- Obtención directa de permeado \rightarrow composición salina (*Montiilla y col. 2012*)



Obtención de GOS. Procesos continuos

Enzimas inmovilizadas

– Ventajas

- Abaratar **costes**
- Facilitar el **escalado** industrial
- Mayor **termoestabilidad** del enzima
- Productos de **composición definida**

Inconvenientes

- # Menor **rendimiento** y/o menor **GP** → transferencia de masa
(Lopez-Leyva y Guzman, 1995; Rustom y col. 1998; Mahoney, 1998)

Buenos soportes

- # Eupergit C *(Petzelbauer, Splechtina y Nidetzki, 2002)*
- # Perlas de quitosano *(Gaur y col. 2006; Chen, Duan y Sheu, 2006)*

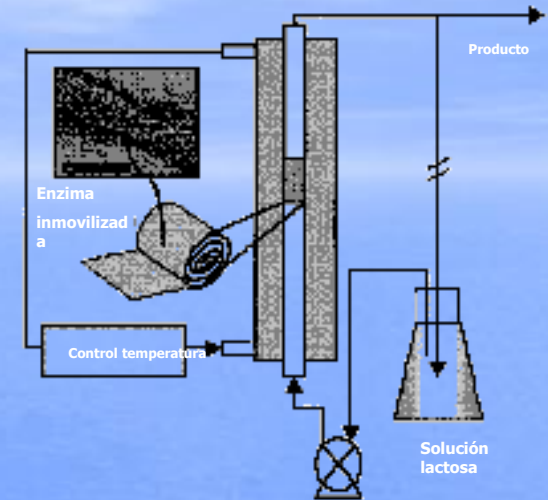
Enzimas hipertermófilas ($T > 70^{\circ}\text{C}$)

- # De *Sulfolobus solfataricus* y *Pyrococcus furiosus*
- # Ventajas: > solubilidad de lactosa y < riesgo de contaminación
- # Inconvenientes: glicosilación (RM) y caramelización



Obtención de GOS. Procesos continuos

- **Enzima inmovilizada** → fibra de algodón mercerizada con polietilen-imina:
 - Mayor cantidad de enzima inmovilizada
 - Sin pérdida de actividad o rendimiento
 - Sistema con mayor productividad



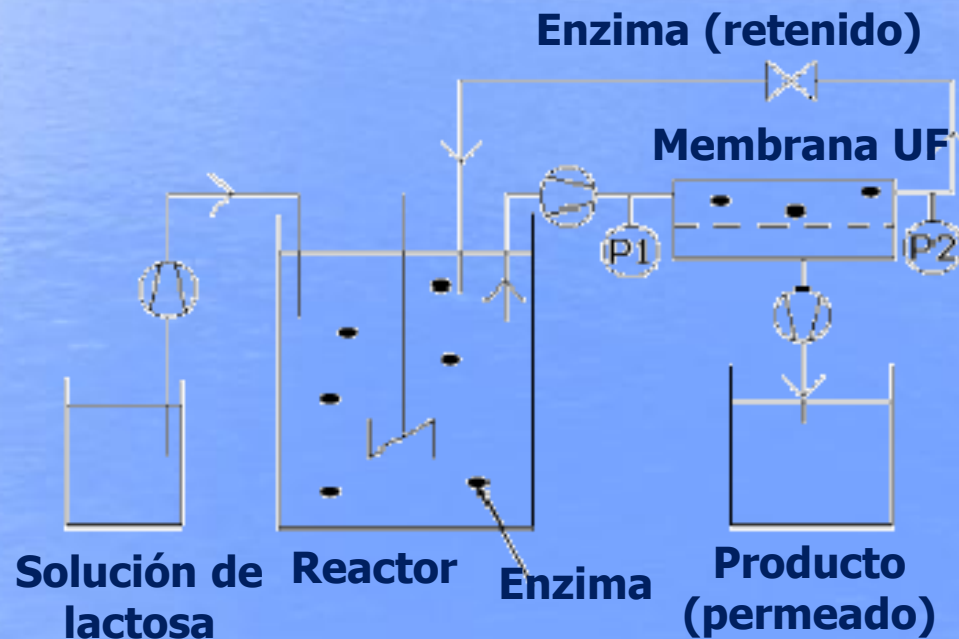
Microorganismo	Soporte	La g/L	GOS %	Productividad g/L/h	Referencia
<i>B. circulans</i>		45.6	40	4.2	Mozaffar y col 1986
<i>B. singularis</i>	quitosano	100	55	4.4	Shin, Park y Yang, 1998
<i>K.lactis</i>	UF-Romicon	200	31	13.7	Foda y Lopez-Leiva, 2000
<i>A. oryzae</i>	Algodón/GA	200	21.7	80	Albayrak y Yang 2002a
<i>A. oryzae</i>	Algodón/GA	400	26.6	106	Albayrak y Yang 2002a
<i>A. oryzae</i>	Algodón/GA/PEI	400	26	6000	Albayrak y Yang 2002b

Productividad de GOS en continuo (Albayrak y Yang, 2002)



Obtención de GOS. Procesos continuos

- Reactor de membrana de ultrafiltración (UF):
 - Permeado → se retira producto
 - Retenido → recicla el enzima
 - β -galactosidasa de *K lactis*, La 31% → 40% GOS (*Czemak y col. 2004*)





Obtención de GOS con solventes orgánicos

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

- Menor actividad de agua → mayor transgalactosilación
- Factores: solvente, concentración, enzima (*Finch y Ion, 1997; Crout y Vic, 1998*)
- Resultados negativos (*Chen y col. 2003; Kim y col. 2006; Cruz-Guerrero y col. 2006*)
- **Resultados positivos:**
 - *A oryzae*, La 45% → GOS 51% (sistema micelar reverso, 31% en agua) (*Chen SX y col. 2001*)
 - *K lactis* inmovilizada (Duolite A-568, hexanol), > selectividad (*Maugard y col. 2003*)

Solvente	Conversión de lactosa	% GOS	% hidrólisis	Selectividad (GOS/hidrólisis)
Agua	96	22	74	0.30
Hexanol	87	28	59	0.47
Hexamediol	89	2	87	0.02
DEGDE	86	26	60	0.43
Glycerol	19	2	17	0.01

DEGD: dietilén-glicol dietil-éter



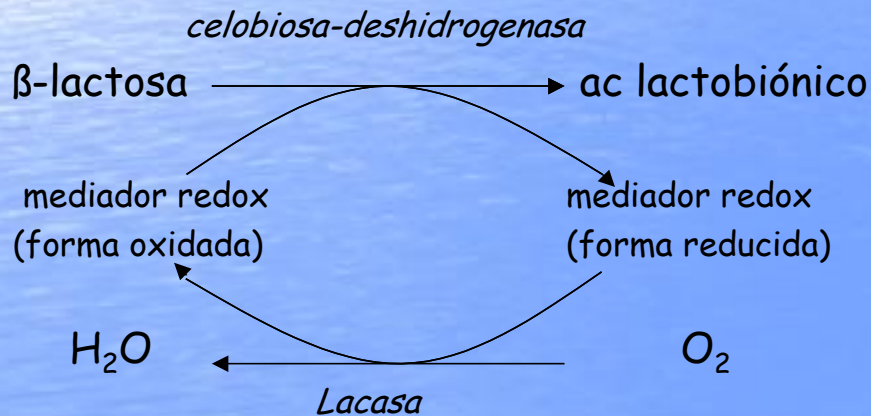
Procesos de purificación Métodos enzimáticos

- Purificación → procesos complejos

- *Sulfolobus solfataricus* → 41% GOS

Producto final: 97% GOS; 1,2% La y 2.1% monosac. ; rto 25%

(Splechna y col. 2001)



	Composición de GOS (%)		% de pérdidas
	Antes oxidación	Después oxidación	
Disacáridos	37	40	6
Trisacáridos	47	47	14
Tetrasacáridos	16	13	25



Procesos de purificación

Métodos enzimáticos

- β -galactosidasa *Bacillus* sp \rightarrow GOS, glu, gal y lac
- **Fermentación *Kluyveromyces marxianus*: metabolizan monosacáridos y disacáridos, (Cheng y col. 2006):**

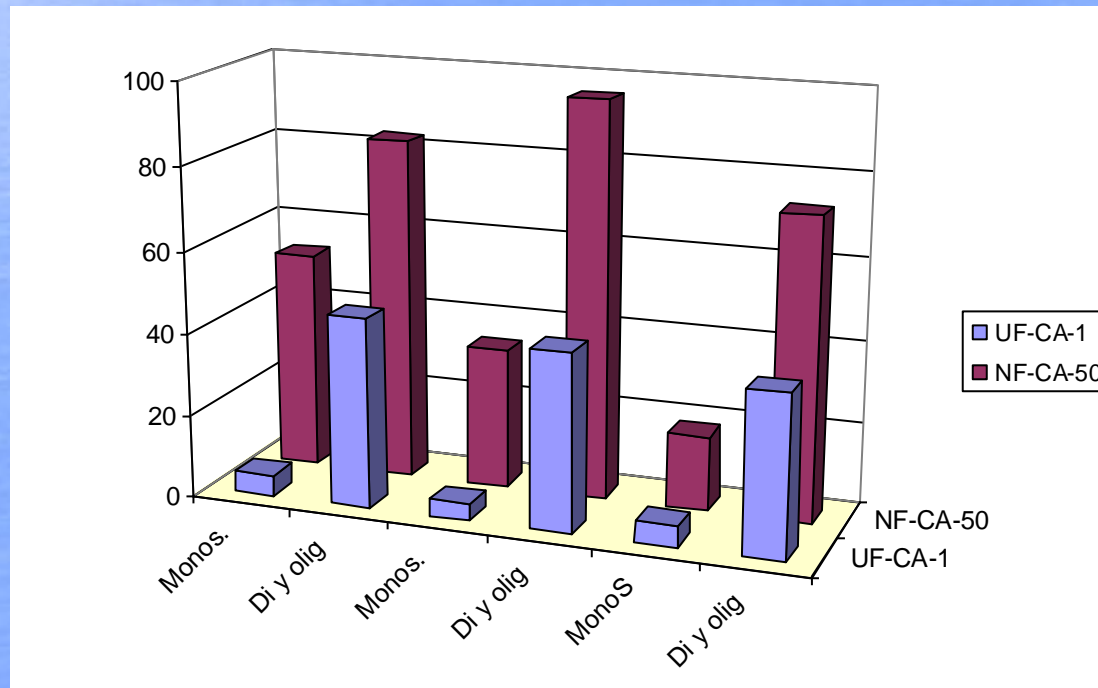
	% de azúcares	
	Antes de la fermentación	Después de la fermentación
Total GOS	37.6	30.6
Disac.	6.7	0.4
Trisac.	24.1	23.5
Tetrasac.	6.8	6.7
Glucosa	17.4	0.3
Galactosa	4.7	0.5
Lactosa	40.3	0
GOS en la mezcla %	38	97



Procesos de purificación. Fraccionamiento

- **Técnicas cromatográficas**
- **UF**, monosacáridos < 5%, pérdidas > 50%
- **Nanofiltración:** monosacáridos 3-14%, disacáridos y oligosacáridos 73-96%

(Goulas y col. 2002; Goulas, Grandison y Rastall, 2003)





Procesos de purificación. Fraccionamiento

Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides

Oswaldo Hernández^a, Ana I. Ruiz-Matute^a, Agustín Olano^b, F. Javier Moreno^{b,*}, M. Luz Sanz^a

^aInstituto de Química Orgánica General, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), C/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

^bInstituto de Fermentaciones Industriales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), C/ Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain



❖ Comparación 4 técnicas de fraccionamiento :

- **Diafiltración** (500 y 1000 Da) no mostró selectividad entre mono-, di- y oligosacáridos.
- **Levaduras** (*Saccharomyces cerevisiae*) eliminaba los monosacáridos.
- **Carbón activo**: diferente selectividad según la concentración del etanol (1–15%)
 - 8% se recuperaba el 90% de GOS
 - 10% se eliminan los disacáridos, pero se recupera el 53% de los trisacáridos.
- **SEC**: Fracciones de GOS según GP más puras (*Hernández y col., 2009*).

Table 1

Comparison of concentrations (mg g^{-1} initial GOS mixture) and percentage of recovery (in brackets) for each group of carbohydrates obtained at the optimum fractionation conditions for all the studied techniques. Errors are expressed as standard deviations ($n = 3$).

	Vivinal-GOS ^a (% recovery), mg g^{-1}			
	Initial GOS mixture ^a	Yeast ^b	Charcoal activated ^c	SEC
Monosaccharides	190.7 ± 4.7 (100)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	175.4 ± 2.2 (92.3 ± 11)
Disaccharides	252.0 ± 34.3 (100)	270.1 ± 12.4 (108.1 ± 5.0)	16.4 ± 1.6 (6.6 ± 0.6)	202.5 ± 10.1 (81.0 ± 4.1)
Trisaccharides	132.8 ± 10.4 (100)	132.2 ± 8.3 (101.7 ± 6.4)	68.0 ± 8.5 (52.3 ± 6.0)	115.6 ± 10.0 (88.9 ± 7.7)
Tetrasaccharides	145.3 ± 16.8 (100)	144.1 ± 6.7 (102.9 ± 4.8)	124.6 ± 1.3 (89.2 ± 0.9)	121.3 ± 6.8 (86.6 ± 4.9)

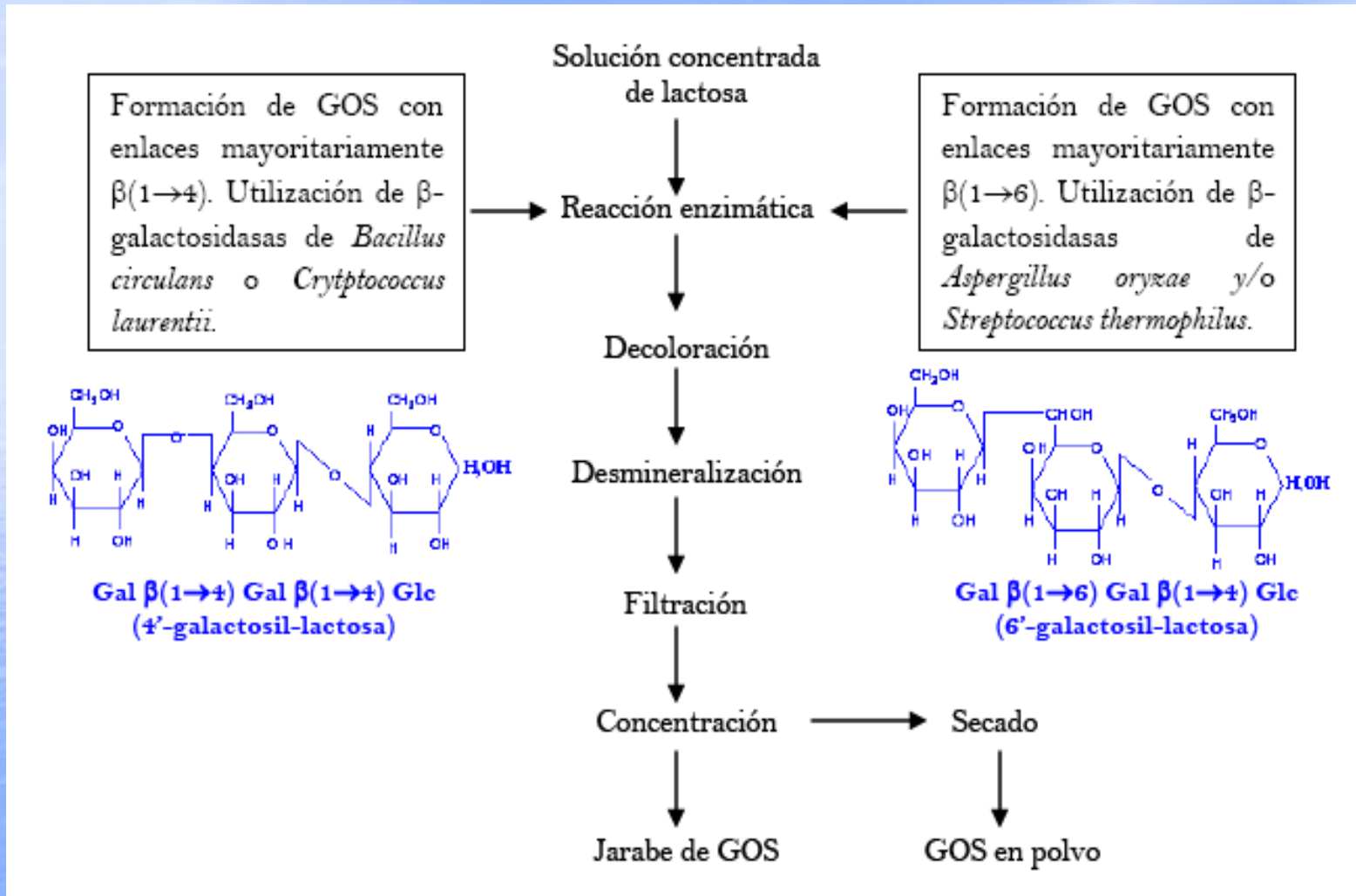
^a Original sample of Vivinal-GOS[®].

^b Yeast treatment after 10 h of incubation.

^c Second desorption with 50% (v/v) ethanol for charcoal activated treatment after a first extraction with 10% (v/v) ethanol.



Producción industrial de GOS



Según el origen de la β -galactosidasa \rightarrow Mezclas de GOS con DP (2-6) y enlaces: $\beta(1\rightarrow6)$, $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ (Alolactosa, galactobiosa). (Matsumoto y col., 1993)



Efectos de los prebióticos sobre la flora intestinal y la fisiología del huésped



FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LOS PREBIÓTICOS

No-digestibilidad



Fermentación en el intestino grueso



Efecto bifidogénico



Producción ácidos grasos
de cadena corta (AGCC)



Buenas condiciones GI:

- Frecuencia de deposiciones
- Menor estreñimiento
- Incremento selectivo de bifidobacterias y lactobacilos
- Resistencia a patógenos

(Alegación aprobada FOSHU 1993)

Absorción minerales:

- (Ca, Mg, Fe)
- Aumento de la densidad de los huesos
 - Mejora de la anemia

(Alegación aprobada FOSHU 2002)

Inmunomodulación:

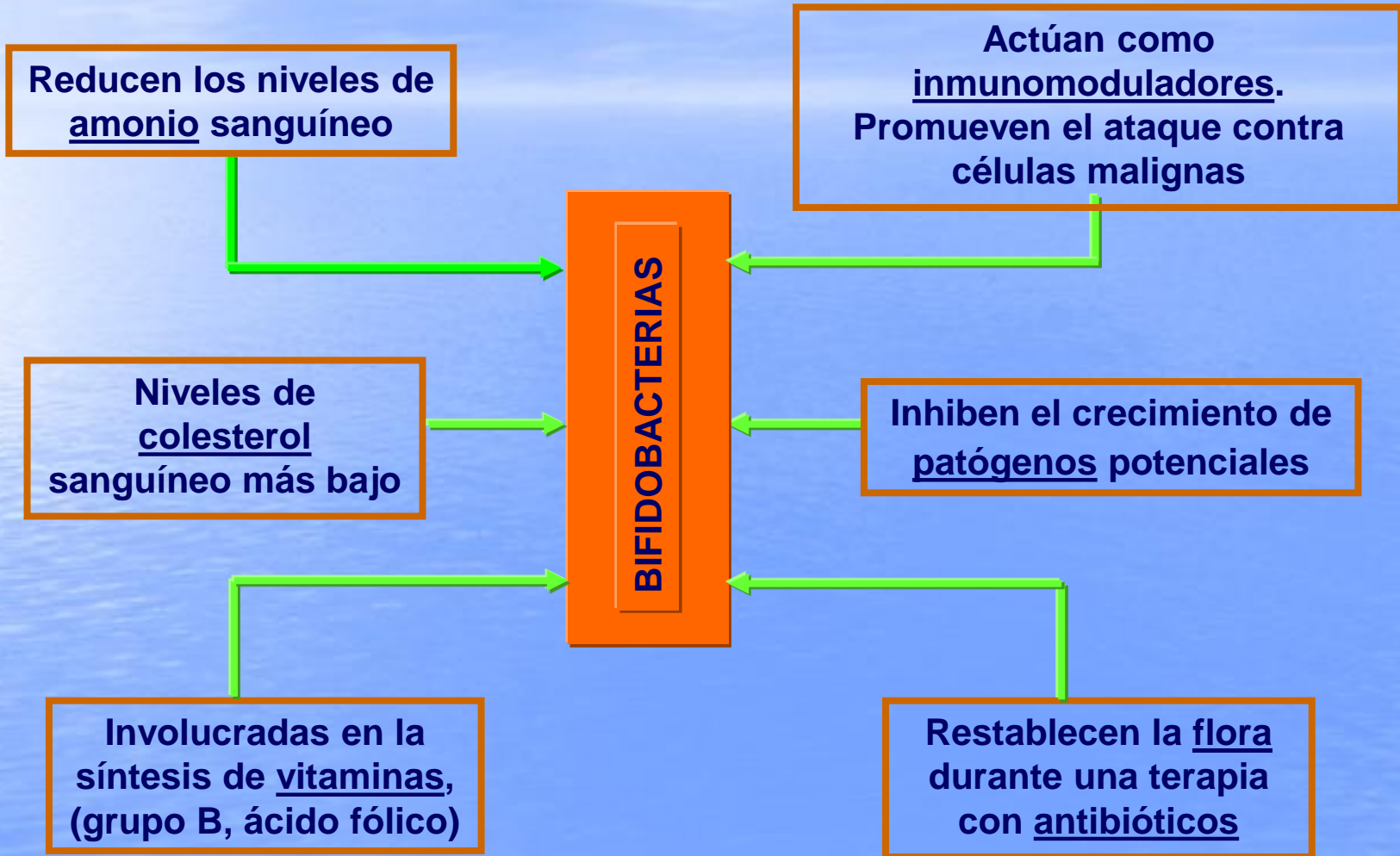
- Prevención de alergias
- Prevención del cáncer



Actividad bifidogénica de los prebióticos



Influencia de las bifidobacterias en la salud humana



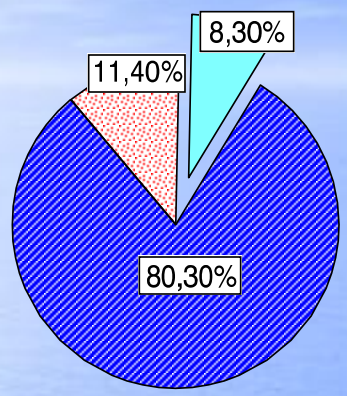


ACTIVIDAD BIFIDOGÉNICA DE LOS PREBIÓTICOS

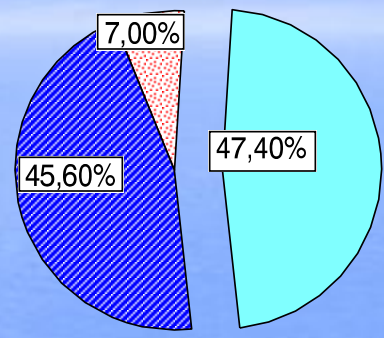
- Favorece la proliferación de **bifidobacterias y lactobacilos**
 - Generan **AGCC** → descenso de pH, inhibe patógenos (Mussato y Mancilha, 2007).
 - Producen **nutrientes**: vitaminas de tipo B (B1, B2, B6 y B12, ácido nicotínico y ácido fólico) (*Gibson y Roberfroid, 1995; Kasper, 1996*).
¿Biodisponibilidad? (*Vitoria Miñana, 2007*)
- Facilidad de **utilización** de los prebióticos:
 - Velocidad de fermentación
 - Monosacáridos, tipos de enlace y peso molecular. (GP)
 - Rápida: zonas próximas del colon
 - Lentos: zonas distales.
- **Estudio** de las propiedades prebióticas:
 - a) *In vitro*: cultivos puros, mezclas, fecales: discontinuo o continuo
 - b) *In vivo*: en animales: axénicos o con flora humana.
 - c) *In vivo*: en humanos, heces



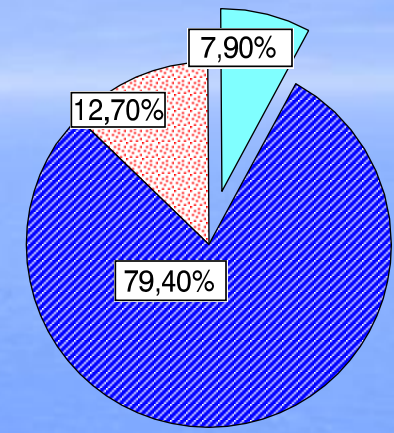
ACTIVIDAD BIFIDOGÉNICA DE LA LACTULOSA



Antes



Durante la ingesta



Después

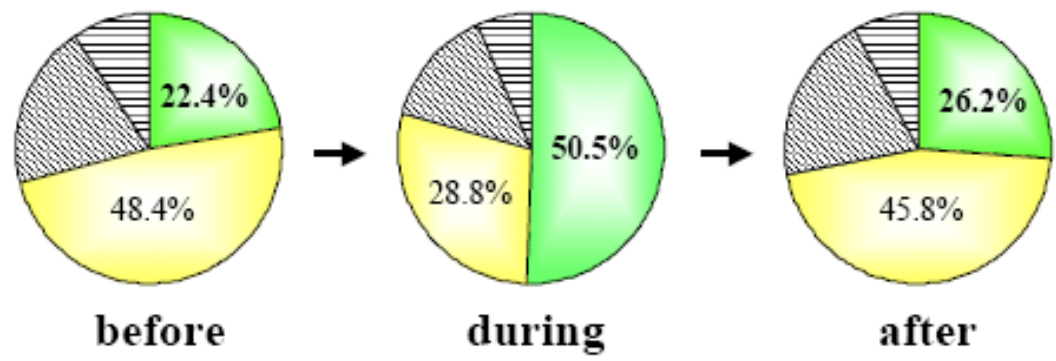
 Bifidobacteria  Bacteroidaceae  Otros

3 g/día Lu en adultos (Mizota, 1996)





Numerosos estudios en niños y adultos: no absorción, bifidogénico (Petuely, 1957; Rutloff y col. 1967; Ballonge y col., 1997; Aider y Halleux, 2007)



ACTIVIDAD BIFIDOGÉNICA DE LA LACTULOSA



Changes in the fecal microflora induced by ingestion of 4 g of lactulose

-  Bifidobacteria
-  Bacteroides
-  Eubacteria
-  Others

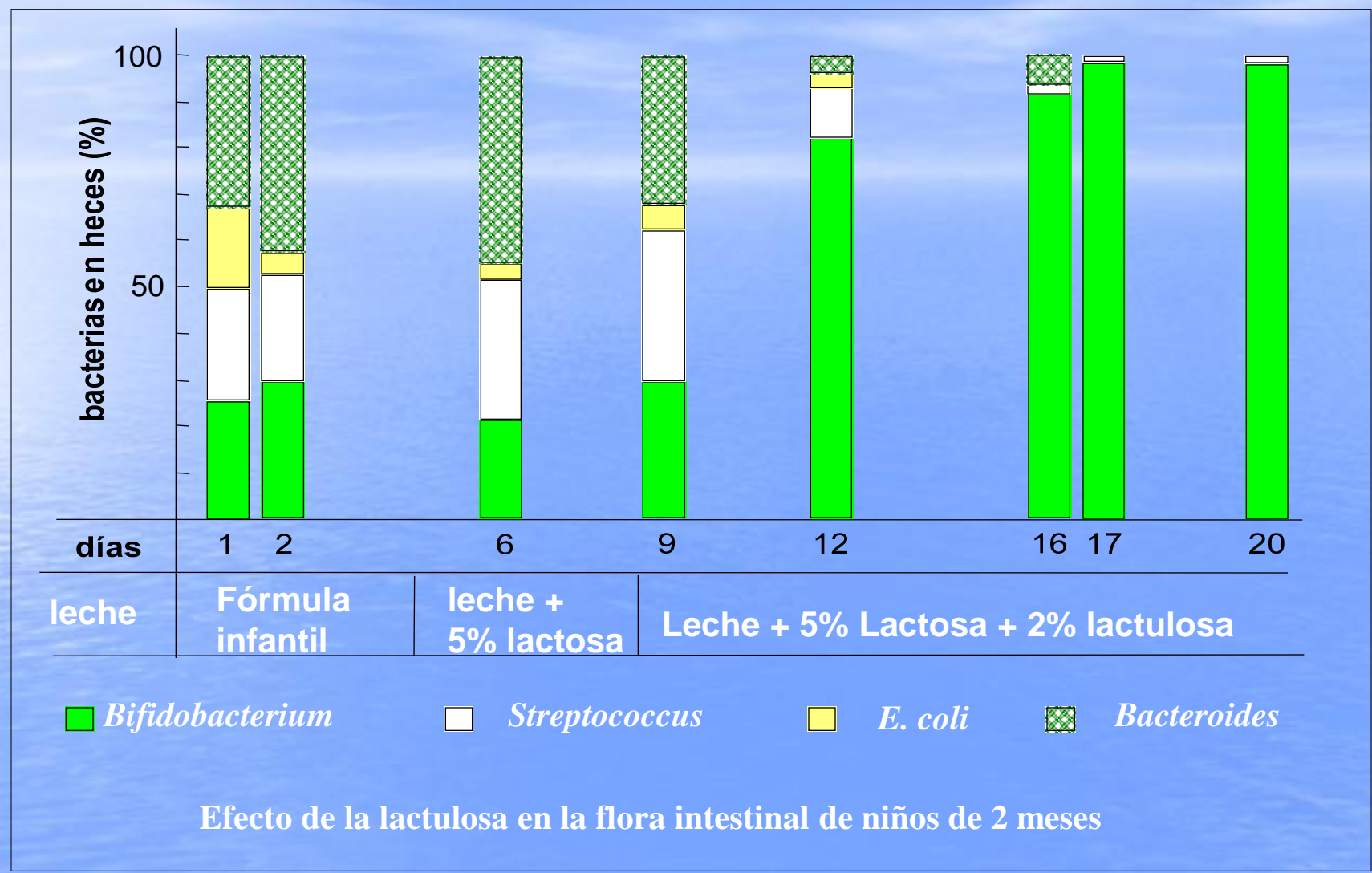
Mizota et al., Milchwissenschaft 57: 312 (2002)

Efectiva a dosis bajas y prolongadas sin problemas de tolerancia entre 4 y 10 g/día → disminuyen bacteroides, clostridia, coliformes y eubacterias.

Producción de gases



ACTIVIDAD BIFIDOGÉNICA DE LA LACTULOSA





ACTIVIDAD BIFIDOGÉNICA DE LA LACTULOSA

→ **Fórmulas infantiles + 0,5% Lactulosa:** estimulación de bifidobacterias a niveles similares a niños alimentados con leche materna.



Incorporación 1%: EFECTO LAXANTE

* FI con lactulosa → estables hasta 16 semanas a 38°C

→ **Yogur con Lu:** - Mejora el tránsito intestinal y aumenta la producción fecal en voluntarios humanos.

- Reduce el período de incubación en la producción de bio-yogur (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*).

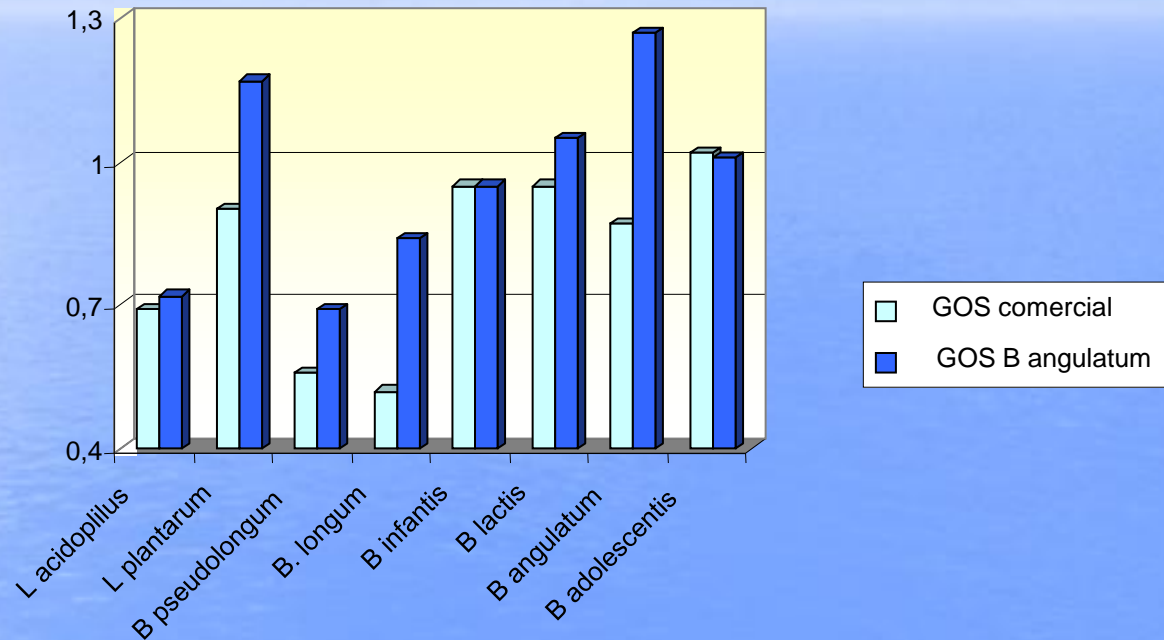
- Mantenimiento de bifidobacterias durante el almacenamiento del yogur



ACTIVIDAD BIFIDOGÉNICA DE LOS GOS

- Estudios positivos *in vitro*, *in vivo* con animales y humanos

Velocidad
de crecimiento



GOS obtenidos con **β -galactosidasas de** microorganismos **probióticos** mejor metabolizados que los GOS comerciales

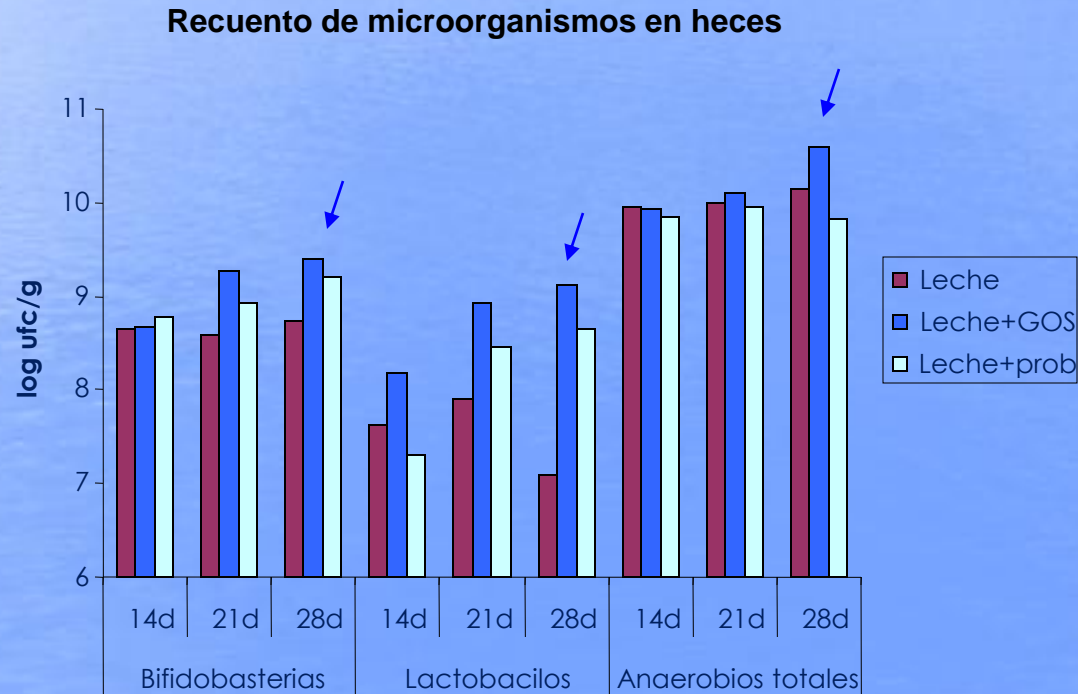


ACTIVIDAD BIFIDOGENICA DE LOS GOS

– Mayor efecto que probióticos:

- 2,4 g/d de GOS > 3×10^{10} ufc de *Bifidobacterium lactis*

(Gopal, Prasad y Gill, 2003)



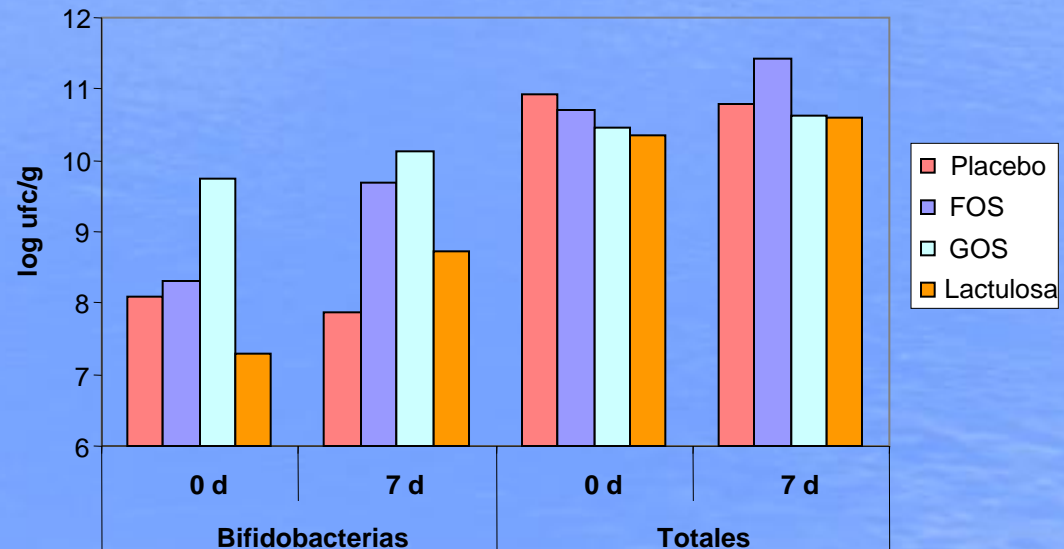


ACTIVIDAD BIFIDOGÉNICA DE LOS PREBIÓTICOS

- Respuesta bifidogénica a los prebióticos
 - Según el **número inicial de bifidobacterias**; mayor efecto en individuos con niveles bajos (*Bouhnik y col. 2004*)
 - Aumenta hasta un máximo, **~10,3 log ufc/g** de heces (*Rycroft, y col. 2001*)
 - Dosis efectiva menor: **2,5 g/d 6'-galactosil-lactosa** (*Mitsuoka, 1992*)

Bouhnik y col. 2004:

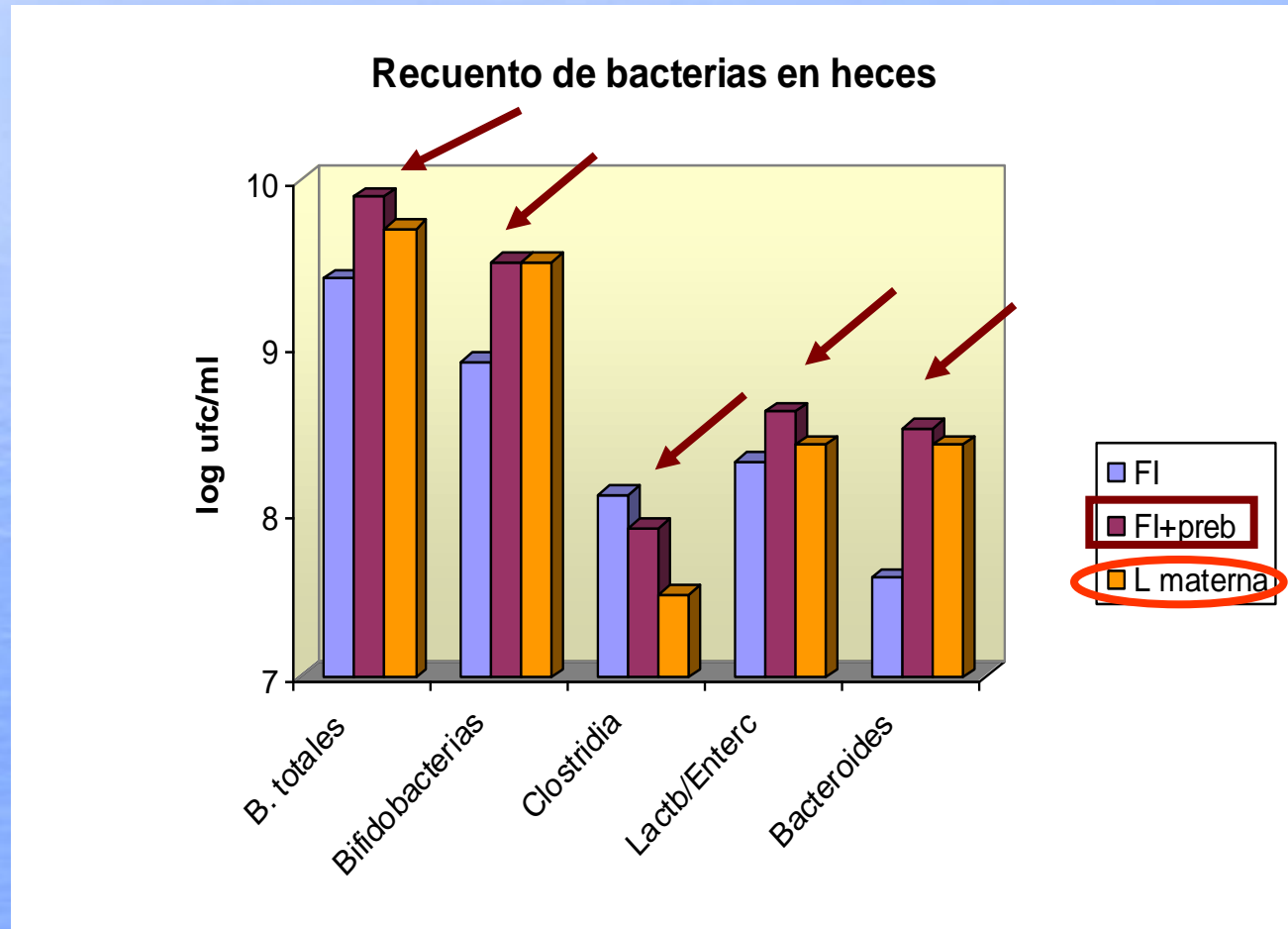
Recuento de
microorganismos en heces





ACTIVIDAD BIFIDOGÉNICA DE LOS PREBIÓTICOS

8 g/L de mezcla 9/1 de **GOS/inulina** en fórmulas infantiles (FI)

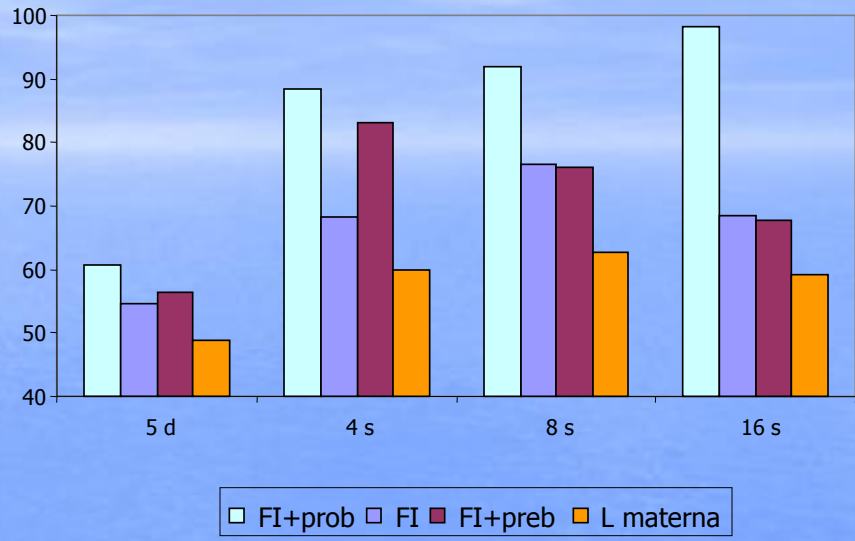




ACTIVIDAD BIFIDOGÉNICA DE LOS PREBIÓTICOS

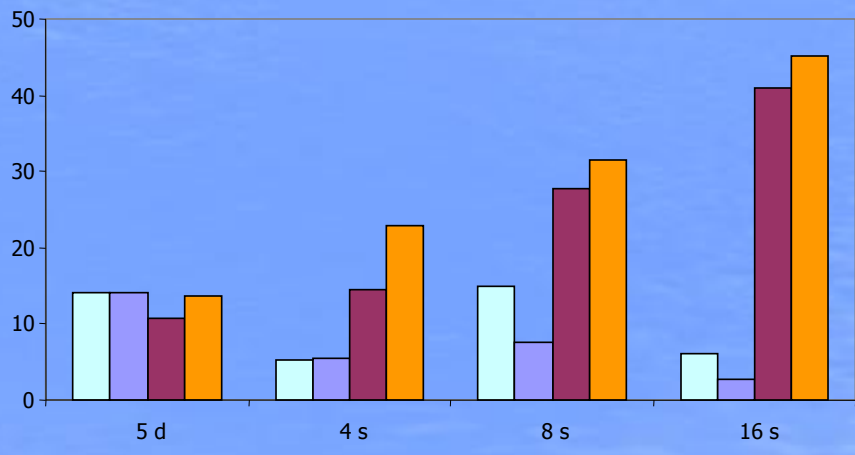


AGCC (mmol/Kg)



Producción de **AGCC y láctico** tras la ingestión de fórmulas infantiles con probióticos, prebióticos. Comparación con leche materna

Ac Láctico (mmol/Kg)



(Boehm y col. 2004; Bakker-Zierikzee y col. 2005)



Efecto de los prebióticos

Índice prebiótico (IP)

- $$IP = \Delta_r Bif + \Delta_r Lac + \Delta_r Eub - \Delta_r Bac - \Delta_r Clo - (\Delta_r Atp)$$

Bif: bifidobacterias;

Lac: lactobacilos;

Eub: eubacterias;

Bac: bacteroides;

Clo: clostridia

(*Atp*: *Atopobium*)

- **Problemas:**

- Todos los grupos el mismo peso
- ¿Otros grupos?: *Escherichia*, fusobacteria, peptococci, peptostreptococci...
- Productos del metabolismo (AGCC, producción de gas,...), biomarcadores.
- Cultivo fecal estandarizado y liofilizado (*Rastall et al. 2005*).

(*Palframan, Gibson y Rastall, 2003*)

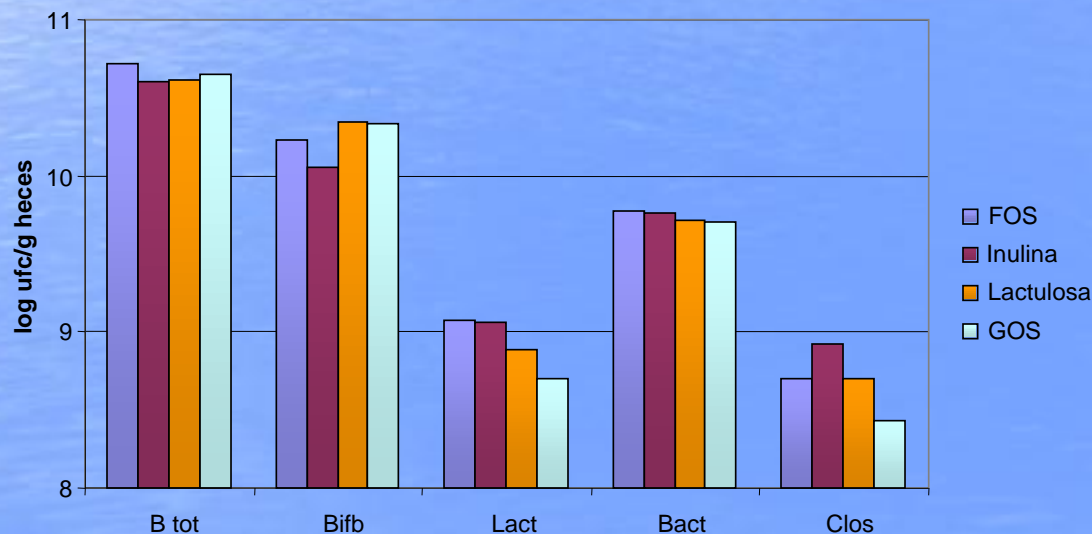


Efecto de los prebióticos Índice prebiótico (IP)

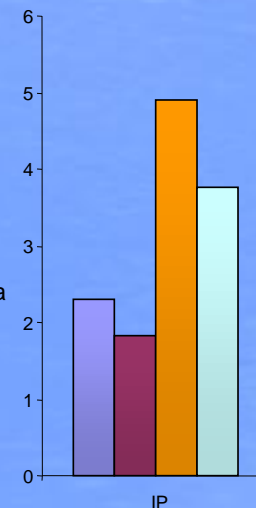
- FOS, inulina, lactulosa, GOS, en cultivo discontinuo

Rycroft y col. 2001

Crecimiento de un cultivo fecal sobre prebióticos



Índice prebiótico





Índice Prebiótico (IP) en cultivos al 1 o 2% a pH 6 ó 6.8

Carbohidrato	IP (pH 6; 1%)	IP (pH 6; 2%)	IP (pH 6.8; 1%)	IP (pH 6.8; 2%)
FOS	-1.30	0.56	1.73	0.77
Inulina	0.71	0.91	0.38	-1.20
IMO	3.67	4.77	3.48	3.91
GOS	3.16	5.19	3.41	3.38
Lactulosa	2.39	4.68	2.93	3.00

Palframan y col. Anaerobe 8, 287, (2003)



Otras actividades fisiológicas de los prebióticos



Efecto prebiótico: Actividades fisiológicas

- Mejora o estabilización de la **flora bacteriana**
- Mejora de la **función intestinal**: motilidad, excreción fecal
- Incremento de la absorción de **minerales** y de la salud de los huesos
- Modulación/regulación del **sistema inmune**
- Mejora de la **función barrera** en el intestino, reducción de metabolitos endotóxicos.
- Efecto protector frente a **infecciones** del TGI, respiratorio y urogenital
- Tratamiento de la **encefalopatía hepática**
- Tentativamente:
 - * Reducción del riesgo de **obesidad y diabetes** tipo 2
 - * Reducción del riesgo de padecer **cáncer**
 - * Reducción del riesgo y/o mejora de la **inflamación intestinal**
 - * Modulación de la producción de péptidos gastrointestinales relacionados con la **saciedad**



Alivio del estreñimiento crónico

- **AGCC** → mayor absorción de agua y sales, estimulan los movimientos peristálticos → efecto laxante

(Avery, Brogden y Davies, 1972; Sako, Matsumoto y Tanaka, 1999; Fritz y col. 2005)

- Efecto de la **lactulosa** sobre el estreñimiento *(Bouhnik y col. 2004b)*:

	d 14	d 28
< 4 veces/semana	22 %	13 %
Dificultad	44%	20 %

- FI prebióticas → heces con menor consistencia de forma dosis-dependiente y frecuencia de defecación mayor

(Fanaro y col. 2005; Moro y col. 2006)



Alivio del estreñimiento crónico e irritabilidad del colon

Tratamiento: 3 semanas (4 – 15 g/día)

Éxito: no necesitar laxante en tres semanas siguientes

 **Fallos**
 **Éxitos**

31 pacientes



lactulosa

21 pacientes



Control
(Glucosa)

0

50

100 (%)



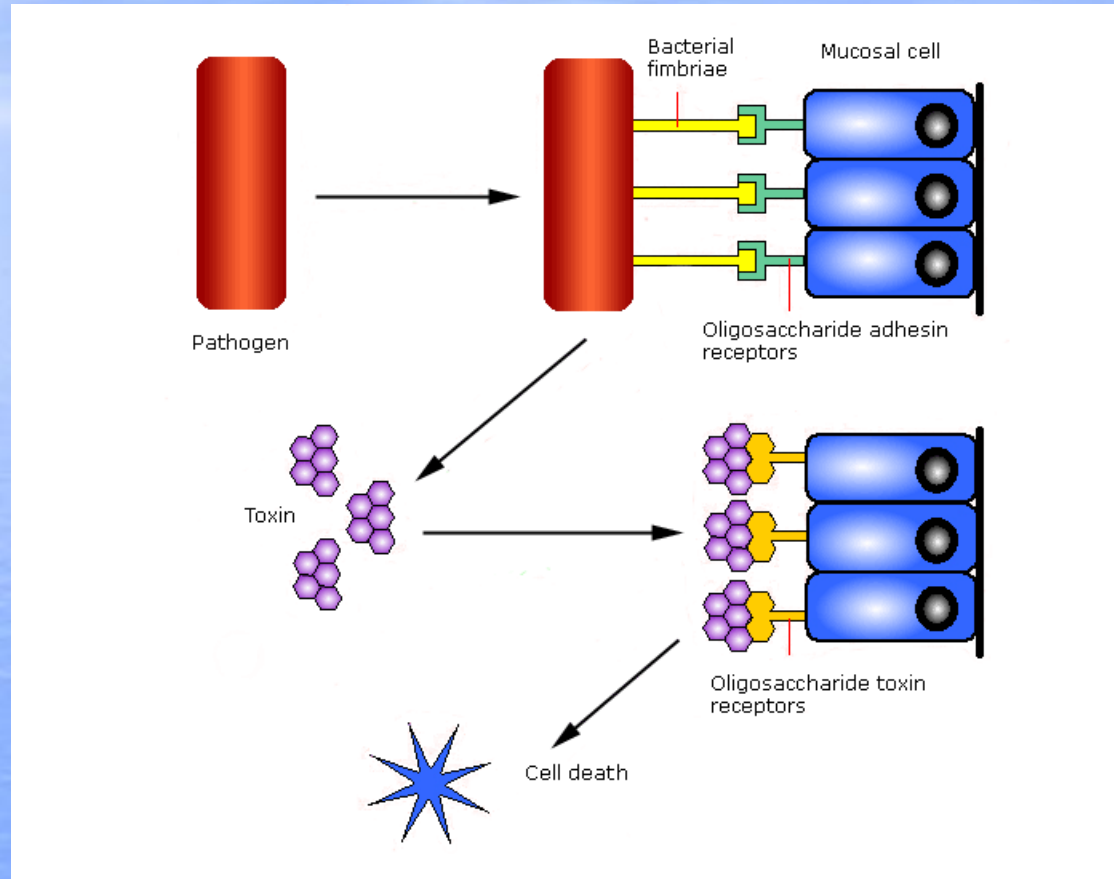
Efecto protector frente a infecciones en el tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital

- **Mecanismos** de las bacterias ácido-lácticas para reducir las infecciones:
 - Producción de **AGCC y ac láctico** → bajada de pH, condiciones desfavorables para los patógenos.
 - Especies de lactobacilos y bifidobacterias excretan antibióticos naturales, **bacteriocinas**.
 - Mejora de la **respuesta inmune**
 - **Competición** por los nutrientes
 - **Bloqueo** de los sitios de adhesión de los patógenos a la superficie epitelial en el tracto gastrointestinal.

(Gibson y col., 2005).



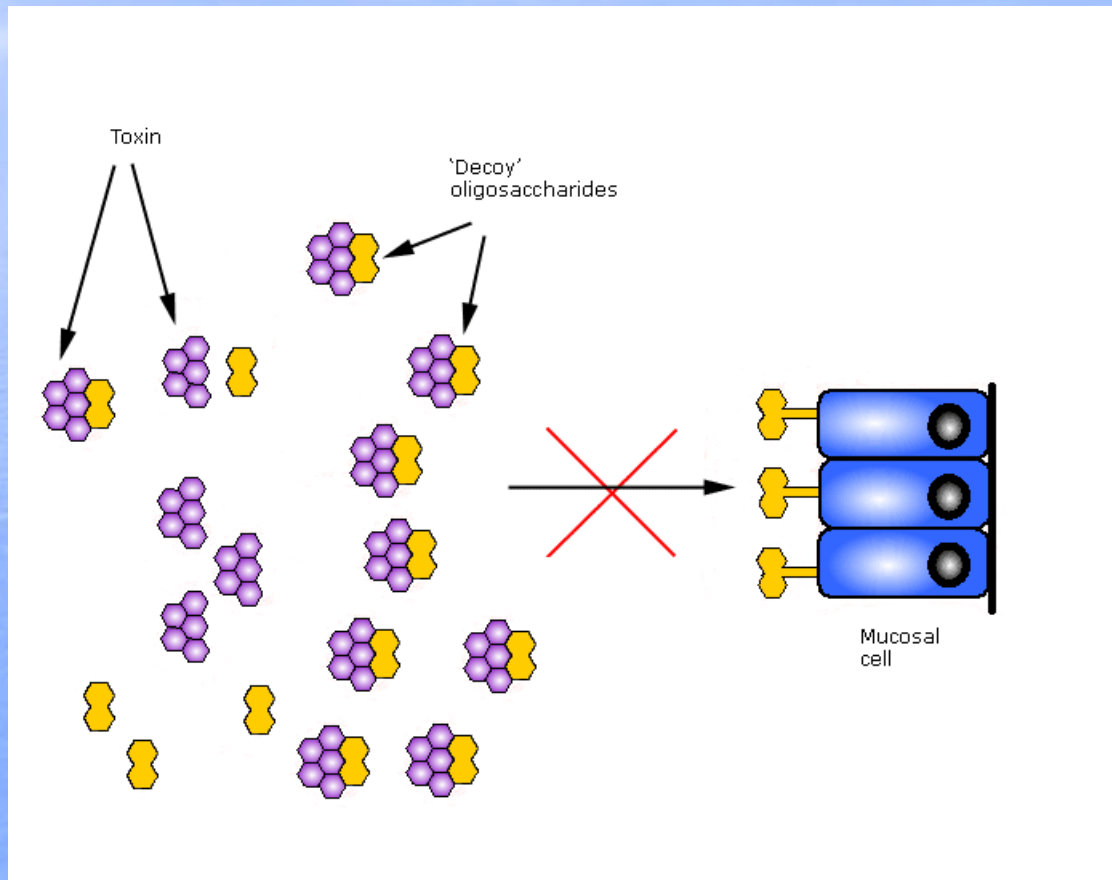
Efecto de los prebióticos sobre la función inmunológica y protección frente a infecciones



- **Bloqueo** de los sitios de adhesión de los patógenos intestinales (*Escherichia*, *Salmonella* y *Campylobacter*) utilizan oligosacáridos como sitios receptores, una vez establecidos pueden causar la infección por invasión o por generación de toxinas, (Gibson y col., 2005).



Efecto de los prebióticos sobre la función inmunológica y protección frente a infecciones



- **Bloqueo** de los sitios de adhesión de los patógenos, los oligosacáridos prebióticos pueden simular esos receptores y “engañar” al patógeno (*Gibson y col., 2005*).



Incremento en la absorción de minerales

- Los oligosacáridos prebióticos **interaccionan** con Fe, Ca y Mg y son liberados en el colon
- Los AGCC, butirato, estimulan el crecimiento de las **células epiteliales** del colon, e incrementan la capacidad de absorción del epitelio.
- Especial relevancia para **ancianos y mujeres** posmenopáusicas previniendo el riesgo de osteoporosis y anemia.
 - Con fructanos (Hirayama, 2002), GOS (Sako y col., 1999) y lactulosa (Scholz-Ahrens y col., 2001) se incrementa la absorción de calcio en adolescentes y/o mujeres posmenopáusicas.
 - Lactulosa: 24 hombres voluntarios adultos, con una ingesta de 4 g de lactulosa, 300 mg de Ca y 150 mg de Mg, la absorción de estos minerales aumentaba sin efectos secundarios (*Seki y col., 2007*).
 - Lactulosa y GOS: los AGCC, lactato, succinato mejoran la solubilidad de Ca y Mg en mujeres posmenopáusicas (*van den Heuvel y col. 1999, 2000*)



Mejora del metabolismo de lípidos

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

- Los oligosacáridos prebióticos reducen los niveles de **colesterol, triglicéridos y fosfolípidos** en la sangre minimizando así el riesgo de padecer diabetes y obesidad.
 - Cepas de *Lactobacillus acidophilus* **asimilan** el colesterol
 - Otras cepas inhiben la **absorción** del mismo a través de la pared intestinal
 - Los AGCC pueden provocar cambios en el **metabolismo** lipídico en el hígado

(Conway, 2001).



Reducción del riesgo de padecer cáncer

Prevención del cáncer de colon

Mizota y col. 1992; Ito y col. 1993



	GOS		Lactulosa	
	0 d	7d	0 d	7 d
pH	6.35	6.10	6.47	6.33
Contenido en agua (%)	80.8	82.0	72.8	74.2
Amonio (μmol/g)	36.4	20.4	46.1	38.8
p-cresol (nmol/g)	90.8	30.7	63.0	23.3
Indol (n/mol/g)	89.5	62.8	70.3	38.7

Reducción del pH:

Reducción de la actividad **β-glucuronidasa** y de los ácidos biliares secundarios (*Sako, Matsumoto y Tanaka, 1999*)

Activación **glutatió-S-transferasa** → desintoxicación celular, eliminación de xenobióticos, carcinógenos



Reducción del riesgo de padecer cáncer

Efecto del consumo (20g/día) de lactulosa en la flora microbiana de heces (log. u.f.c./ml)

	PLACEBO	LACTULOSA
Bacteroides	10.1	6.2
Bifidobacterias	8.4	<u>11.5</u>
Clostridios	5.9	3.6
Coliformes	6.5	4.8
Lactobacilos	6.4	8.2
Streptococos	6.0	7.1

- El crecimiento bacteriano aumenta el peso del bolo fecal, disminuyendo el tiempo de tránsito intestinal y de **exposición** a carcinógenos potenciales.

J. Ballongue, C. Schumann , P. Quignon . Scan. J.Gastroent.,32, supp.222, 41-44(1997)



Reducción del riesgo de padecer cáncer

Efecto del consumo (20g/día) de lactulosa en las características bioquímicas de las heces (expresado en % de variación respecto al placebo)

	LACTULOSA
<i>Enzimas:</i>	
Azorreductasa	-44
7-α-deshidrolasa	-40
β-glucuronidasa	-38
Nitrorreductasa	-43
Ureasa	-22
<i>Compuestos aromáticos:</i>	
Cresol	-55
Indol	-60
Fenol	-56
Escatol	-52

	LACTULOSA
<i>Acidos grasos de cadena corta:</i>	
Acético	+33
Propionico	-15
Butírico	-8
Lactico	+30
pH	-15
Humedad	+11

J. Ballongue, C. Schumann , P. Quignon . Scan. J.Gastroent.,32, supp.222, 41-44(1997)



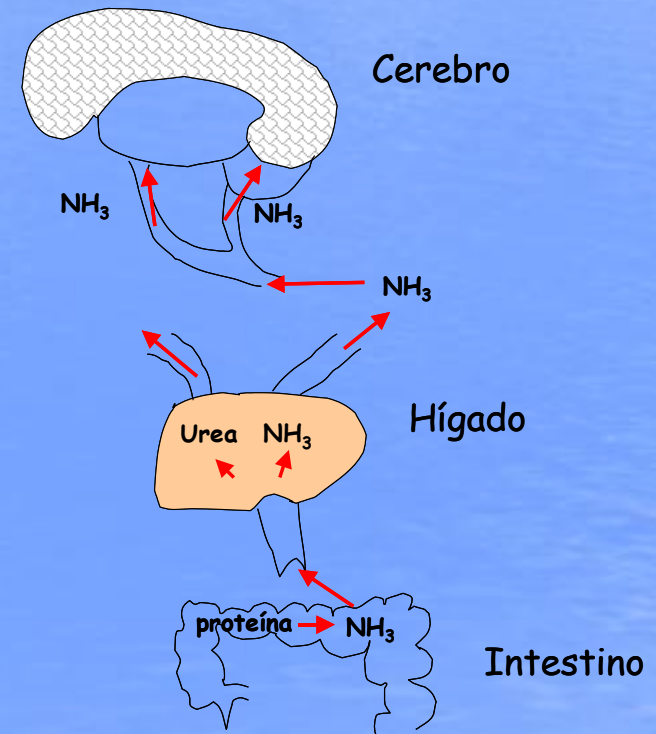
Reducción de los síntomas de la encefalopatía hepática

- Las bifidobacterias consumen sustancias nitrogenadas, el pH ácido inhibe a los microorganismos proteolíticos → evita la **formación de toxinas cerebrales**.

(Avery, Brogden y Davies, 1972; Matsumoto y col. 1990; De Preter y col. 2006)

	Amonio ($\mu\text{mol/g}$)		
	0 d	7d	Δ (%)
GOS	36.4	20.4	- 44
Lactulosa	46.1	38.8	- 16

Mizota y col. 1992; Ito y col. 1993





Modulación del sistema inmune

- El **mecanismo de acción** no se ha establecido. Hipótesis:
 - Las bacterias ácido lácticas, la pared celular o los componentes citoplasmáticos de las mismas penetran en las **células epiteliales intestinales** activando el **tejido linfático** asociado al mismo (Manning y Gibson, 2004).
 - FI prebióticas (6 g/L) → El nivel de **inmunoglobulina secretora A** tiende a aumentar (*Bakker-Zierikzee y col. 2006*)
 - Menor incidencia de **dermatitis atópica** (*Moro y col. 2006*)
 - Menor incidencia de **infecciones** de las vías respiratorias (*Bruzzese y col. 2004*)





Enfermedades intestinales crónicas

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

- Síndrome del **colon irritable (IBS)**

- Trastorno funcional del intestino: **dolor** crónico, recurrente o malestar abdominal **sin anomalías** estructurales.
- Síntomas: distensión abdominal, calambres, dolor, hinchazón, flatulencia y cambios en la frecuencia y la forma de las heces.
- Ingrediente prebióticos:

Modulan el tránsito por el intestino,

Disminuye la actividad de putrefacción,

Previene infecciones gastrointestinales

Mitiga la respuesta inflamatoria.

- Pocos estudios publicados → **mejoraron los síntomas**
- Son necesarios más estudios.



Enfermedades intestinales crónicas

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

- Enfermedades relacionadas con la **inflamación del colon (IBD)** → *colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn*
 - Causadas por una exacerbada **respuesta inmune** de la mucosa a la microbiota gastrointestinal en personas genéticamente susceptibles.
 - Estado de **disbiosis** → bajas concentraciones de bifidobacterias en el lumen y la mucosa,
 - El uso de **prebióticos** es prometedor
 - Aumenta el número de bifidobacterias
 - Aumenta la producción de AGCC
 - Favorece la formación de citoquinas inmuno-reguladoras.
 - Numerosos estudios piloto → beneficio potencial
 - Ningún estudio a gran escala concluyente.
 - Sin problemas de seguridad.



Efectos de los prebióticos sobre la salud

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

- **Oligosacáridos** prebióticos: los efectos beneficiosos para la salud son similares a los producidos por la ingesta de la **fibra alimentaria**:

- Incrementan el bolo fecal,
- Reducen el tiempo de tránsito intestinal,
- Controlan el nivel de glucosa
- Modulan el metabolismo de triglicéridos

(Roberfroid y Slavin, 2000; Santos, 2002).

- **Ventajas** adicionales:

- Requieren una dosis diaria más baja
- No causan diarrea si se consumen las cantidades recomendadas,
- Son ligeramente dulces, su textura y gusto es más agradable, solubles en agua, físicamente estables y fáciles de incorporar en alimentos y bebidas

(Tomomatsu, 1994).



OTROS POSIBLES PREBIÓTICOS



10 g /día :

- Estimulación significativa de bifidobacterias
- Disminución de clostridias (*Tuohy y col., 2002*)

Inconvenientes

- Sustrato de la microflora en los primeros tramos del colon
- Rápida fermentación.
- Gran producción puntual de gas



BÚSQUEDA DE NUEVOS PREBIOTICOS DERIVADOS DE LA LACTULOSA:

Mayor GP por lo tanto fermentarán en zonas más distales del colon.



❑ Hidrólisis y transgalactosilación DE LACTULOSA con β -galactosidasas de diferente origen

- ❑ β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*
- ❑ β -galactosidasa de *Aspergillus aculeatus*
- ❑ β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*

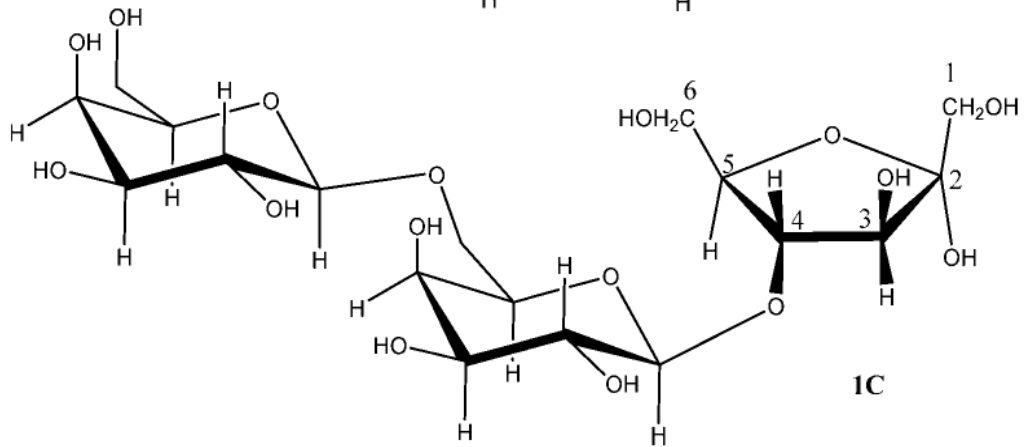
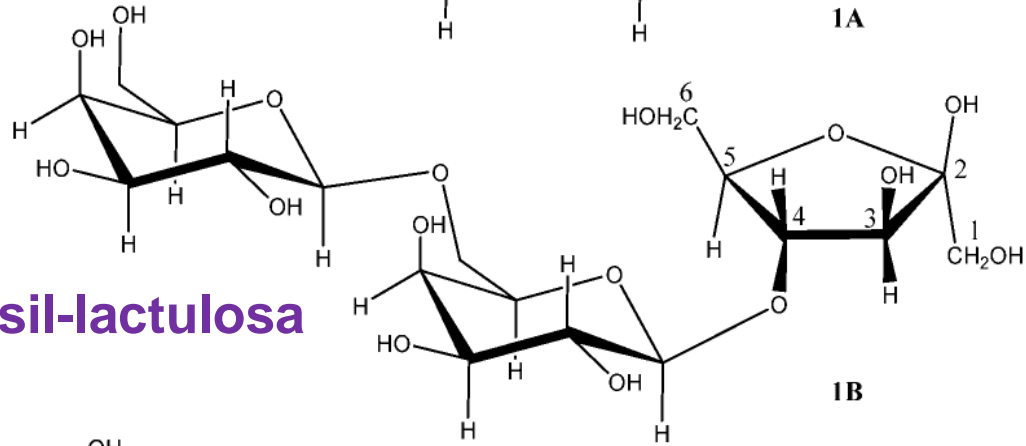
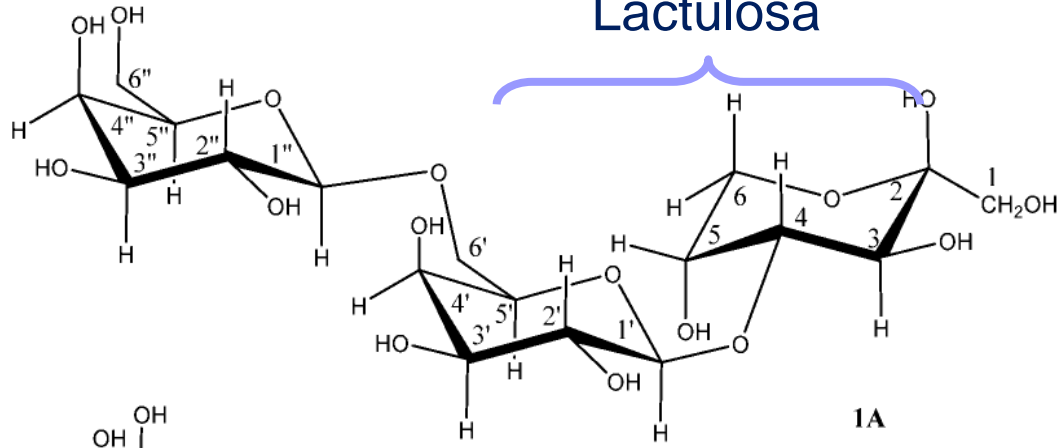
❑ Isomerización de galactooligosacáridos (GOS-La)

- ❑ Hidrólisis y transgalactosilación de la lactosa
- ❑ Isomerización de los GOS obtenidos



OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTULOSA

Lactulosa



6'-Galactosil-lactulosa

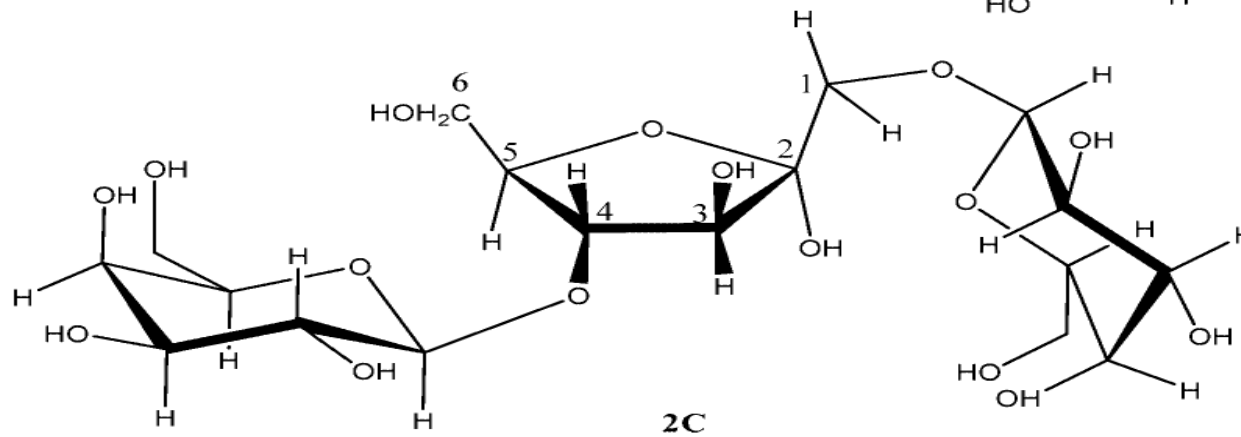
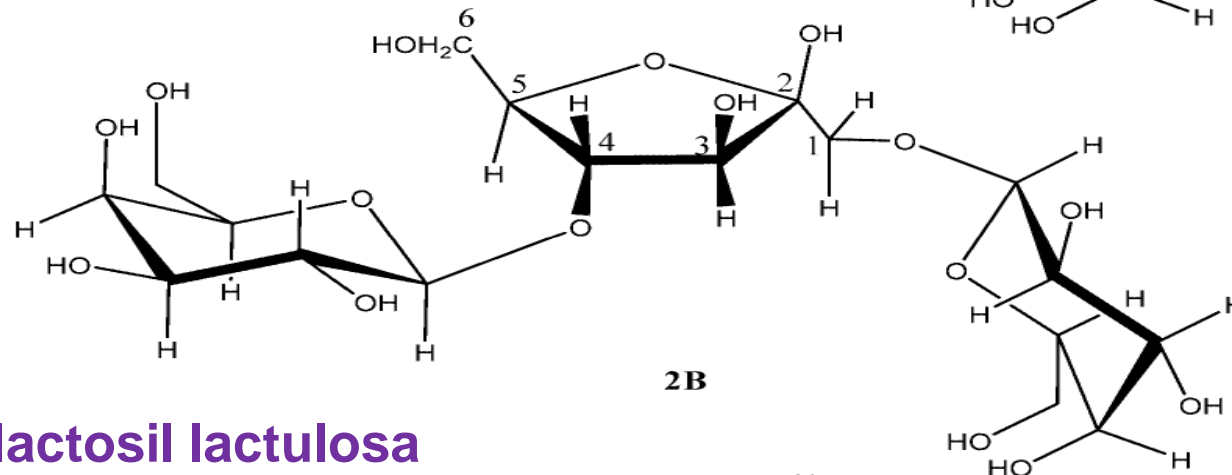
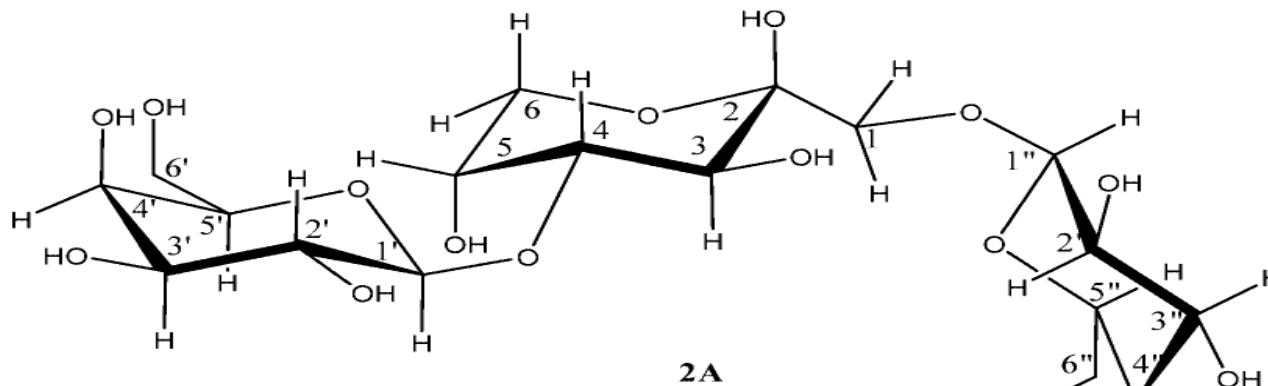


OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTULOSA

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación



1 Galactosil lactulosa

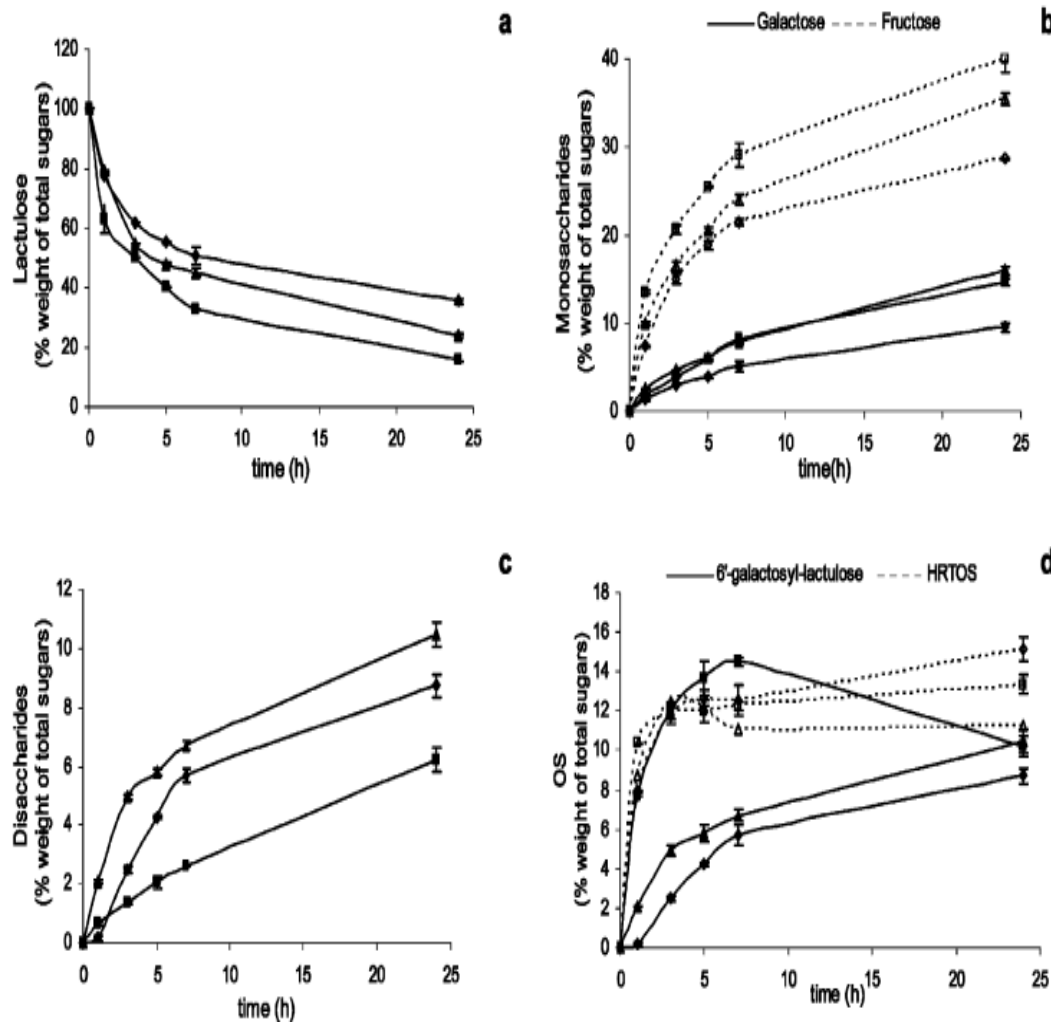


Figure 2. (a–d) Effect of temperature on oligosaccharide production during the enzymatic hydrolysis of lactulose (650 g/L) with Pectinex Ultra SP-L (16 units/mL) in 0.1 M buffer phosphate, pH 6.5: (◆) 40 °C; (▲) 50 °C; (■) 60 °C. HRTOS, high retention time oligosaccharides; OS, oligosaccharides.



OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTULOSA

Tabla R18.- Cambios en las poblaciones bacterianas (Log Células/mL) de los cultivos fecales in vitro tras 10 horas de incubación en presencia de los diferentes substratos e Índice prebiótico (PI) para dichas muestras.

Muestras	Bacterias totales	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Atopobium</i>	PI
0 h	9,24 (0,04) ^{ab}	7,83 (0,16) ^a	8,41 (0,15) ^{ab}	7,50 (0,12) ^a	8,56 (0,13) ^a	6,51 (0,28) ^a	8,25 (0,12) ^{ab}	
Lactulosa	9,27 (0,03) ^a	8,52 (0,29) ^b	7,98 (0,23) ^a	7,25 (0,01) ^{ab}	8,03 (0,15) ^{ab}	7,55 (0,09) ^b	7,86 (0,17) ^a	9,6
VivinalGOs	9,40 (0,05) ^{ac}	8,61 (0,24) ^b	8,24 (0,10) ^a	7,15 (0,10) ^{ab}	7,71 (0,46) ^{ab}	7,98 (0,18) ^{bcd}	8,26 (0,21) ^a	20,45
GOS-1	9,34 (0,08) ^{ac}	8,15 (0,06) ^a	8,15 (0,06) ^a	7,22 (0,21) ^{ab}	7,83 (0,36) ^{ab}	7,64 (0,13) ^{bd}	7,70 (0,08) ^a	9,63
GOS-2	9,36 (0,06) ^c	8,60 (0,25) ^b	8,44 (0,25) ^a	7,18 (0,07) ^{ab}	8,15 (0,14) ^a	7,76 (0,15) ^{bd}	8,01 (0,23) ^a	16,15
GOS-3	9,37 (0,07) ^{ac}	8,75 (0,2) ^b	8,24 (0,20) ^a	7,19 (0,095) ^{ab}	7,35 (0,11) ^b	7,59 (0,18) ^{cd}	7,82 (0,29) ^a	13,49
GOS-4	9,36 (0,11) ^{ac}	8,76 (0,18) ^b	8,22 (0,43) ^a	7,30 (0,23) ^b	7,73 (0,25) ^{ab}	7,49 (0,16) ^b	7,73 (0,05) ^c	12,59

*Letras distintas representan diferencias significativas con respecto al tiempo 0 ($P < 0,05$)

- GOS-1 y GOS-2 → Derivados de lactosa
- GOS-3 y GOS-4 → Derivados de lactulosa
- GOS-1 y GOS-3 → *Kluyveromyces lactis*
- GOS-2 y GOS-4 → *Aspergillus aculeatus*



OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTULOSA

Tabla R19.- Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) (mM) producidos después de 10 h de fermentación con lactulosa; fracciones de oligosacáridos derivados de lactosa (GOS-1, GOS-2) y lactulosa (GOS-3, GOS-4) y las fracciones de la mezcla comercial VivinalGOS (n=3) (A/P)= relación ácido acético/ácido propiónico).

	Ácido láctico	Ácido acético	Ácido propiónico	Ácido butírico	Ácido valérico	Relación A/P	Total
0h	3,50 (0,15)	2,94 (0,29)	1,25 (0,04)	-	-	2,35 (0,15)	7,69 ^a (0,25)
Lactulosa	11,46 (4,67)	23,37 (5,01)	11,00 (2,65)	1,7 (0,71)	0,60 (0,20)	2,12 (0,03)	46,13 ^b (2,15)
VivinalGOS	12,39 (3,93)	35,20 (3,45)	8,76 (4,65)	2,05 (1,17)	0,26 (0,09)	4,02 (1,46)	58,68 ^c (5,69)
GOS-1	5,61 (0,25)	10,25 (4,43)	1,99 (0,51)	-	-	5,15 (0,57)	17,86 ^a (4,64)
GOS-2	10,16 (3,57)	26,60 (4,90)	6,36 (3,47)	-	-	4,16 (1,30)	43,13 ^b (1,02)
GOS-3	11,96 (2,49)	32,52 (3,99)	12,73 (6,64)	-	-	2,55 (0,65)	57,23 ^c (1,07)
GOS-4	12,01 (2,73)	31,61 (3,72)	10,54 (4,64)	-	-	2,99 (0,71)	54,16 ^c (5,24)

*Letras distintas representan diferencias significativas con respecto al tiempo 0 ($P < 0,05$)

- GOS-1 y GOS-2 → Derivados de lactosa
- GOS-3 y GOS-4 → Derivados de lactulosa
- GOS-1 y GOS-3 → *Kluyveromyces lactis*
- GOS-2 y GOS-4 → *Aspergillus aculeatus*



OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTULOSA

Lu + *Aspergillus oryzae*

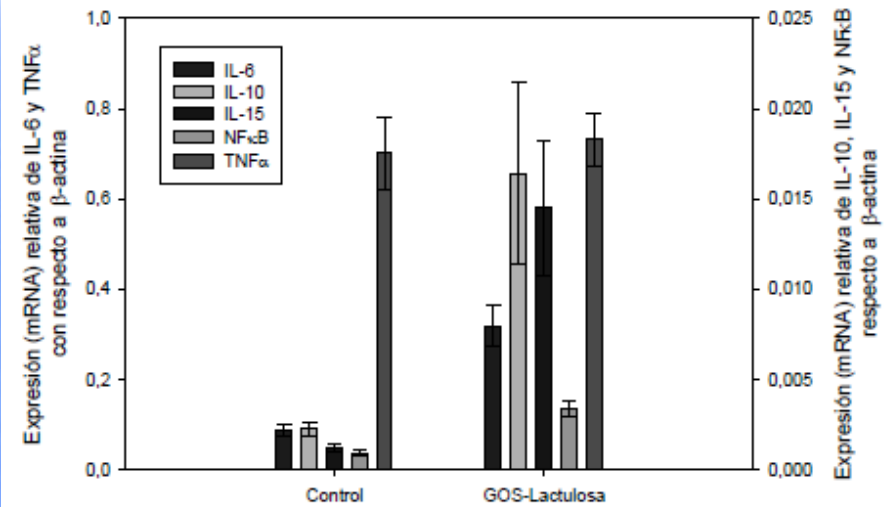
Capacidad inmunomoduladora

Actividad bifidogénica

Tabla 4. Grado de enriquecimiento (definido como número de bandas electroforéticas correspondientes al grupo de Bifidobacterias tras análisis de DGGE), así como los índices de Shannon y Evenness (relativos a la diversidad poblacional) de muestras procedentes de ciego de ratas tratadas con una dieta control, lactulosa, GOS-Lactosa o GOS-Lactulosa tras 14 días de tratamiento.

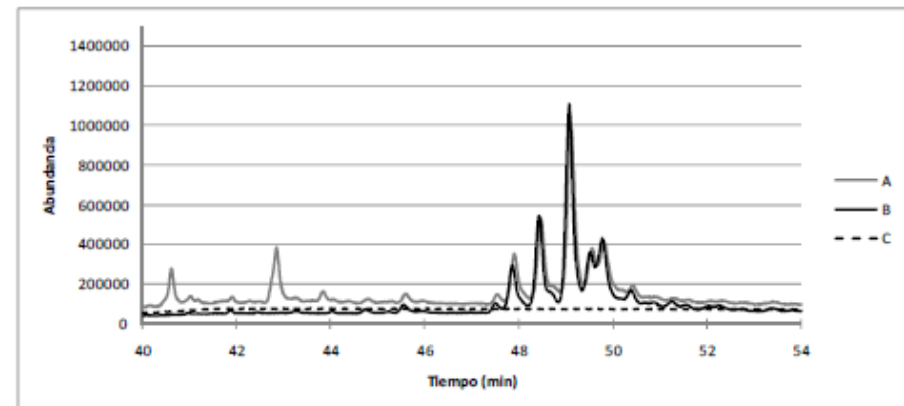
Muestras		Enriquecimiento (número de bandas electroforéticas)	Índice de biodiversidad Shannon	Índice de biodiversidad Evenness
Control	1.20	10	2.3	0.72
	1.22	9	2.2	0.69
	1.23	10	2.3	0.72
	1.19	8	2.08	0.65
	Media (SD)	9.25 (0.96)	2.22 (0.10)	0.70 (0.03)
Lactulosa	2.19	10	2.3	0.72
	2.20	10	2.3	0.72
	2.21	10	2.3	0.72
	2.23	11	2.4	0.75
	Media (SD)	10.25 (0.5)	2.33 (0.05)	0.73 (0.02)
GOS-Lactulosa	4.20	13	2.56	0.81
	4.22	13	2.56	0.81
	4.23	14	2.64	0.83
	4.24	12	2.48	0.78
	Media (SD)	13 (0.82)	2.56 (0.07)	0.81 (0.02)
GOS-Lactosa	5.1	9	2.2	0.69
	5.6	10	2.3	0.72
	5.7	10	2.3	0.72
	5.8	10	2.3	0.72
	Media (SD)	9.75 (0.5)	2.28 (0.05)	0.71 (0.02)

La Figura 10 muestra el efecto de los GOS-Lactulosa en la expresión (mRNA) de marcadores inmunológicos en secciones de íleon de los animales de experimentación (ratas Wistar). Los resultados se muestran como expresión relativa respecto a β -actina.



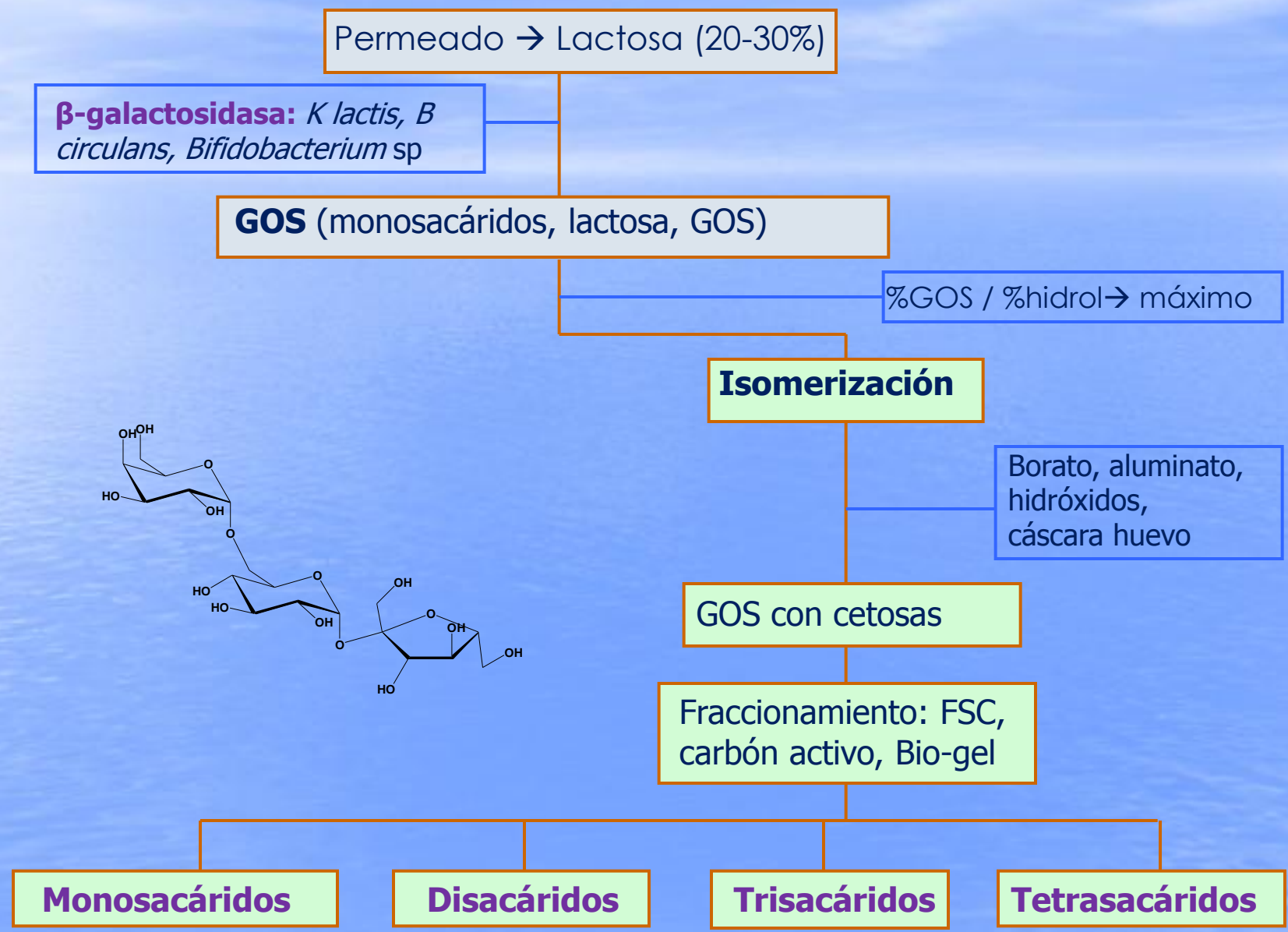
Resistencia muy elevada a la digestión gastrointestinal

La Figura 3 muestra los cromatogramas obtenidos tras análisis por GC-MS del contenido en trisacáridos: A) de GOS-Lactulosa en el íleon terminal del grupo de ratas que consumieron este producto, B) de GOS-Lactulosa en la dieta suministrada, y C) de GOS-Lactulosa en las heces del grupo de ratas que consumieron este producto.





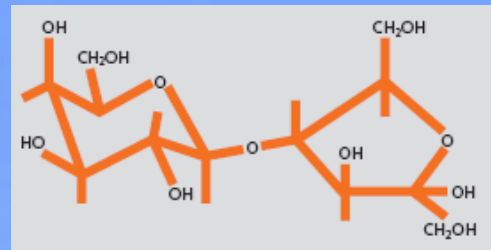
OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTULOSA





OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE LA LACTULOSA

- Vía isomerización
 - Lactosa → lactulosa
 - Galactosa → tagatosa
- # Los cambios conocidos son positivos:
 - ▣ **Lactulosa** → prebiótico reconocido
 - ▣ **Tagatosa**,
 - ▣ Favorece la producción de **ácido butírico**, metabolizado por el epitelio del colon y regulador de su desarrollo celular (*Salminen y col. 1998; Bertelsen, Jensen y Buemann, 1999*)





Oligosacáridos de la leche humana (HMOS)

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

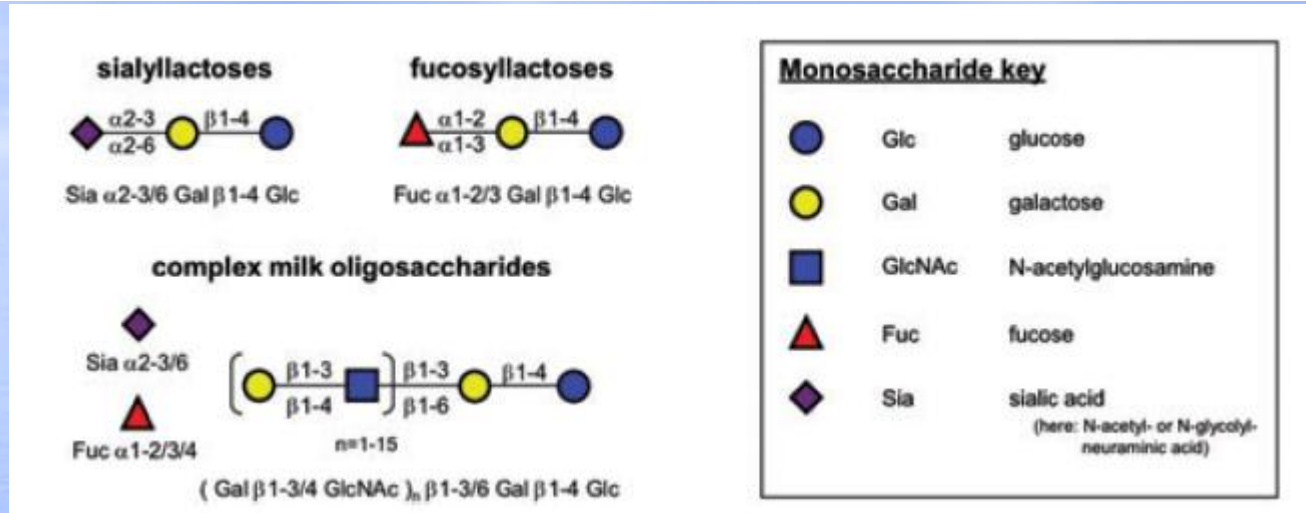
Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

- La leche humana contiene un gran número de oligosacáridos incluyendo GOS. Tienen un DP 3-10 (**8-12 g/L**)
- Sus estructuras no son totalmente conocidas pero se sabe que están formados por unidades **de glucosa, galactosa, fucosa, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina y ácido siálico**
- En contraste, la leche de vaca contiene muy pocos oligosacáridos
- Se ha demostrado que los HMOs son un factor muy importante para el control del **desarrollo intestinal** de los bebés
- **Efectos sistémicos** en el torrente sanguíneo
 - * Selectinas antiinflamatorio



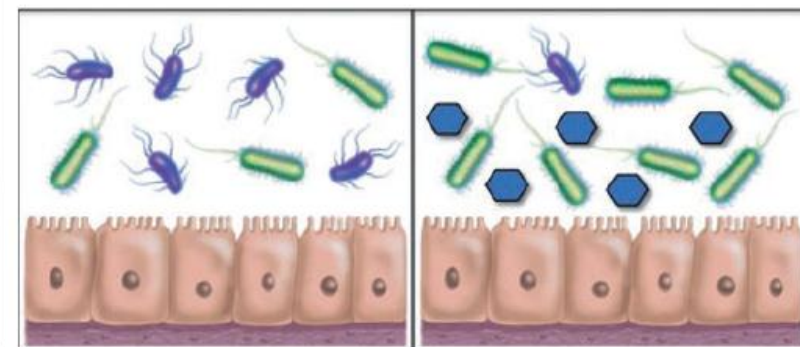
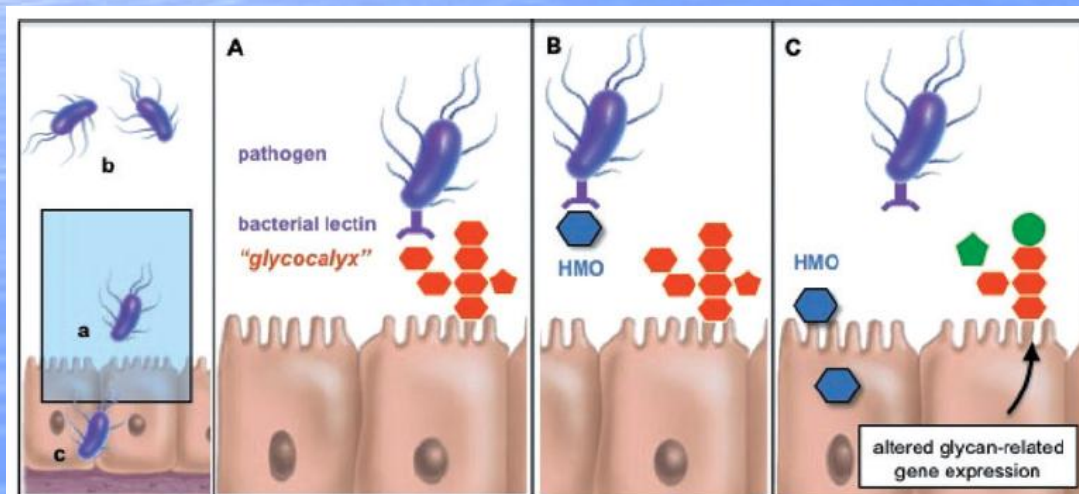
Oligosacáridos de la leche humana (HMOS)

Figure 1 Structural composition of milk oligosaccharides. Milk oligosaccharides can be short-chain trisaccharides, e.g., sialyllactose or fucosyllactose, or complex high-molecular-weight glycans.



Efecto antiadhesivo, (Bode, 2009)

Efecto prebiótico



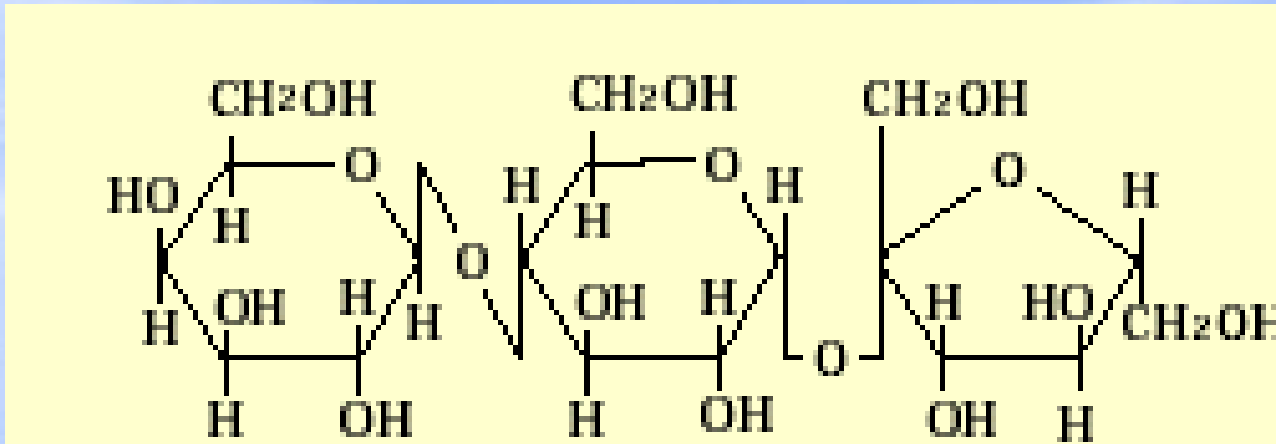


Obtención de otros Galactooligosacáridos

Enzima	sustrato	Galactooligosacáridos
α-galactosidasa <i>(Candida guilliermondi)</i>	Melibiosa <u>Lactosa</u> Maltosa Sacarosa	α -D-gal-(1→6)- α -D-gal-(1→6)- α -D-glu α -D-gal-(1→6)- β -D-gal-(1→4)- α -D-glu α -D-gal-(1→6)- α -D-glu-(1→4)- α -D-glu α -D-gal-(1→6)- α -D-glu-(1→2)- β -D-fru
β-galactosidasa <i>(Aspergillus oryzae, E. coli)</i>	Lactosa + N-acetil-lactosamina	β -D-gal-(1→6)-D-glcNAc β -D-gal-(1→4)-D-glcNAc
β-galactosidasa <i>(Bacillus circulans)</i>	Lactosa + Ac. Acetilneuramínico	β -D-gal-(1→8)-NeuAC β -D-gal-(1→9)-NeuAC β -D-gal-(1→3)- β -D-gal (1→8)-NeuAC
β-galactosidasa <i>(Bacillus circulans)</i>	Lactosa + Ac. Glucurónico	β -D-gal-(1→3)- glcUA β -D-gal-(1→4)- β -D-gal-(1→3)-glcUA



LACTOSACAROSA



β -D-Gal (1-4)- α -D-glu-(1-2)- β -D-fru

--Presente en **yogures** que contienen sacarosa como edulcorante

--Se forma a partir de **lactosa y sacarosa** por transfructosilación



--Industrialmente se obtiene a partir de una mezcla equimolecular de sacarosa y lactosa utilizando la **β -fructofuranosidasa + levadura** deficiente en invertasa

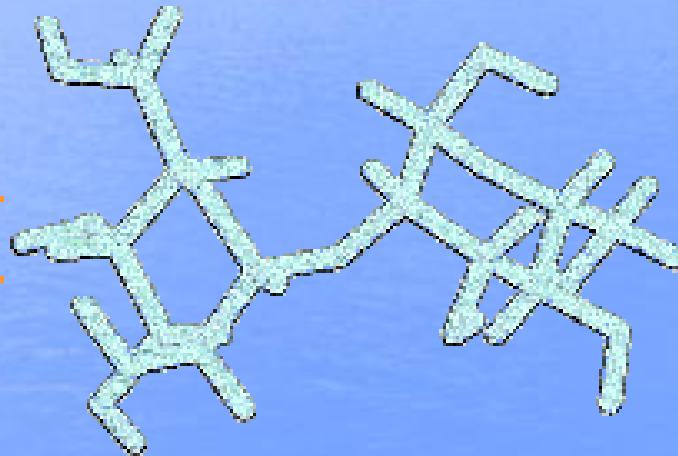
--Se obtienen sirupos con un 55% de lactosacarosa



LACTOSACAROSA

Increased bio-availability of minerals

Reduced risk of colon cancer



Reduction in cholesterol and blood lipids

Prevention of GI tract infections



2- α -D-glucopiranosil-D-lactosa

Synthesis and Characterization of a Potential Prebiotic Trisaccharide from Cheese Whey Permeate and Sucrose by *Leuconostoc mesenteroides* Dextranucrase

Marina Díez-Municio,[†] Antonia Montilla,[†] M. Luisa Jimeno,[‡] Nieves Corzo,[†] Agustín Olano,[†] and F. Javier Moreno^{*†}

- Dextranucrase (EC 2.4.1.5) de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F
- Sacarosa y permeado de suero
- Trisacárido potencialmente bioactivo
- Rto del 50% respecto a la lactosa inicial
- Caracterizado por RMN

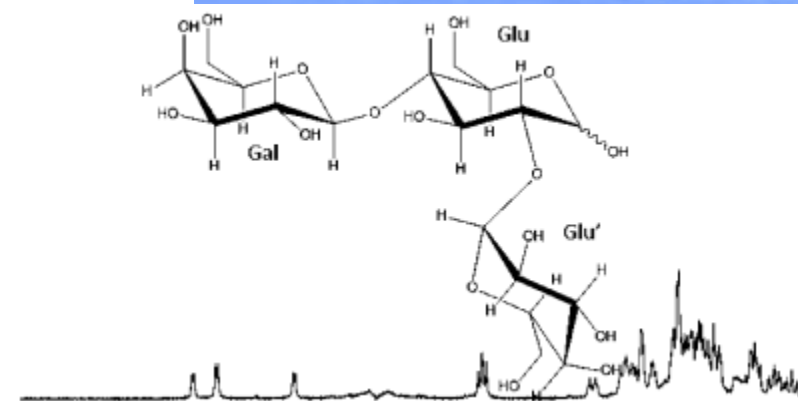
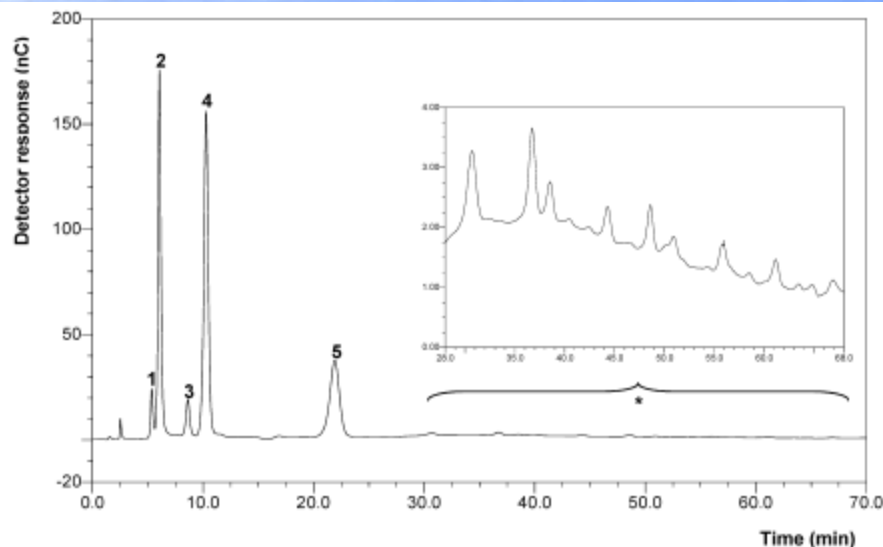
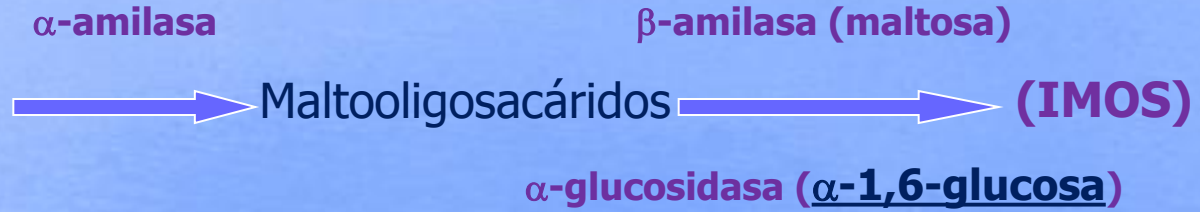
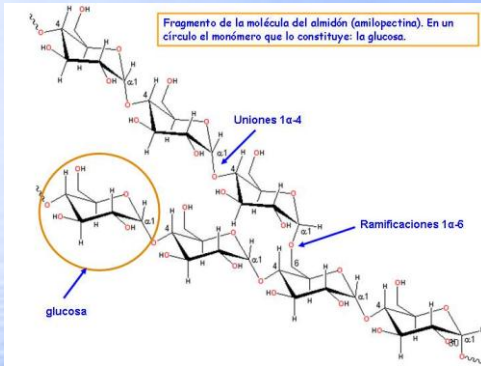
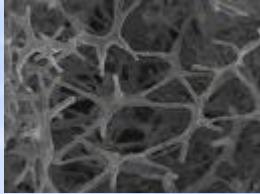


Figure 3. HPAEC-PAD profile of transglycosylation reaction based on sucrose:lactose (30%:30%) catalyzed by dextranucrase from *L. mesenteroides* B-512F (0.8 U mL⁻¹) at 30 °C, in 20 mM sodium acetate buffer at pH 5.2, for 24 h. Labeled peaks are as follows: 1, glucose; 2, fructose; 3, leucrose; 4, lactose; and 5 (2- α -D-glucopyranosyl-lactose). *The inset shows a zoom area of the eluted minor acceptor-reaction products of degree of polymerization above 3.



Isomalto-oligosacáridos (IMOS)

-- Se producen a partir del **almidón** utilizando dos etapas enzimáticas
(*Showa Sangyo Ltd*)



almidón

- Mejoran las características higroscópicas y reológicas de los productos a los que se incorporan
- Previenen la caries: inhiben la síntesis de glucanos por parte de *Streptococcus mutans*



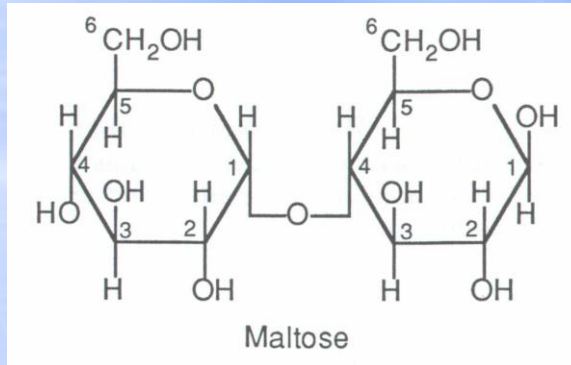
Presentes en soja, miel, sake
Parcialmente digeridos





Maltooligosacáridos (MOS)

- Son carbohidratos que tienen 2-7 unidades de **glucosa** unidas por α -1, 4

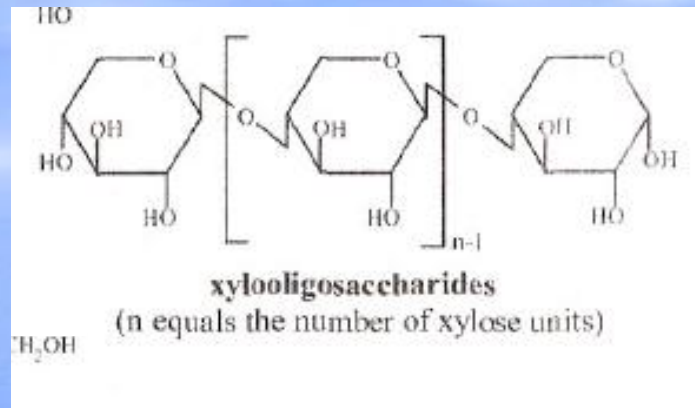


- Su ingestión mejora el estado del colon en el hombre
- Jarabes ricos en maltotetraosa reduce niveles intestinales de *Clostridium perfringens* y enterobacterias
- Son **hidrolizados** por enzimas digestivas: no son considerados prebióticos estrictos
- Alta solubilidad, viscosidad elevada, bajo poder edulcorante, no son higroscópicos:
 - Aglomerantes
 - Sustitutos de grasas
 - Mejorantes de textura
 - Espesantes



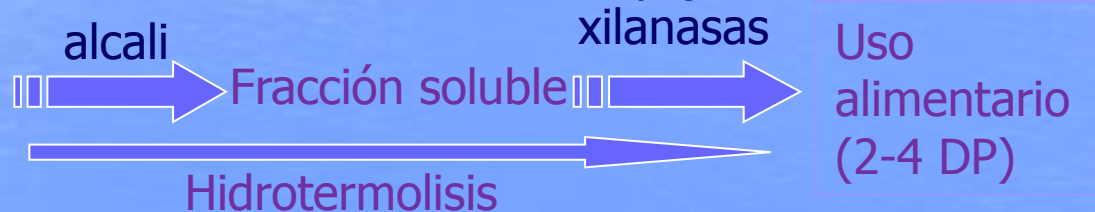
Xilooligosacáridos (XOS)

-- Son polímeros de D-xilanos formados por **β -1, 4 xilosas**



-- Presentes en bamboo, mieles, frutas...

-- Se producen a partir de mazorcas de maíz, madera, paja, bagazo, salvado



-- En humanos se ha visto que aumentan el número de bifidobacterias

-- Resultados contradictorios en ratones



Oligosacáridos de la soja (SOS): α -galactósidos



-- Ensayos *in vitro* e *in vivo* han indicado un aumento en el número de bifidobacterias tras su ingestión



Carácter prebiótico de distintos oligosacáridos

Recuento bacteriano (\log_{10} ufc/g) durante la fermentación de distintos prebióticos en cultivo durante 5h / 24h con heces.

Grupo	Inoculo	FOS	Inulin	XOS	Lactulosa	IMO	GOS	SOS
Totales	10.62	10.88/10.72	<u>10.98/10.60</u>	10.90/10.65	10.81/10.62	10.81/10.57	10.86/10.65	10.88/10.51
Bifidobacteria	9.61	<u>10.28/10.23</u>	<u>10.20/10.06</u>	<u>10.42/10.26</u>	<u>10.40/10.35</u>	<u>10.37/10.35</u>	<u>10.33/10.33</u>	<u>10.39/10.27</u>
Clostridios	9.08	<u>9.76/8.70</u>	9.40/8.92	<u>9.64/8.90</u>	9.47/8.70	9.04/8.79	9.26/ <u>8.43</u>	9.24/ <u>8.58</u>
Bacteroides	9.51	<u>10.15/9.77</u>	<u>10.01/9.76</u>	<u>10.07/9.85</u>	<u>10.09/9.72</u>	<u>10.05/9.80</u>	<u>10.01/9.70</u>	<u>10.03/9.81</u>
Lactobacilos	9.08	<u>9.52/9.07</u>	9.02/9.06	8.93/8.94	8.88/8.89	9.03/8.77	9.03/8.7	9.23/9.13
Estreptococos	8.46	8.75/8.57	8.71/8.67	8.67/8.77	8.34/8.44	8.61/8.5	8.56/8.43	8.48/8.49
Coliformes	8.25	8.57/8.49	<u>8.86/8.78</u>	8.61/8.26	<u>8.69/8.33</u>	8.50/8.24	8.52/8.10	8.47/8.15



Carácter prebiótico de distintos oligosacáridos

IP determinado en CULTIVOS al 1% , pH 7.0

Carbohidrato	IP (5 horas)	IP (24 horas)
FOS	-0.95	2.31
Inulina	0.36	1.82
XOS	-0.05	2.19
Lactulosa	1.34	<u>4.90</u>
IMO	1.46	3.95
GOS	1.39	3.76
SOS	1.47	4.36



Carácter prebiótico de distintos oligosacáridos

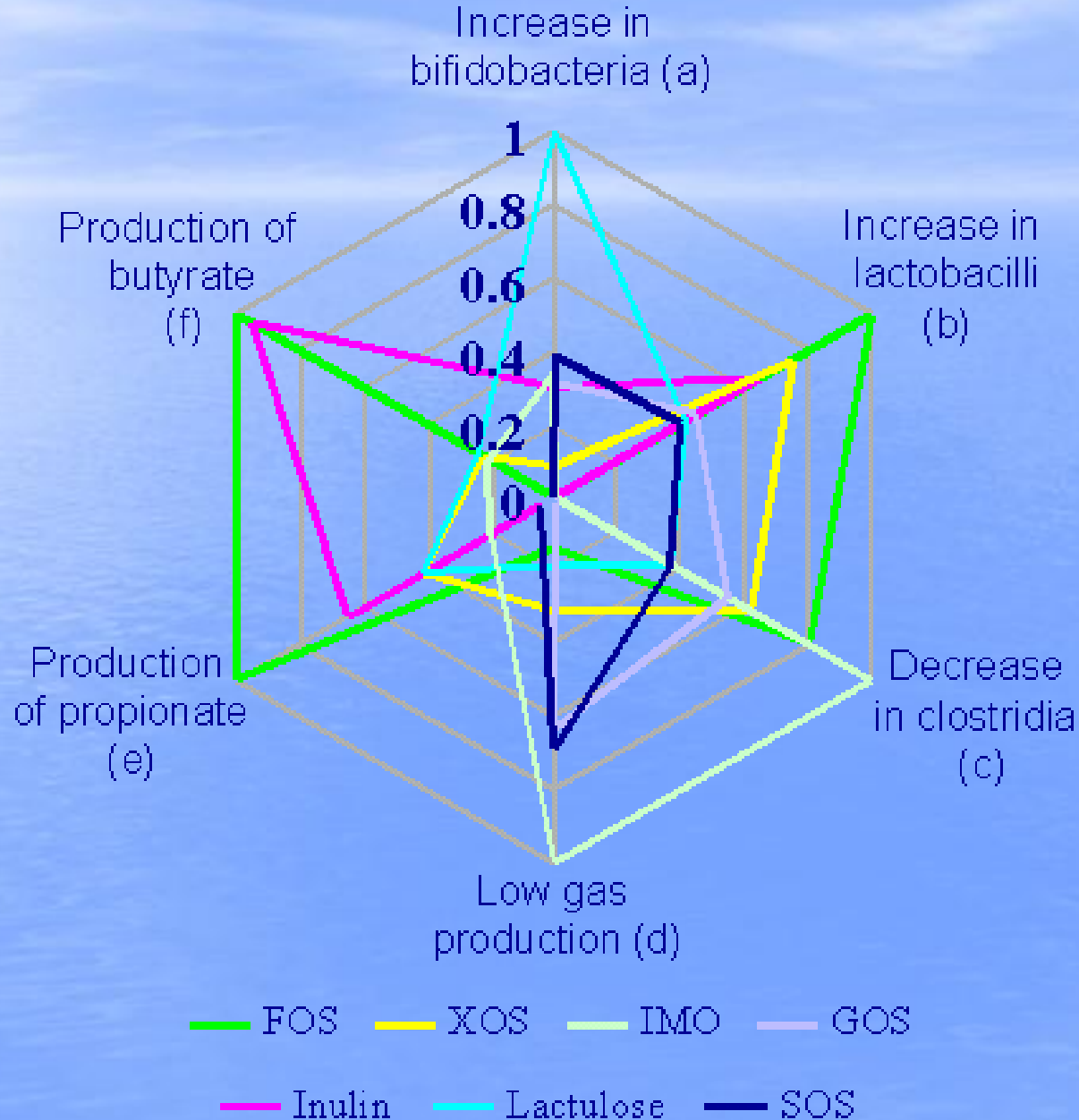
Producción de ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico (mmol/l) durante la fermentación de distintos prebióticos en cultivo durante 5h / 24h con heces.

Acido	FOS	Inulin	XOS	Lactulosa	IMO	GOS	SOS
Láctico	3.7/10.12	4.71/12.09	7.30/17.91	7.72/ <u>24.34</u>	7.6/10.35	10.17/ <u>23.0</u>	9.64/8.90
Propiónico	2.14/6.96	2.27/ <u>7.59</u>	5.39/ <u>7.21</u>	2.82/ <u>7.43</u>	4.99/5.22	5.21/5.22	5.58/5.64
Acético	18.75/29.1	14.76/22.2	15.15/26.7	17.78/ <u>38.9</u>	33.69/ <u>39.4</u>	20.11/ <u>36.0</u>	18.92/ <u>32.8</u>
Butírico	1.34/ <u>3.50</u>	2.20/ <u>4.20</u>	1.73/1.75	1.58/1.51	1.65/1.52	1.52/1.15	1.52/1.20

Fructo-oligosacáridos (FOS); xilo-oligosacáridos (XOS); Isomalto-oligosacáridos (IMO); galacto-oligosacáridos (GOS); Oligosacáridos de soja (SOS)
C.E Rycroft y col. J. Appl. Microbiol. 91, 878 (2001)



Carácter prebiótico de distintos oligosacáridos





LOS PREBIÓTICOS EN LA INDUSTRIA



Alimentos funcionales

- Futuro muy **prometedor**, los problemas de salud crecen
- **Enfermedades** con importante componente dietético → cardiovasculares, cáncer de colon, osteoporosis, obesidad
- Estudio del impacto de la **dieta en la salud**
- Preocupación por el bienestar y la dieta
- Alimentos funcionales en 2002 → 50 billones de dólares (*Playne y col. 2003*)





Los prebióticos en la industria

- Binomio **alimentación-salud**
 - Países **industrializados**: avances tecnológicos y nuevos conocimientos científicos → producción de alimentos funcionales
 - Países **en desarrollo**: alimentos con potencial para prevenir enfermedades como las infecciones intestinales
- Múltiples posibilidades:
 - **Ingredientes** con actividad biológica
 - Eliminación o **modificación** de constituyentes
 - Amplia gama de productos comercializados (Olano y Juárez, 2005).
- Los consumidores necesitan información
 - **Criterios científicos** en los que se basan sus potenciales beneficios para la salud
 - Propiedades de cada alimento



Alimentos para la función gastrointestinal

Interés hacia la función gastrointestinal (años 90)

Entrada masiva en el mercado

PROBIÓTICOS



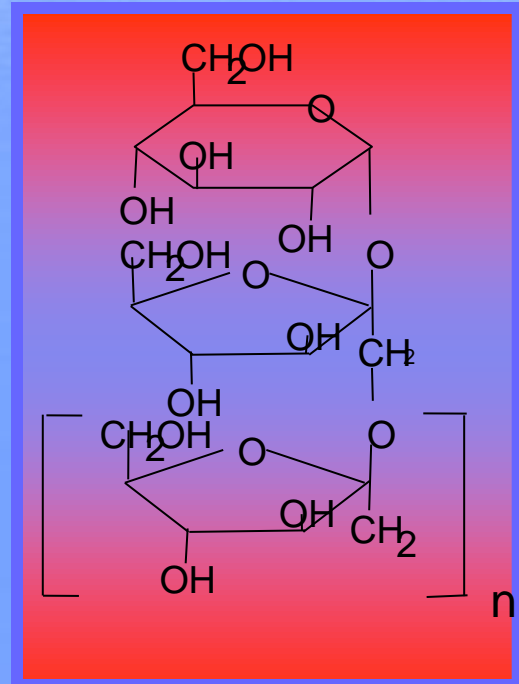
Lactobacilos



Bifidobacterias

PREBIÓTICOS

Carbohidratos

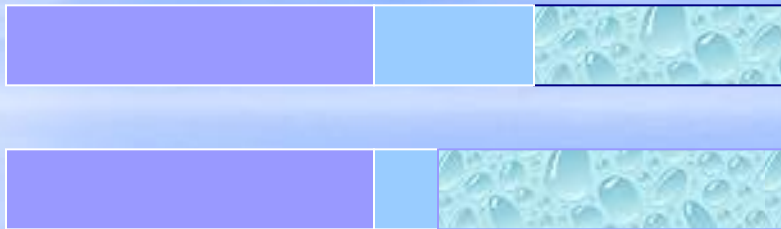


SIMBIÓTICOS



Composición de lactulosa comercial

siropes



agua

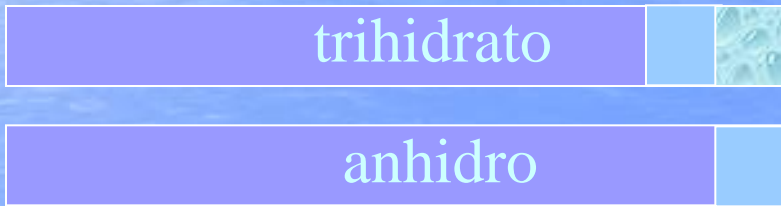


Otros carbohidratos



lactulosa

**Productos
en polvo**



0 50 100
concentración (% , w/w)





Alimentos simbióticos con lactulosa

- **Yogures** LB con lactulosa, aumentan el número de *L acidophilus* y *B bifidum* y puede prevenir la flatulencia. Laxante suave
(Ozer, Akin y Ozer, 2005)
- **Leche fermentada:** desnatada concentrada (11% lactosa):
B infantis (dosis terapéutica: 10^7 ufc/mL) → $2 \cdot 10^9$ ufc/mL)
GOS **11g/L** GOS (Roy y col. 2002)





Productos con lactulosa



Applications of lactulose

Food and nutrition

- infant formula
- health foods



Infant formula



Soft drink



Yogurt

→ La adición de 0,5% de Lu a **leche de soja** favorece el crecimiento de *B longum*, *B animalis* y lactobacilos, que transforman los **glicósidos de isoflavonas**, fisicoquímicamente inactivos, en **aglicones de isoflavonas**, con actividad estrogénica reconocida.



Productos con lactulosa



Example of product



4g Lactulose
350mg Calcium
175mg Magnesium
/2 sachets/day
For postmenopausal women



Productos con lactulosa



Applications of lactulose

Pharmaceuticals

- for hepatic encephalopathy
- for chronic constipation



Syrup form



Powder form



Productos con lactulosa



Applications of lactulose

Animal feed

- piglets
- cattle
- dogs and cats



Dog food



Cat milk



Glicosidasas. Preparados enzimáticos comerciales

- **Glicosidasas:** microorganismos, plantas y animales, dependiendo sus propiedades de su origen (*Mahoney, 1998*).
- **Microorganismos**, ventajas: fácil manipulación, gran velocidad de multiplicación y gran rendimiento en la producción.
 - **β -galactosidasas**
 - *Kluyveromyces latis*: Maxilact (DMS Food Specialities) y Lactozym (Novozymes)
 - *Aspergillus oryzae*: Biolacta
 - *Bacillus circulans*: Biolacta
 - **β -Fructosidasas:**
 - *Aspergillus aculeatus*: Pectinex Ultra SP-L (Novozymes). Extracto multienzimático (actividad pectinolítica, **β -galactosidasa**, fructosidasa...)



β -galactosidasas. Preparados enzimáticos comerciales

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación

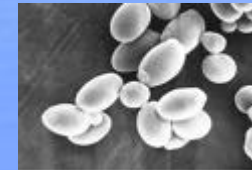
Preparados enzimáticos comerciales con actividad β -galactosidasa

Obtención leches bajas en lactosa

Maxilact (DMS Foods Specialities)

Lactozym (Novozymes)

Extractos puros de β -galactosidasas de
Kluyveromyces lactis



Biolactasa-NTL (Biocon) → *Bacillus circulans*

Lactase 14DS (Biocon) → *Aspergillus oryzae*





GOS comerciales

Tabla I5. – Galactooligosacáridos comerciales (modificado de Gibson y col., 2000).

Producto	Presentación	Contenido en oligosacáridos (p/p)	Fabricante
Vivinal GOS	Jarabe (75% de carbohidratos) Polvo	57% (jarabe) 29% (polvo)	Friesland Food Domo, Netherlands
Bimuno	Polvo y Jarabe	52% (polvo)	Clasado Ltd.
Oligomate 55	Jarabe (75% de carbohidratos)	>55%	Yakult Honsha Co. Ltd, Japan
Oligomate 55P	Polvo	>55%	Yakult Honsha Co. Ltd, Japan
TOS-100	Polvo	>99%	Yakult Honsha Co. Ltd, Japan
Cup-Oligo H-70	Jarabe (75% de carbohidratos)	70%	Nissin Sugar Manufacturing Co. Ltd, Japan
Cup-Oligo P	Polvo	70%	Nissin Sugar Manufacturing Co. Ltd, Japan

(Gibson y col., 2000)



GOS comerciales

INDUSTRIAS: mezclas de tri-, tetra-, penta-, hexa-sacáridos

β -Galactosidasas de distinto origen:

BIMUNO: *Bifidobacterium bifidum* : GOS enlaces $\beta(1\rightarrow3)$

CUP-OLIGO: *Cryptococcus laurentii*

VIVINAL GOS: *Bacillus circulans*

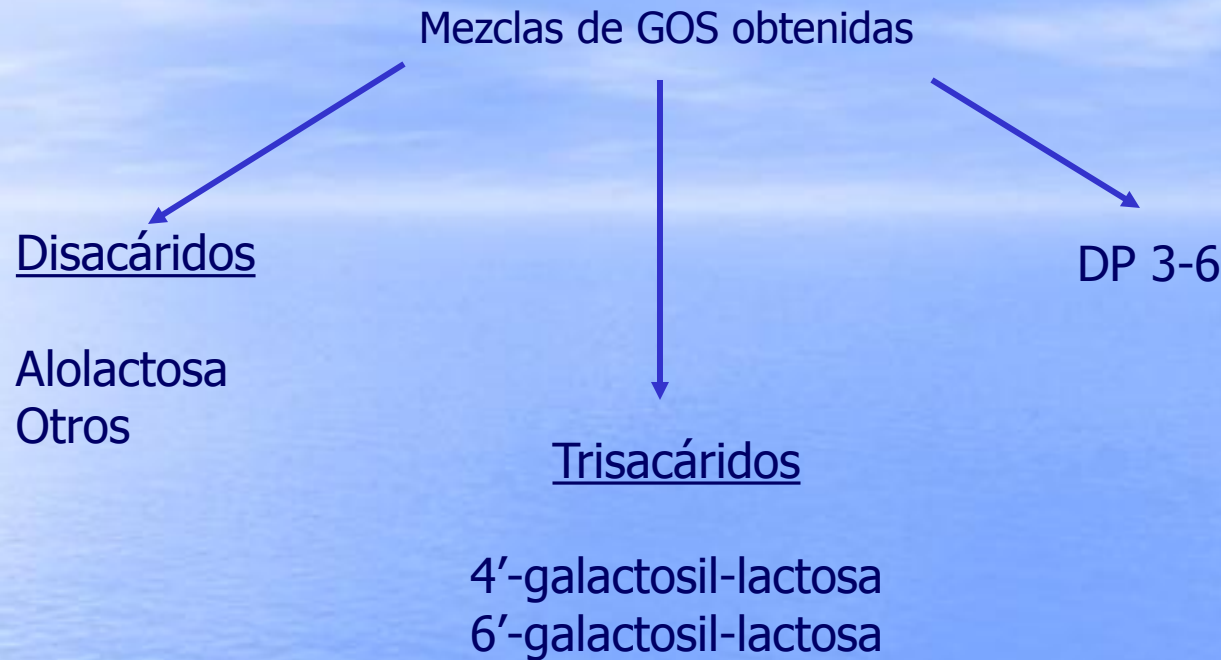
} GOS con enlaces
 $\beta(1\rightarrow4)$

OLIGOMATE *Aspergillus oryzae* y *Streptococcus thermophilus*:

{ GOS con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$
 $\beta(1\rightarrow6)$



GOS comerciales



Ejemplo, **Oligomate 55** (*Aspergillus oryzae* y *Streptococcus thermophilus*):

Puede utilizarse como conservador: viscosidad y presión osmótica

-36% de tri-, tetra, penta- y hexagalactooligosacáridos,

-16% de disacáridos galactosa-glucosa, galactosa-galactosa

-38% monosacáridos

-10% de lactosa

JAPÓN: Yakult Onza y Snow Brand

EUROPA: Borculo Whey Products



GOS comerciales

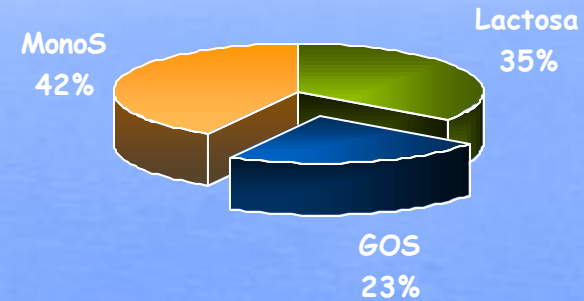
- Mezclas muy **estables** a la temperatura y el pH
 - 160°C 10 min pH 2
 - Almacenamientos largos a temperatura ambiente (pH ácido)
- Mayor estabilidad que los FOS
- **Reacción de Maillard** no parece afectar a la actividad prebiótica
(*Hernández-Hernández, 2011*)
- Se utilizan como edulcorantes solos o en productos lácteos fermentados, pan, mermeladas, bebidas...



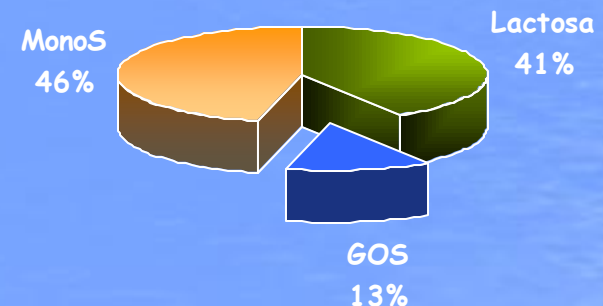


Alimentos con GOS

Leche desnatada con GOS
(La 167 g/L)



Mazada en polvo con GOS



- Leche concentrada baja en lactosa y con GOS; lactosa inicial 16,7 %, *Aspergillus oryzae*
(Chen, Hsu y Chiang, 2002)
- Mazada en polvo con GOS, lactosa inicial: 24,1%;
Kluyveromyces lactis
(Curda y col. 2006)
- Leche baja en lactosa (90% hidrolizada) → 10 g/L GOS
(Ruiz-Matute y col. 2012)



INULINA Y OLIGOFRUCTOSA

- Europa → Orafti, "BENEO™"
 - En el envase aparece: "garantiza que ese producto contiene la cantidad suficiente de inulina y oligofruktosa para tener un efecto positivo en tu sistema digestivo".





Alimentos simbióticos

- Mezclas de **pro y prebióticos** → afectan beneficiosamente al huésped mejorando la supervivencia e implantación de los probióticos y de la flora presente en el tracto gastrointestinal
- No se han **caracterizado** con detalle
- Pueden tener efecto **sinérgico**
- La mayor parte de las combinaciones: oligofructosa
- En Japón y Europa se están empezando a comercializar leches fermentadas con probióticos y **GOS o lactulosa** adicionados
- Bifidobacterias + FOS ó GOS reduce el **cáncer de colon** en animales de experimentación más eficazmente

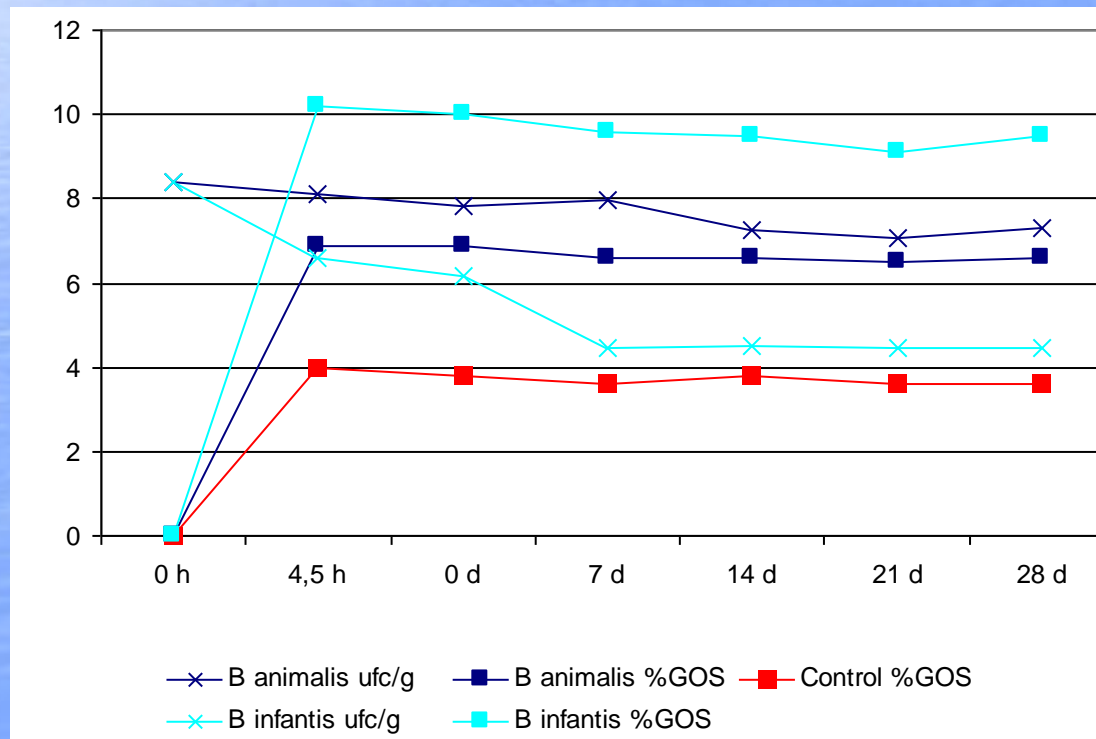




Alimentos simbióticos con GOS

- Yogur con bifidobacterias preincubadas (1.5 h a 50°C) y el cultivo habitual → GOS max 10% (*Lamoureux, Roy y Gauthier, 2002*)

x Bifidobacterias (log ufc/g) ■ Formación de GOS (%)





Ingesta de prebióticos

- Administración de los prebióticos, aspectos de seguridad
 - **Consumo excesivo** (> 20g/día en adultos) → diarrea osmótica, molestias intestinales, flatulencia
 - **Dosis segura** ~0,3 g/Kg peso corporal
(Tuohy y col. 2003)
 - Ingestas de **10 g/día** de oligosacáridos no provoca efectos secundarios importantes

(Bouhnik y col. 2004):

Oligosacárido	Exceso de flato	Hinchazón	Expulsión de gases	Dolor abdominal
Placebo	2.63	0.25	2.25	1.25
FOS	3.88	2.38	2.25	1.50
Inulina	5.25	2.63	1.13	1.25
GOS	3.63	1.38	0.75	1.00
Lactulosa	5.75	1.63	1.13	1.25

0, sin síntomas; 1-7, medios; 8-14, moderados; 15-21, severos



Ingesta de prebióticos

- **Dosis** adecuada para dar lugar a propiedades bifidogénicas:
 - Varía dependiendo del tipo de oligosacárido

≤ 15 g/día → incremento de bifidobacterias en el colon

- **Efecto** bifidogénico:
 - Nivel inicial de bifidobacterias
 - Edad del individuo → Ancianos: 2,5 g/día GOS
 - Estado de salud → Individuos sanos: 10 g/día GOS
- Cuestión: **tiempo** que persiste el efecto bifidogénico (*Bouhnik y col., 1997*).
 - En animales hasta que deja de administrarse el prebiótico (*Santos y col., 2006*).



TENDENCIAS EN INVESTIGACIÓN SOBRE PREBIÓTICOS

*La relación entre la **flora intestinal** y el mantenimiento de la **salud** y prevención de enfermedades ha sido demostrada, así como la eficacia de los **prebióticos***



Posibles líneas de evolución

ESTRUCTURA/FUNCIÓN: Influencia de los enlaces glicosídicos

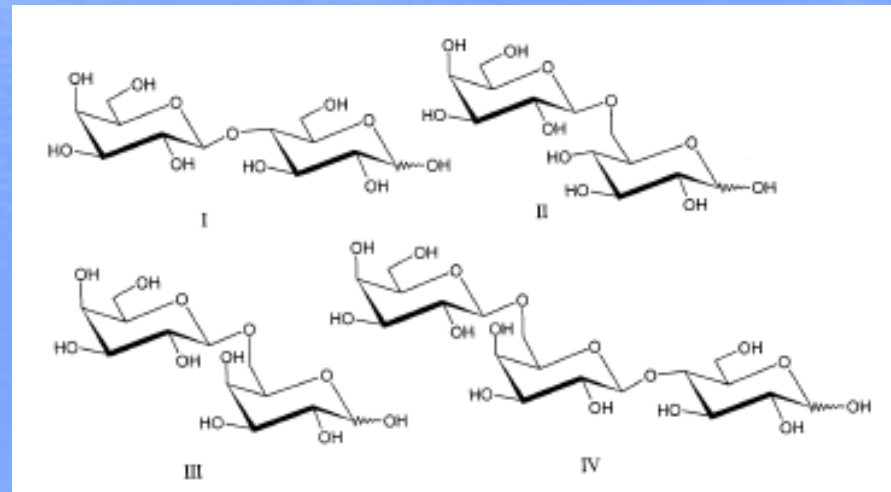
- ➔ Búsqueda de **nuevos** oligosacáridos con propiedades prebióticas mejoradas:
- ➔ Oligosacáridos con la misma configuración anomérica pero distinto **enlace glicosídico** poseen diferentes propiedades de fermentación. No todos los **monosacáridos** actúan del mismo modo con respecto a la flora intestinal y sus rutas metabólicas varían con las **especies**
- ➔ *Transgalacto*-oligosacáridos (TOS) con enlaces $\beta(1-6)$ y $\beta(1-3)$ han mostrado ser selectivamente fermentados por bifidobacterias de forma más rápida que oligosacáridos con enlaces $\beta(1-4)$



Posibles líneas de evolución

ESTRUCTURA/FUNCIÓN: Influencia del peso molecular

- GP → Velocidad de fermentación y zona del colon
 - Mayor GP → más lentos → colon descendente
 - Mayor área de fermentación sacarolítica → mejor absorción de minerales



I: Lactosa
II: Allolactosa
III: 6'galactobiosa
IV: 6'galactosil-lactosa



Posibles líneas de evolución

ESTRUCTURA/FUNCIÓN: Influencia del peso molecular

- * Polisacáridos: son fermentados por las bacterias del colon y actúan como fibra, pero no son necesariamente selectivos.
- Prebióticos: son oligosacáridos con excepción de la inulina.
 - **FOS** se metabolizan más rápido que la **inulina**.
 - **Xilano**: no se metabolizan selectivamente en el intestino. Los **xilo-oligosacáridos**, son prebióticos comerciales en el mercado japonés.
- IMOs de DP3 tienen mayor actividad prebiótica que IMOs de DP2.
- Determinadas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* no son capaces de usar FOS DP5, aunque pueden emplear los correspondientes tri- y tetrasacáridos.



Posibles líneas de evolución

- **Mezclas de prebióticos** para su uso secuencial por parte de la microflora:
 - La actividad bacteriana varía según los sustratos disponibles, el potencial red-ox, pH, O₂ presente

Colon ascendente:
abundancia de
nutrientes, crecimiento
rápido, producción de
AGCC → pH ácido



Colon descendente:
menos nutrientes,
menor crecimiento,
mayor pH



Posibles líneas de evolución

- **Mezclas de prebióticos** para su uso secuencial por parte de la microflora
 - La dosis y el pH del medio afectan a la actividad de los prebióticos (*Palframan, Gibson y Rastall, 2002*)

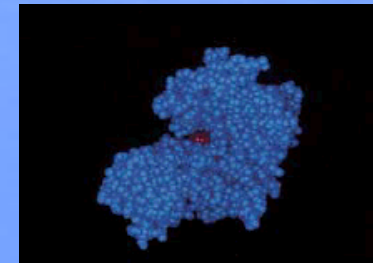
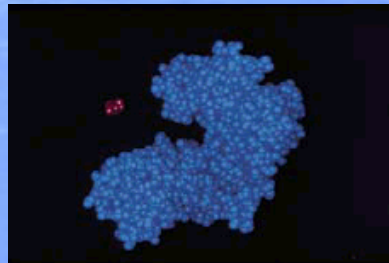
Sustrato	Condiciones (pH / p/v)	incremento ufc/mL 0h y 24 h					
		Totales	Bifidobacterias	Bacteroides	Lactobacilos	Clostridia	IP
FOS	6.8 / 1%	0.28	0.63	- 0.24	0	0.04	1.73
GOS	6 / 2%	0.42	1.19	- 0.20	- 0.20	0.18	5.19
Lactulosa	6 / 2%	0.39	1.05	-0.31	0.15	0.11	4.68

- FI con mezclas 9/1 de GOS/inulina → determinación de la zona de influencia en el colon
- Estudio de condiciones óptimas de actuación de otros prebióticos → asociaciones sinérgicas y alcance



Posibles líneas de evolución

- Optimización del proceso de obtención de GOS
 - Enzimas más eficaces → GOS > GP y > rendimiento
 - Glicosintasas → sintetizan oligosacáridos sin hidrolizarlos (*Jakeman y Withers, 2002; Perugino y col. 2005*)
 - Búsqueda de nuevas glicosintasas → relación $k_{\text{trans}}/k_{\text{H}_2\text{O}} > 20$
 - Sustratos → azúcares no modificados
 - Glicosiltransferasas, estereoespecíficas, altos rendimientos (*Barreteau, 2006*)
 - En cultivos celulares → azúcar como sustrato

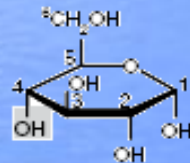


- Acoplamiento de reacciones para eliminar lactosa
- Sistemas de inmovilización sin problemas de transferencia de masa.

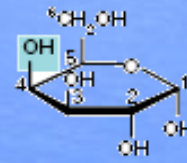


Posibles líneas de evolución

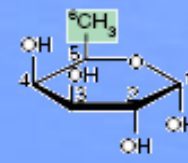
- **Prebióticos similares a los oligos. de leche humana**
 - Previenen la adhesión de patógenos a la pared intestinal (*Kunz y Rudloff, 2006*)
 - Para FI maternizadas
 - Combinación de enzimas: glicosiltransferasa y β -galactosidasa en cultivos celulares y monómeros simples como sustratos



Glucose

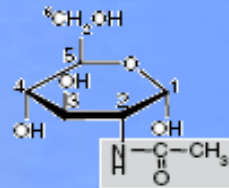


Galactose

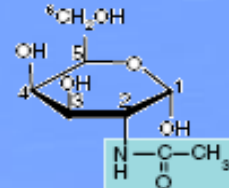


Fucose

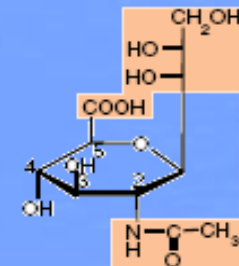
Monómeros presentes
en los oligosacáridos de
Leche humana



N-Acetyl-glucosamine



N-Acetyl-galactosamine



N-Acetyl-neuraminic acid
= sialic acid



Tendencias en investigación sobre prebióticos

→ Sistemas de fraccionamiento de mezclas complejas de oligosacáridos más baratos y eficaces

Técnicas	Fraccionamiento por	
	Peso molecular	Enlaces y/o composición
Carbón activo	XXX	–
SEC	XXX	–
IEC	XX	–
Membranas	XX	–
Levaduras	X	XX
SFE	?	XX (?)
PLE	?	XX (?)



Fácilmente automatizable, uso en industria

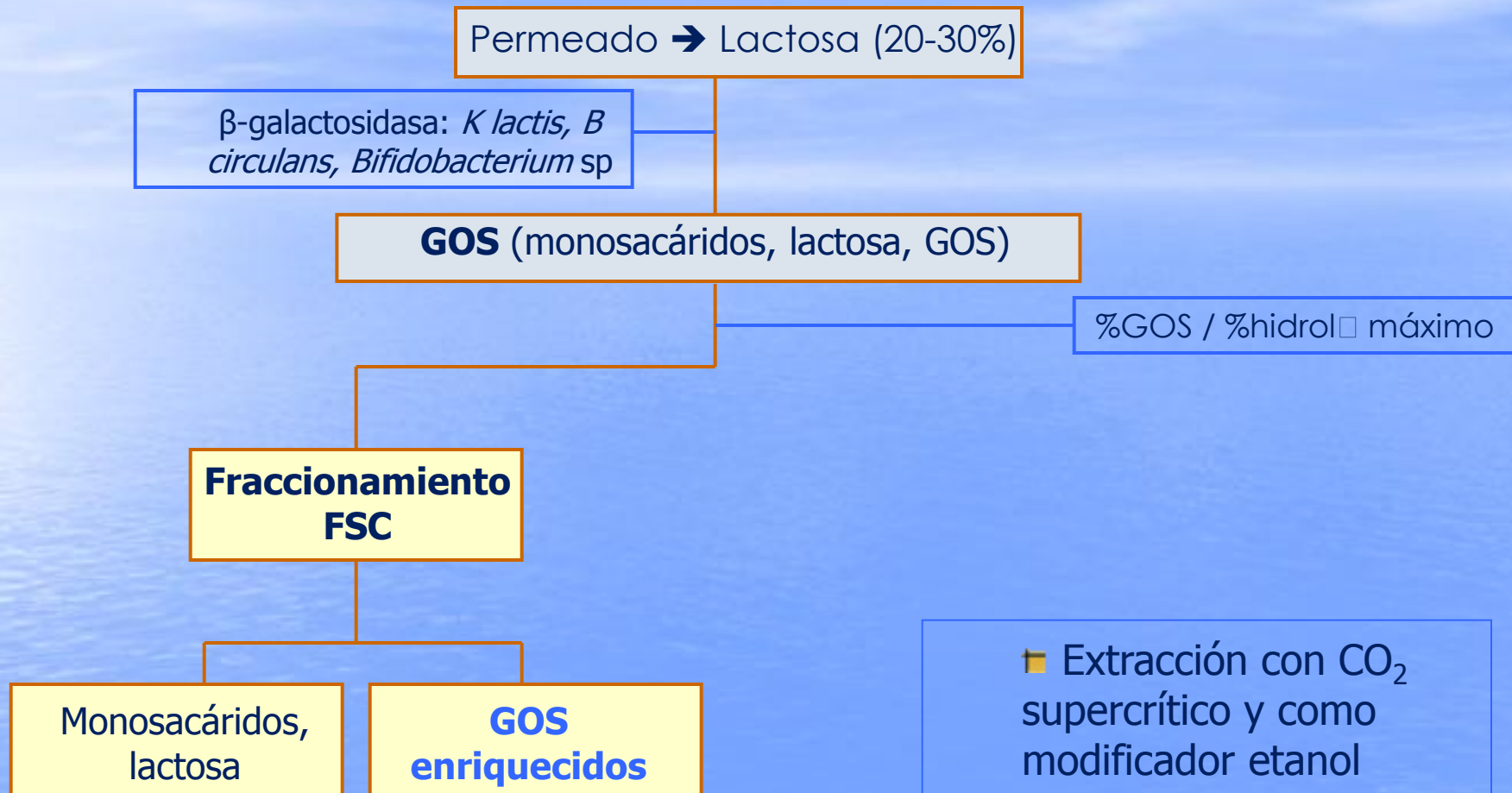


Búsqueda de nuevos carbohidratos prebióticos

CIAL

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Investigación en
Ciencias de la Alimentación



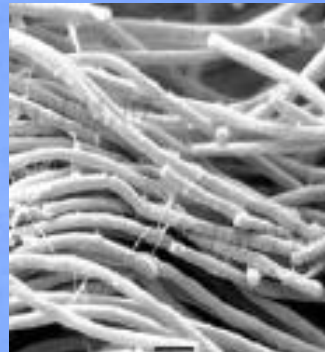
■ Extracción con CO₂ supercrítico y como modificador etanol

(Montañés y col. 2008)



Posibles líneas de evolución

- Efecto de los prebióticos en el metabolismo **a nivel de especie.**
 - Desarrollo de **alimentos simbióticos** con prebióticos y probióticos específicos → mejorar supervivencia de probióticos (*Hernández-Hernandez, y col., 2012*)
- Estudio de **especies de otros géneros** beneficiosos, como eubacterias productoras de ácido butírico, hay cepas proteolíticas





Tendencias en investigación sobre prebióticos

-- No se debe hacer generalizaciones para todos los prebióticos ni todas las personas:

-- Elaboración de ingredientes específicos según la **edad**

Para **ancianos** → disminuye el número de bifidobacterias a partir de 55-60 años

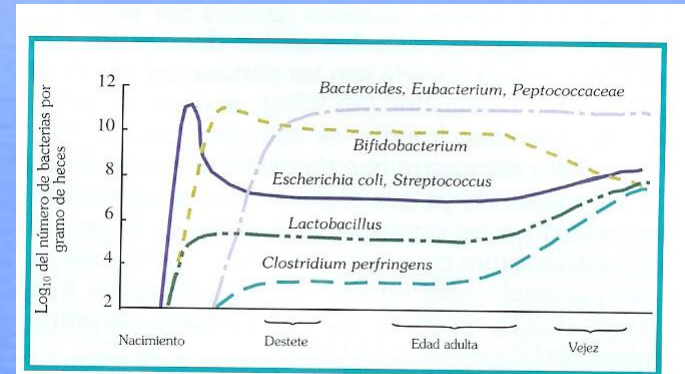


Fig. 1. Cambios de la flora intestinal desde el nacimiento hasta la vejez (Mitsuoka, 1984).

-- Personas con **enfermedades gastrointestinales**

-- Mujeres **postmenopáusicas**

-- Estudio de sustratos endógenos con propiedades prebióticas (mucinas) para mimetizarlos



Tendencias en investigación sobre prebióticos

→ Efecto de los prebióticos sobre:

* **Fisiología del huésped:**

- Desarrollar métodos aplicables al estudio de la **microflora en humanos**
- Caracterizar la microflora normal y sus **actividades** en personas sanas de todas las edades
- Identificar **cambios** en la composición de la microflora y actividades asociadas con las principales disfunciones del intestino
- Identificar **factores dietéticos** que conducen a cambios en la microflora y los **mecanismos** que conducen a una mejora de la salud.

* **Flora la mucosa gastrointestinal:**

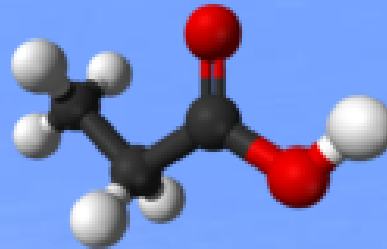
- Desarrollar nuevas **metodologías** para estudiar la función y cambios en la **mucosa** en humanos
- Caracterizar la **flora** asociada con la mucosa sana



Tendencias en investigación sobre prebióticos

→ Producción de **AGCC** por la flora intestinal:

- **Mecanismo de producción** de las poblaciones bacterianas intestinales anaerobias, porqué producen diferentes cantidades y proporciones de AGCC
- **Papel del butirato** en la diferenciación celular y el crecimiento de las células epiteliales del intestino, particularmente los genes implicados y la respuesta de los mismos
- Papel del **acetato** en el metabolismo y su regulación
- **Velocidad** de producción de AGCC *in vivo* y su relación con la producción de hidrógeno y el crecimiento microbiano.





Tendencias en investigación sobre prebióticos

→ Dieta, cáncer y sistema inmune:

- Determinar el papel de la **flora** con respecto a la **carcinogénesis**
- Mecanismos de **modulación** por prebióticos y probióticos
- Desarrollo de nuevos **biomarcadores** de carcinogénesis colorectal
- Influencia de la dieta y de la flora en **alteraciones del DNA** en la mucosa intestinal.
- Estudio del **tejido linfocítico asociado al intestino** (GALT), herramientas para su análisis
- Estudio de la influencia de los **factores dietéticos** y la flora intestinal sobre la regulación de la **función inmune** en individuos sanos y enfermos
- Desarrollo de **biomarcadores** para la función inmune



Tendencias en investigación sobre prebióticos

Modo de actuación de los prebióticos:

- El consumo de ingredientes bioactivos benefician la salud
 - Numerosos estudios *in vitro*, con animales y clínicos
- El **mecanismo de actuación** no está en muchos casos consolidado.
 - **Complejidad** de las múltiples interacciones entre los constituyentes de los alimentos durante el proceso digestivo y las repercusiones en el metabolismo de los mismos
 - Los diferentes estilos de vida, edad, estado de salud y hábitos alimentarios entre poblaciones e individuos
- Un ingrediente bioactivo no es necesariamente **eficaz para todos** los consumidores
- Multitud de aspectos de la relación alimentación/salud requieren investigación

En resumen → La modificación de la flora mediante la dieta ofrece una gran oportunidad para el desarrollo de alimentos funcionales



Herramientas para el desarrollo de prebióticos



Herramientas para el desarrollo de Prebióticos

- Técnicas **biotecnológicas** para su obtención
- Conocimiento del **metabolismo** de los oligosacáridos por parte de la microflora intestinal

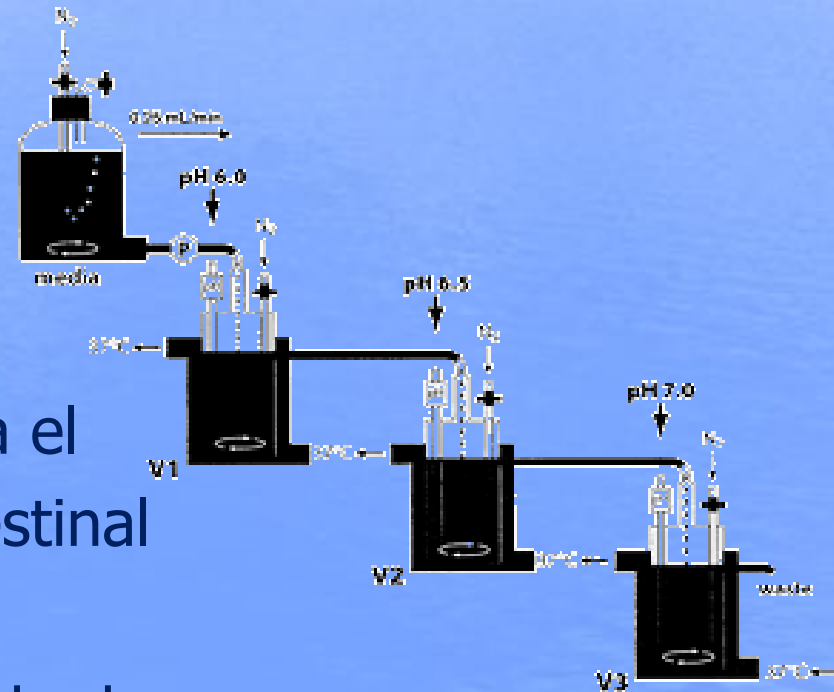
V_1 : Colon ascendente

V_2 : Colon medio

V_3 : Colon descendente

- Técnicas **moleculares** para el análisis de la microflora intestinal

- Técnicas **analíticas** más potentes
(HPAEC-MS; HILIC-MS)





TÉCNICAS LA DETERMINACIÓN DEL CARÁCTER PREBIÓTICO: ESTUDIOS *IN VITRO*

FERMENTACIÓN



Cultivos puros

Cultivos mixtos



- Información del comportamiento individual de las bacterias



- Competitividad bacteriana



Microorganismos del TGI
(beneficiosos y perjudiciales)



Inóculos fecales

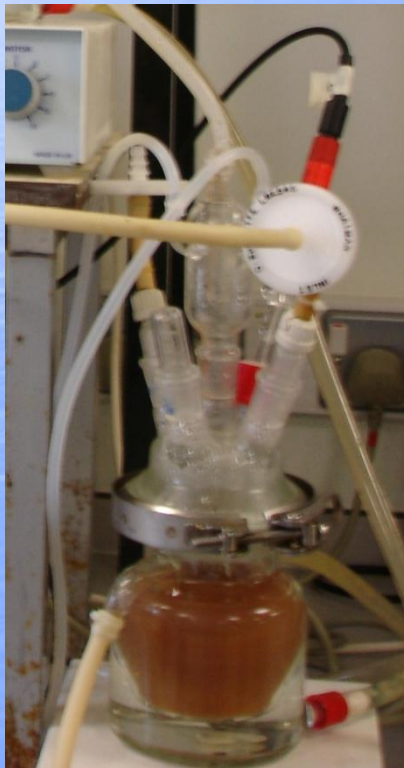


TÉCNICAS LA DETERMINACIÓN DEL CARÁCTER PREBIÓTICO: ESTUDIOS *IN VITRO*

Sistemas de cultivo

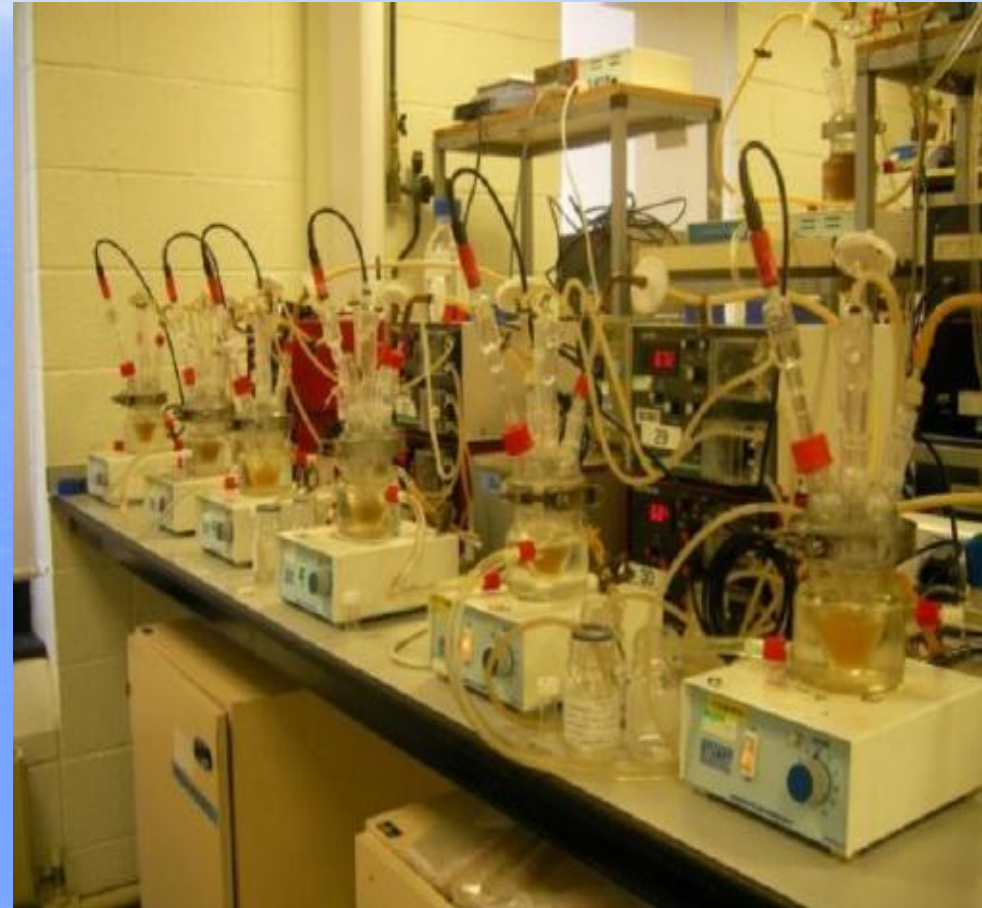
Disolución
Heces + PBS
(1:10)

Carbohidratos



Medio basal

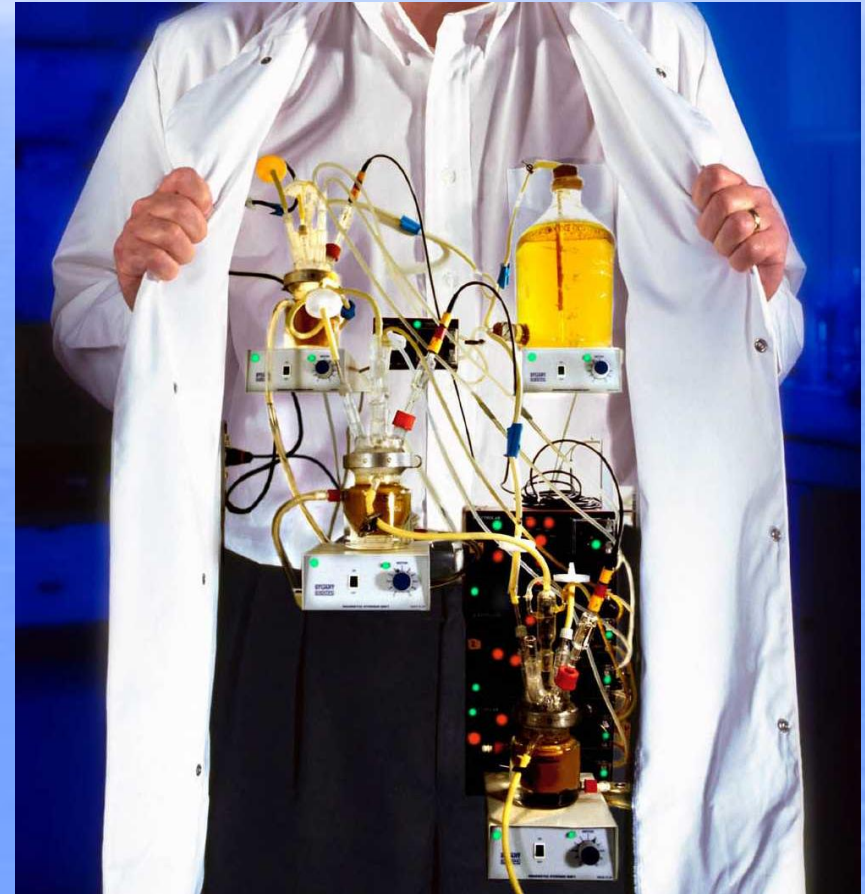
37 °C





TÉCNICAS LA DETERMINACIÓN DEL CARÁCTER PREBIÓTICO: ESTUDIOS *IN VITRO*

- **Quimiostato,**
 - Sistema modelo del intestino
 - Proximal, transversal y distal
 - Ajuste de los parámetros físico-químicos
 - Validado





TÉCNICAS LA DETERMINACIÓN DEL CARÁCTER PREBIÓTICO: ESTUDIOS *IN VIVO*

- Experimentación **animal**: ratas, ratones, cerdos, primates, ...
 - Gnobióticas
 - Inoculadas con flora fecal humana (HFA)
- Estudios en **humanos**:
 - Inconveniente → solo se dispone de las **heces**
 - No representativas de todo el intestino
 - Difíciles de analizar → Técnicas de Biología Molecular
 - Pacientes con **ileostomia** conocimiento de la absorción y/o degradación de prebióticos en el estómago y en el intestino.





TÉCNICAS LA DETERMINACIÓN DEL CARÁCTER PREBIÓTICO: ESTUDIOS *IN VIVO*

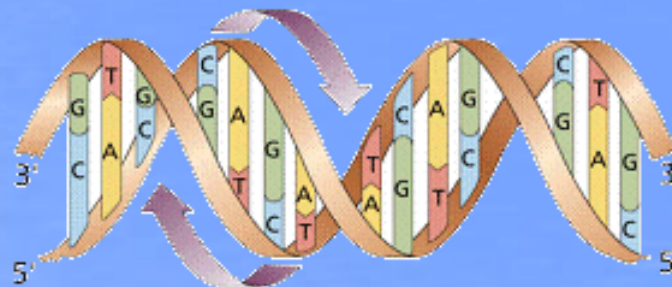
- **Ensayos clínicos aleatorios y controlados (RCTs)** para el estudio de:
 - La absorción de minerales
 - El metabolismo lipídico
 - El cáncer de colon
 - El sistema inmune
 - Dosis efectivas en cada caso

Para obtener evidencias de los efectos beneficiosos de los prebióticos son necesarios más ensayos clínicos randomizados doble ciego con placebo y controlados



TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS

- Técnicas tradicionales de **recuento** en cultivos
 - Muchos microorganismos no pueden ser detectados, no todas las bacterias son cultivables
- Técnicas de Biología Molecular: proporcionan mayor información y fiabilidad. Usan como moléculas diana el ARNr 16S
 - Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (**q-RT-PCR**)
 - Fluorescencia con hibridación *in situ* (**FISH**): filogenia, morfología, localización, abundancia y actividad de las bacterias.

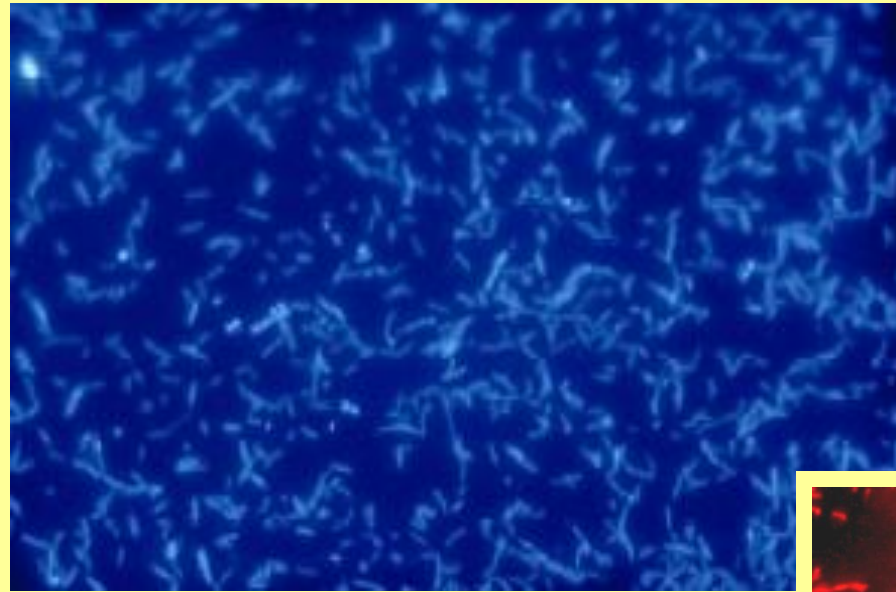




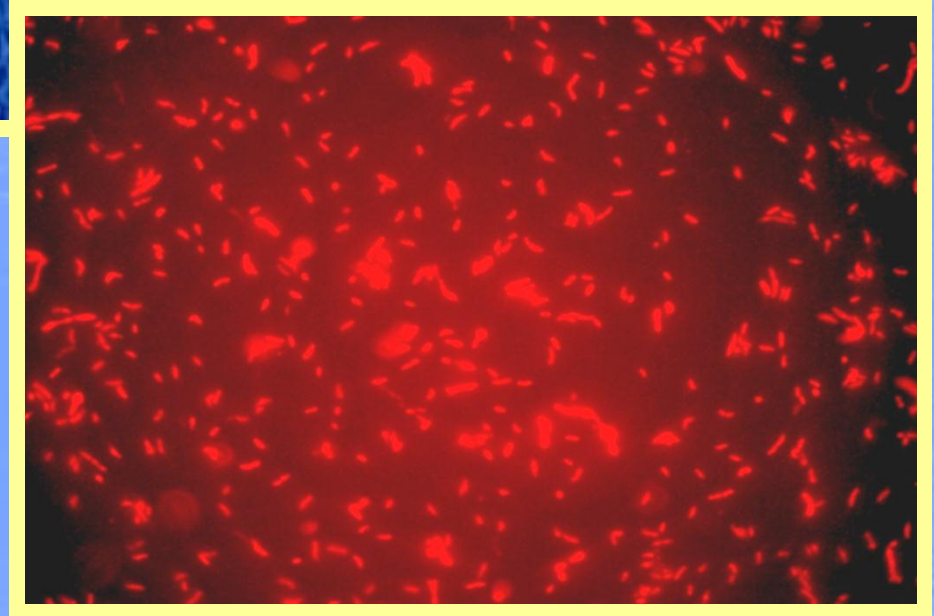
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS



Bacterias totales
4', 6-diamidino-2-fenilindol
(DAPI)



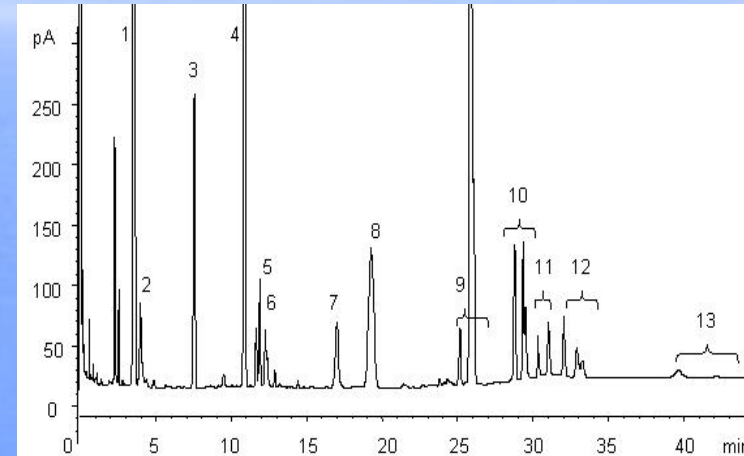
Bifidobacteria
Tinción fluorescente Cy3





Análisis y caracterización de carbohidratos

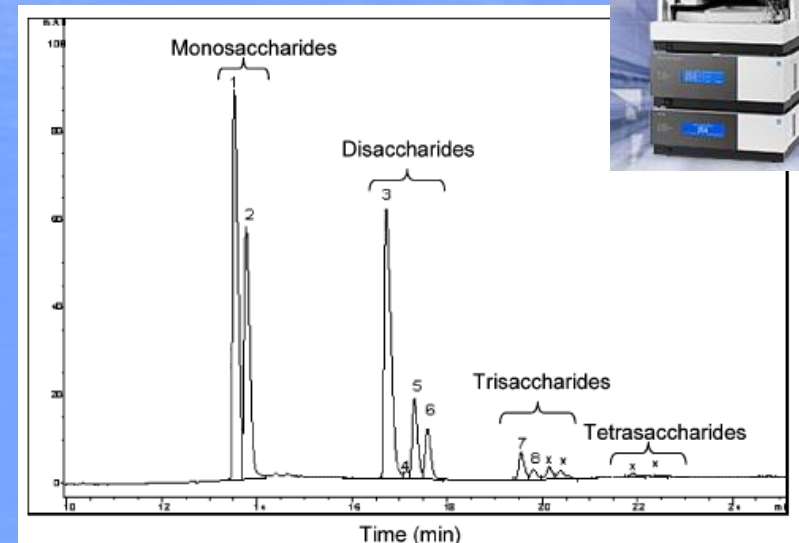
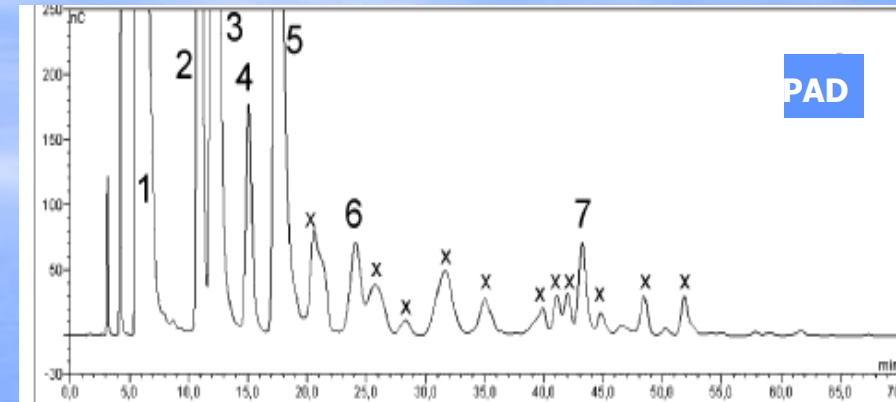
- Complejo → variedad de estructuras, isómeros, ramificaciones
- Análisis, técnicas de separación
 - **Cromatografía de gases (CG)**
 - Resolución y sensibilidad
 - Columnas convencionales:
 - 25-30 m, T max 320°C → 600 Da, GP 3-4
(*Knudsen y Li, 1991; Smart, 1991; Stevenson y col. 1996*)
 - 8-10m, Tmax 360°C → 1200 Da, GP 6-7
(*Karoutis y Tyler, 1992; Montilla y col. 2006*)
 - CG de alta temperatura:
 - Columnas de alta estabilidad térmica (T max 480°C) recubrimiento < 0.05 μm → 2500 Da, GP 12-14
(*Carlsson y col. 1992; Joye y Hoebregs, 2000*)
 - Separación por peso molecular y enlace glicosídico → Metilación





Análisis y caracterización de carbohidratos

- Análisis, técnicas de separación
 - Cromatografía de líquidos
 - Columnas de sílice con grupos amino ligados
 - Columnas de intercambio catiónico
 - Fase reversa
 - Detección: IR, UV
 - **HPAEC-PAD**: separa isómeros no derivatizados con gran sensibilidad. No separa estrictamente por peso molecular (*Petzelbauer y col. 2000; Cho y col. 2003; Chockchaisawasdee y col. 2005; Splechtna y col. 2006; Cardelle-Cobas y col., 2008 y 2009*)
 - Electroforesis capilar (EC)
(*Petzelbauer y col. 2000; Andersen, 2003; Splechtna y col. 2006*)





Análisis y caracterización de carbohidratos

- Técnicas espectroscópicas → análisis estructural

– Resonancia Magnética Nuclear

(Prakash y col. 1989; Kimura y col. 1995; Yanahira y col. 1995; Onishi y col. 1996; Perrin y col. 2000, Bridiau y col. 2006; Montilla y col. 2009)

– Espectrometría de masas

- ESI → oligos. permetilados, ESI-Q-ITMS
Weiskopf y col. 1997
→ oligos. leche humana, ESI-TOF, *Bahr y Karas, 1999*
- MALDI → oligos. de gentibiosa, MALDI-TOF,
Sanz y col. 2006
- CG/MS → *Sanz, Sanz y Martínez-Castro, 2004*
- CL/MS → *Bruggink y col. 2005*
- HILIC/MS → ***Hernández y col. 2012***



MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN

