

Corzo, N*, Montilla, A., Cardelle-Cobas, A., Olano, A.

Instituto de Fermentaciones Industriales, C.S.I.C. C/ Juan de la Cierva, 3; 28006 Madrid, España

Teléfono: + 34 91 258 74 85 /91 562 29 00 Ext 307 Fax: + 34 91 564 48 53

E-mail: ncorzo@ifi.csic.es

1. Introducción

El término prebiótico, definido como ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped mediante la estimulación del crecimiento y/o la actividad de un número limitado de bacterias en el colon, fue introducido por Gibson y Roberfroid en 1995, sin embargo, hace más de cincuenta años que es conocido el efecto beneficioso de algunos carbohidratos sobre la flora intestinal. Los prebióticos se caracterizan por no ser digeridos por los jugos digestivos y llegar intactos al colon donde son fermentados selectivamente por la microflora colónica considerada beneficiosa (bifidobacterias y lactobacilos) en detrimento de las no deseables (bacteroides, clostridia, *E coli*) (Roberfroid, 2003; García Peris y Velasco Gimeno, 2007).

Entre las múltiples enzimas de origen bacteriano presentes en el intestino se incluyen las β -glucuronidasas capaces de liberar sustancias carcinógenas a partir de conjugados del ácido glucurónico. Las azo y nitrorreductasas reducen sustratos nitrogenados a aminas, que son generalmente más tóxicas que los productos de origen y la nitrato reductasa que genera el anión nitrito. La producción de metabolitos en heces tales como el amoniaco, originado a partir de proteínas y de la urea se relaciona con la formación de tumores. Otros metabolitos tales como fenoles y cresoles son también potenciales promotores de enfermedades del colon. Las bifidobacterias y los lactobacilos no producen cantidades significativas de dichas enzimas por lo que están consideradas como microorganismos beneficiosos (Méndez y Olano, 1979). Por tanto, el mantenimiento de tasas elevadas de microorganismos

probióticos en la flora microbiana intestinal es fundamental para preservar la salud del individuo. Este hecho, ha llevado a la búsqueda de carbohidratos que, utilizados como ingredientes en alimentos, sean capaces de favorecer la presencia de bifidobacterias y lactobacilos en el intestino grueso.

Existe un amplio número de carbohidratos no digeribles, sin embargo no todos tienen actividad prebiótica, de hecho parece que las bacterias metabolizan más fácilmente los carbohidratos de tamaño pequeño (oligosacáridos) que los de mayor tamaño (polisacáridos). Entre los más utilizados en la industria alimentaria destacan los fructanos tipo inulina (inulina y oligofructosa) (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y lactulosa (Roberfroid, 2003; Goulas y col., 2007).

1.1. Galactooligosacáridos (GOS) derivados de la lactosa. Oligosacáridos de la leche

Es sabido que en la leche, además de lactosa, hay un número variable de oligosacáridos cuya composición y contenido depende de la especie animal de que se trate y del estado de lactación. La mayor parte están constituidos por una molécula de lactosa en su extremo reductor a la que mediante la acción de diferentes glicosiltransferasas, se le unen residuos de galactosa, N-acetil-glucosamina, fucosa o ácido N-acetil-neuramínico en distintas proporciones. Los enlaces glicosídicos de las moléculas son resistentes a las enzimas digestivas y por tanto los oligosacáridos llegan intactos al colon donde son metabolizados por la flora intestinal. En la leche humana, el contenido en oligosacáridos es aproximadamente de 5-10 g/L y se han identificado más de 130 compuestos (Bode, 2006).

Aunque los beneficios que aporta el consumo de dichos oligosacáridos son considerados únicos, su utilización en la elaboración de alimentos a gran escala es prácticamente imposible dado su escaso contenido en las leches habitualmente empleadas en la industria (vaca, oveja, cabra, búfala). Por ello existe un gran interés

en el desarrollo de procedimientos de síntesis de oligosacáridos derivados de lactosa que presenten propiedades prebióticas.

2. Galactooligosacáridos (GOS) derivados de la lactosa. Transglicosilación

Los GOS son oligosacáridos no digeribles que contienen de 2-20 moléculas de galactosa y una de glucosa (Miller y Whistler, 2000), y se diferencian entre sí en la longitud de cadena y tipo de enlaces.

Estos azúcares, además de su reconocido carácter prebiótico, ya que estimulan el crecimiento de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias en el intestino humano (Sako y col., 1999), también presentan otra serie de propiedades beneficiosas para la salud tales como reducir el nivel de colesterol en suero, prevenir el cáncer de colon y favorecer la absorción del calcio (Tuohy y col., 2005).

Además, los GOS tienen otras propiedades tales como ser estables en condiciones ácidas y durante el procesado de alimentos, hecho que les hace potencialmente aplicables a un amplio número de alimentos; presentar bajo valor calórico, ya que pasan el intestino delgado sin ser digeridos; no estar implicados en la formación de caries, ya que no son metabolizadas por los microorganismos de la cavidad bucal. (Splechtna y col., 2006).

Debido a todas las alegaciones de salud de los GOS, la demanda de alimentos conteniendo estos carbohidratos se ha incrementado enormemente, particularmente en Japón y Europa (Gaur y col., 2006). Por ello, se han realizado numerosos estudios encaminados a optimizar la producción de GOS, especialmente mediante transgalactosilación por vía enzimática ya que la síntesis química es muy tediosa (Sears y Wong, 2001).

Los GOS son compuestos obtenidos industrialmente a partir de lactosa mediante transglicosilación catalizada por β -galactosidasas, enzimas que en determinadas

condiciones son capaces de catalizar tanto la hidrólisis de la lactosa como la formación de un enlace glicosídico entre la galactosa liberada en la hidrólisis y la lactosa u otros carbohidratos presentes en el medio de reacción. La composición de la mezcla de GOS resultante dependerá de la fuente de la enzima empleada, concentración y naturaleza del sustrato y de las condiciones de reacción (pH, temperatura y tiempo) (Prenosil y col., 1987; Boon y col., 2000; Splechtna y col., 2006).

2.1. Enzimas utilizadas para la obtención de GOS

El origen de las β -galactosidasas puede ser muy variado utilizándose microorganismos, plantas y animales, presentando diferentes propiedades. La utilización de microorganismos presenta ventajas en cuanto a manipulación, bajo costo, altos rendimientos en la síntesis, etc. La β -galactosidasa más estudiada ha sido la de *Escherichia coli*; sin embargo, considerando que las aplicaciones van destinadas a alimentos, es lógico utilizar enzimas GRAS (generally recognized as safe) tales como las que proceden de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Kluyveromyces lactis* y *K. fragilis* (Roy y Gupta, 2003); existiendo diferentes preparados de β -galactosidasas comerciales (Panesar y col., 2006).

2.2. Naturaleza de los GOS formados

La formación de GOS durante la hidrólisis enzimática de la lactosa es bien conocida habiéndose estudiado extensamente la influencia, sobre la actividad enzimática y la cantidad y naturaleza de los oligosacáridos formados, de factores tales como: temperatura y pH (Mahoney, 1998; Jurado y col., 2004); utilización de disolventes orgánicos (Finch y Yoon, 1997; Yoon y Mckenzie, 2005), inmovilización sobre diferentes matrices (Gaur y col., 2006), etc.

Además, en los estudios realizados hasta el momento se ha observado la gran influencia que, sobre las propiedades prebióticas, tienen la estructura química, es

decir, número de monómeros que contiene, naturaleza de los mismos y tipo de enlaces presentes en la molécula (Palframan y col., 2003; Delzene, 2003; Tzortis y col., 2005).

Mahoney (1998) realizó una interesante revisión sobre la formación de GOS durante la hidrólisis de la lactosa con diferentes tipos de β -galactosidasas, indicando las estructuras de los oligosacáridos formados así como las cinéticas de reacción. La acción de las β -galactosidasas sobre lactosa, dependiendo del origen, da lugar a disacáridos : β -D-Gal(1 \rightarrow 6)-D-Glc (alolactosa) y β -D-Gal(1 \rightarrow 6)-D-Gal (6 galactobiosa) además de otros disacáridos con enlaces (1 \rightarrow 2) y (1 \rightarrow 3) en menor cantidad; trisacáridos: β -D-Gal(1 \rightarrow 6)-lactosa (6' galactosil lactosa); β -D-Gal(1 \rightarrow 4)-lactosa (4' galactosil lactosa); β -D-Gal(1 \rightarrow 3)-lactosa (3' galactosil lactosa) y en menor proporción tetra- y pentasacáridos. En cuanto al tipo de enlace en los GOS formados predomina el β (1 \rightarrow 6) seguido del β (1 \rightarrow 3) y del β (1 \rightarrow 2).

Recientemente (Cardelle-Cobas y col., 2008a) se ha estudiado la formación de GOS utilizando la actividad β -galactosidasa que presenta el preparado comercial Pectinex Ultra SP-L producido por *A. aculeatus*. Además del trisacárido, 6' galactosil lactosa, se detectó la formación de disacáridos como la alolactosa y la 6 galactobiosa, pudiendo comprobar la gran influencia del pH en la formación de oligosacáridos; así la formación de los trisacáridos está favorecida a pH 6,5 mientras que la de los disacáridos está favorecida a pH 4,5 (Figura 1). Los resultados obtenidos indican que este tipo de preparado enzimático puede utilizarse para obtener mezclas de GOS de diferente composición dependiendo de las condiciones de reacción, por lo tanto podría usarse para una formación selectiva de disacáridos. Sanz y col., (2005) demostraron la influencia de la estructura del disacárido en el carácter prebiótico, poniendo de manifiesto el fuerte carácter prebiótico de la 6 galactobiosa. El preparado comercial Lactozym 3000 L HP G, procedente de la levadura *K. lactis*, es uno de los preparados

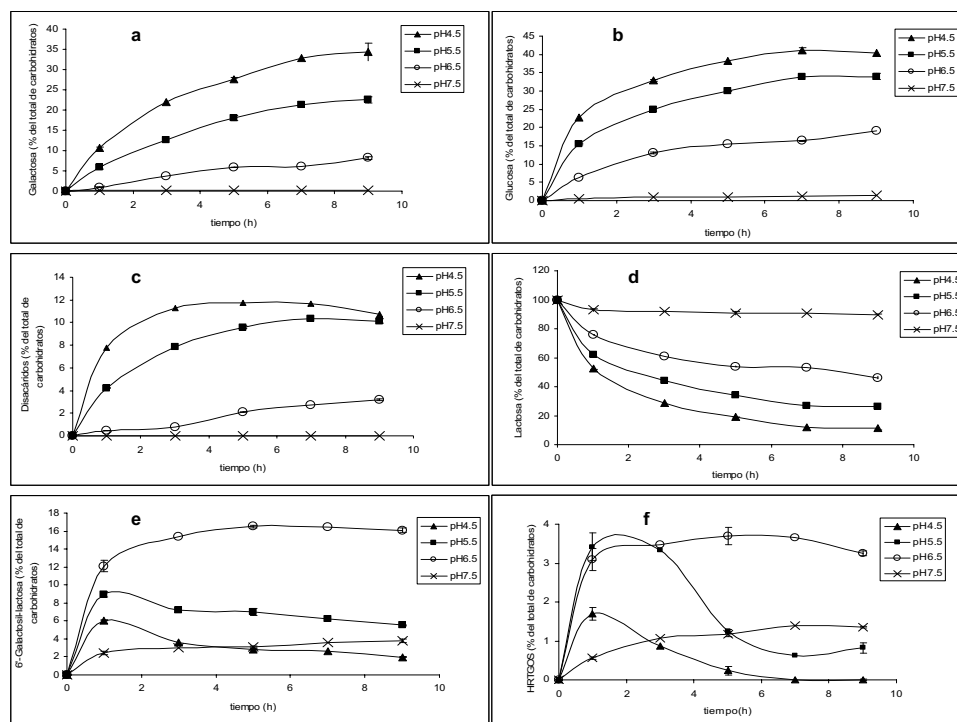


Figura 1. Efecto del pH en la hidrólisis de la lactosa y producción de GOS en las mezclas de reacción de lactosa (285 mg/mL) y el preparado comercial Pectinex Ultra SP-L (16 U/mL) a 60°C. HRTGOS: galactooligosacáridos no identificados. Los resultados son la media de dos experimentos independientes \pm desviación estandar.

enzimáticos más utilizados en la industria láctea para obtener productos libres de lactosa, debido a su gran actividad hidrolítica. En determinadas condiciones, este preparado enzimático es capaz de catalizar reacciones de transglucosilación dando lugar a la formación de trisacáridos y pequeñas cantidades de oligosacáridos de alto peso molecular (Boon y col., 2000; Hung y Lee, 2002; Chockchaisawasdee y col., 2005; Bridiau y col., 2006) así como de disacáridos (Maugard y col., 2003; Cheng y col., 2006). Recientemente, Martínez-Villaluenga y col., (2008a) en un estudio de optimización de las condiciones de formación de GOS durante la hidrólisis de la lactosa utilizando este preparado, obtuvieron los mejores rendimientos de 6' galactosil lactosa a 40°C y pH 7,5, mientras que las condiciones óptimas para obtener alolactosa y galactobiosa fueron a 50°C y pH 6,5.

3. Oligosacáridos derivados de la lactulosa

La lactulosa es un disacárido constituido por una molécula de galactosa y otra de fructosa (β -D-Gal(1 \rightarrow 4)-D-Fru) que se origina durante los tratamientos térmicos de la leche y se obtiene de modo industrial a partir de la lactosa mediante isomerización en medio básico (Montgomery y Hudson, 1930; Kozempel y col., 1995). Sus efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las bifidobacterias presentes en el intestino humano son conocidos desde hace más de cincuenta años. En 1957, Petuely propuso la elaboración de un producto para la alimentación infantil basado en el tratamiento térmico de la lactosa que favorecía el crecimiento de las bifidobacterias presentes en la flora intestinal. En los años siguientes, diversos autores desarrollaron nuevos productos basándose en el mismo principio y en 1961 Adachi y Patton recapitularon en un extenso trabajo los conocimientos adquiridos sobre la lactulosa, poniendo de manifiesto sus propiedades singulares como factor de crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias intestinales.

Se sabía que las heces de los bebés alimentados con leche materna contenían mayor número de bifidobacterias que las de los bebés alimentados con biberón y se observó que en las heces aumentaba el contenido en bifidobacterias cuando a la leche del biberón se le añadía un 1% de lactulosa, lo que indujo a pensar que podría actuar como factor bifidogénico. Diez años más tarde, después de numerosos estudios sobre los efectos de la lactulosa en el organismo se pudo concluir que la lactasa humana, presente en el intestino delgado, posee una actividad muy específica de modo que es capaz de hidrolizar la lactosa pero es inactiva frente a la lactulosa (Ruttloff y col., 1967), llegando intacta al colon, donde puede ser metabolizada por las bacterias que constituyen la flora intestinal, del mismo modo que los oligosacáridos presentes en la leche humana estimulan el crecimiento de bifidobacterias en bebés alimentados con leche materna. Desde los años 50, este carbohidrato se utiliza en farmacia como

laxante y también se ha usado como un ingrediente prebiótico (Méndez y Olano, 1979; Schuman, 2002).

3.1. Obtención de oligosacáridos a partir de la hidrólisis y transglicosilación de la lactulosa

Actualmente existe un gran interés en la obtención de nuevos carbohidratos con propiedades prebióticas mejoradas. Como se ha comentado anteriormente, la lactulosa es resistente a la acción de las enzimas digestivas y presenta unas reconocidas propiedades prebióticas, sin embargo, es sustrato de la microflora en los primeros tramos del colon (Bown y col., 1974) y no alcanza las zonas más distales donde es mayor la incidencia de determinadas patologías. Por tanto, es de interés disponer de oligosacáridos derivados de la lactulosa capaces de llegar intactos a dichas zonas. En nuestro grupo de investigación se planteó la posibilidad de obtener oligosacáridos derivados de la lactulosa mediante transglicosilación con β -galactosidasas, abriendo, por lo tanto, nuevas perspectivas para la elaboración de nuevos carbohidratos prebióticos. Se llevó a cabo un estudio sobre la síntesis e identificación de los principales oligosacáridos formados durante la hidrólisis enzimática de la lactulosa con el preparado comercial Lactozym 3000 L HP G (Martínez-Villaluenga y col., 2008b). El análisis por cromatografía de intercambio aniónico y detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD) mostró la formación de dos compuestos mayoritarios y en las mismas proporciones, el análisis por espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN) permitió determinar la estructura química de estos dos nuevos oligosacáridos derivados de la lactulosa, siendo uno de ellos la 6' galactosil lactulosa (β -D-Gal (1 \rightarrow 6)- β -D-Gal (1 \rightarrow 4)- β -D-Fru) y el otro la 1 galactosil lactulosa (β -D-Gal(1 \rightarrow 4)- β -D-Fru (1 \rightarrow 1)- β -D-Gal), en las figuras 2 y 3 se muestran las estructuras correspondientes. Ha sido la primera vez

que se describe en la bibliografía un galactooligosacárido con el enlace glicosídico β (1 \rightarrow 1).

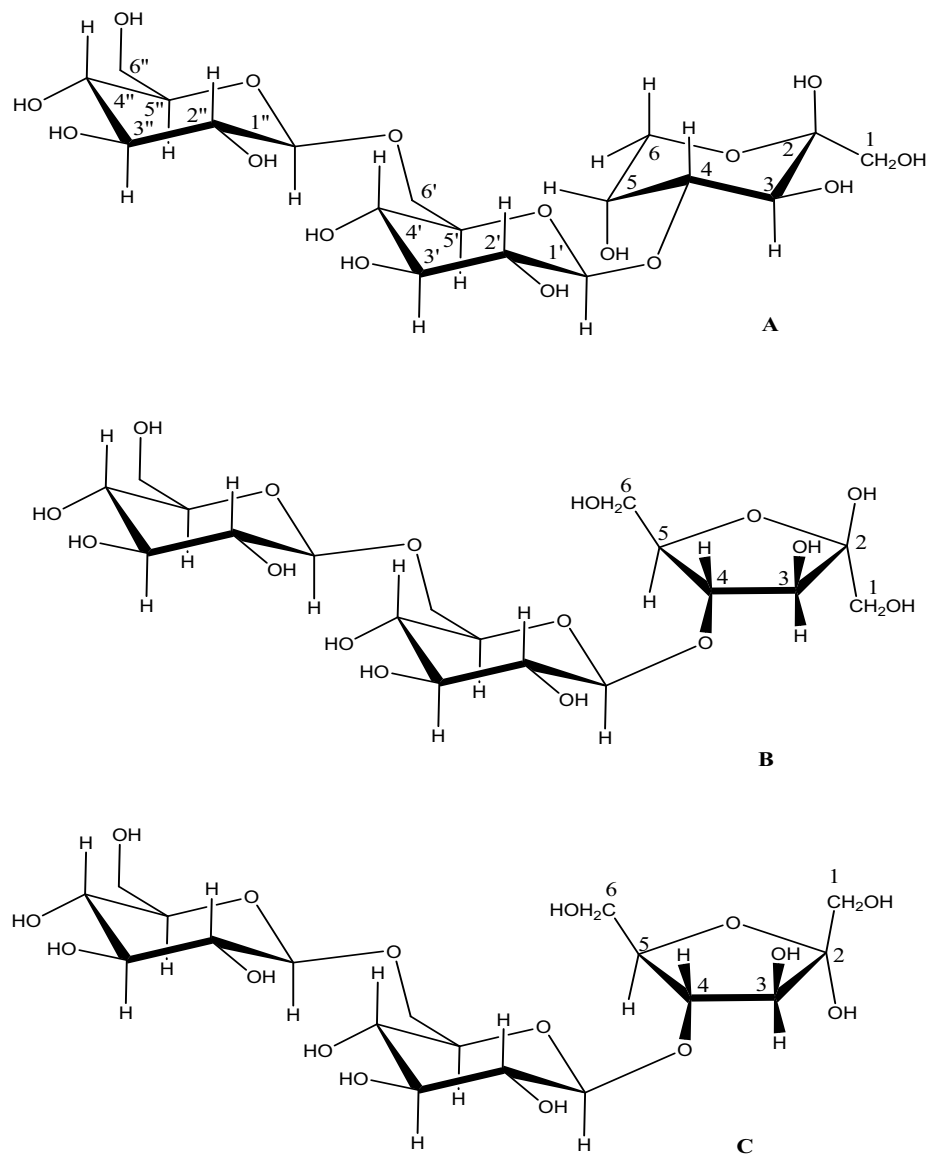


Figura 2.- Estructuras de los isómeros de la 6' galactosil lactulosa:
(A): β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructopiranososa;
(B): β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructofuranosa;
(C): β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-fructofuranosa.

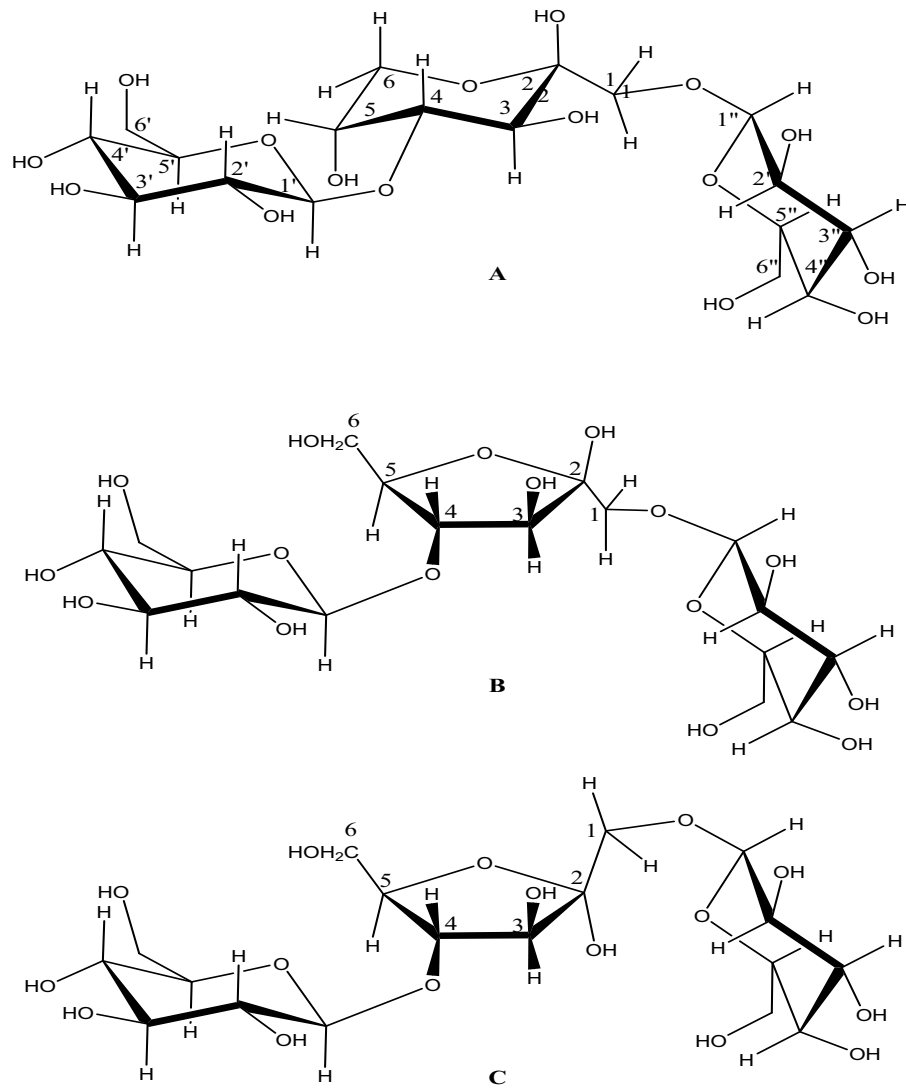


Figura 3. Estructuras de los isómeros del 1 galactosil lactulosa:
 (A): β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructopiranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranosil;
 (B): β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fructofuranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranosil;
 (C): β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-fructofuranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-galactopiranosil.

Varios trabajos han demostrado que la propiedad de los prebióticos de estimular selectivamente el crecimiento de determinados microorganismos probióticos depende fundamentalmente de los enlaces glicosídicos presentes en sus estructuras y de los pesos moleculares. Los GOS que presentan enlaces β (1 \rightarrow 6) son selectivos para

bifidobacterias (Rowland y Tanaka, 1993), sin embargo no se tiene información de los oligosacáridos derivados de la lactulosa con enlaces β (1 \rightarrow 1). Además, en general, los carbohidratos con un grado de polimerización de 3, muestran una mayor selectividad hacia bifidobacterias (Kaneko y col., 1994; Kaplan y Hutkins, 2000). En base a lo mencionado anteriormente, la 6' galactosil lactulosa y la 1 galactosil lactulosa podrían ser considerados como potenciales prebióticos ya que al tener mayor peso molecular que la lactulosa pueden ser fermentados más lentamente y alcanzar regiones más distales del colon. Cardelle-Cobas y col., (2008b) realizaron un estudio exhaustivo de la influencia de diferentes parámetros, tiempo, temperatura, concentración de enzima y de sustrato en la formación de oligosacáridos, durante la hidrólisis de la lactulosa, mediante la actividad β -galactosidasa del preparado comercial Pectinex Ultra SP-L. El oligosacárido mayoritario formado resultó ser la 6' galactosil lactulosa además de formarse una serie de disacáridos (6 galactobiosa) y otros oligosacáridos no identificados con un grado de polimerización ≥ 3 . La velocidad de hidrólisis de la lactulosa aumentó con la temperatura (en el intervalo de 40-60 °C) así como la formación de productos de transglicosilación. Por otra parte, se observó la influencia del pH (figura 4) en la composición de los oligosacáridos; así a pH 4,5-5,5 se favorece la formación de disacáridos, mientras que a mayor pH (6,5) se favorece la síntesis de 6' galactosil lactulosa.

3.2. Obtención de oligosacáridos mediante isomerización de GOS.

Debido a que los carbohidratos en forma de aldosa pueden ser isomerizados en condiciones básicas a sus correspondientes cetosas, es posible modificar las características de fermentación de los oligosacáridos prebióticos mediante el desarrollo de procesos de conversión, económicamente factibles.

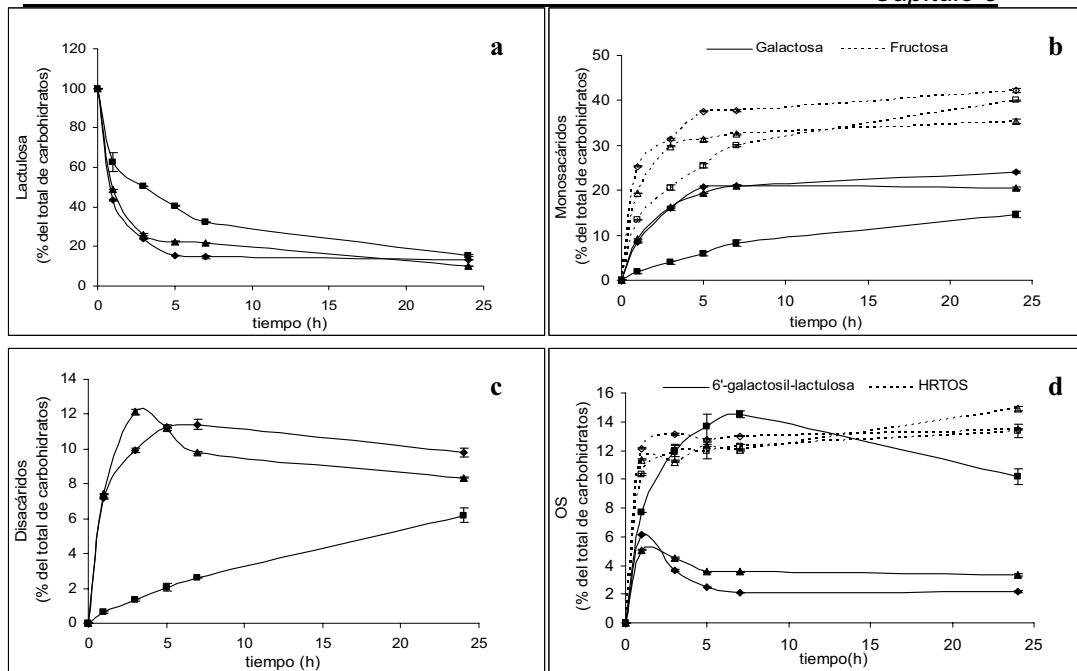


Figura 4.- Efecto del pH en la producción de oligosacáridos durante la hidrólisis enzimática de lactulosa (650 g/L) con Pectinex Ultra SP-L (16 U/mL) a 60°C. (♦) pH 4.5 (▲) pH 5.5 (■) pH 6.5. HRTOS: galactooligosacáridos no identificados. OS: oligosacáridos.

La lactosa en medio básico se convierte en lactulosa, por isomerización de la glucosa a fructosa con unos rendimientos muy altos (70-80%), usando catalizadores tales como hidróxido de aluminio (Aider y de Halleux, 2007). Los GOS son carbohidratos reductores susceptibles de ser isomerizados igualmente por su glucosa terminal dando lugar a un nuevo tipo de carbohidrato prebiótico que presente diferentes características de fermentación.

Nuestro grupo de investigación (Cardelle-Cobas y col., 2008c) ha optimizado las condiciones de isomerización de los GOS obtenidos mediante tratamiento enzimático de la lactosa con el preparado comercial Lactozym 3000 L HP G. La isomerización se realizó utilizando distintas cantidades de aluminato sódico como catalizador, en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de reacción eligiendo aquellas en las que se obtiene un mayor rendimiento de GOS isomerizados.

En la figura 5 quedan reflejados los cromatogramas obtenidos del análisis por HPAEC-PAD de los productos resultantes de la hidrólisis y transglucosilación de la lactosa (A) y

del posterior tratamiento con aluminato sódico (B). Como consecuencia de la hidrólisis/transglicosilación pueden observarse los picos correspondientes a la galactosa (nº 1), glucosa (nº 2), y lactosa (nº 5). Asimismo, pueden observarse otros picos que corresponden a los GOS formados mediante la transglicosilación como son la 6 galactobiosa (nº 3); alolactosa (nº4); 4 galactobiosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Gal) (nº 6) y 6' galactosil-lactosa (nº 7).

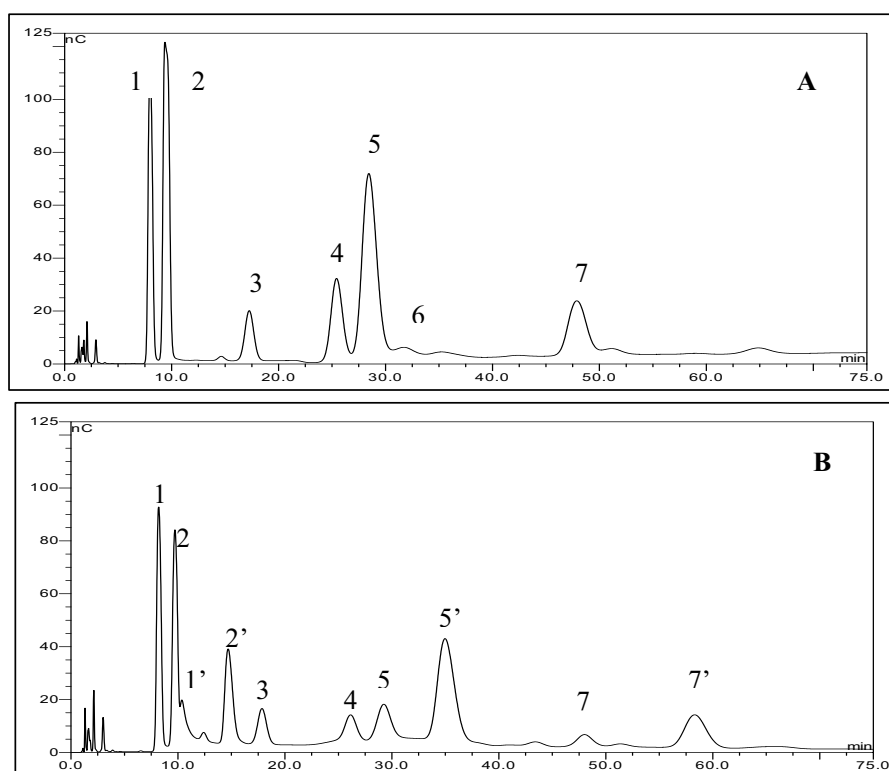


Figura 5.- Perfiles obtenidos del análisis por HPAEC-PAD de una mezcla de carbohidratos resultante de la hidrólisis de la lactosa con β -galactosidasa (Lactozym 3000 L HP G) antes (A) y después de nueve horas de isomerización a 40°C con una relación molar aluminato sódico/ lactosa 3:1 (B). 1: Galactosa, 2: Glucosa, 3: 6 Galactobiosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Gal), 4: Alolactosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Glc), 5: Lactosa, 6: 4 Galactobiosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Gal), 7: 6'-galactosil lactosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-Lac), 1': Tagatosa, 2': Fructosa, 5': Lactulosa y 7': 6'-galactosil lactulosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 6)-D-Gal-(1 \rightarrow 4)-Fru).

En el punto óptimo de la reacción enzimática el producto resultante estaba constituido por monosacáridos (35%), alolactosa (11%), 6 galactobiosa (5%), lactosa (31%) y 6' galactosil lactosa (16%).

El tratamiento de esta mezcla de GOS con aluminato sódico dio lugar a la isomerización de todos los carbohidratos presentes en la mezcla, así lactosa, glucosa y galactosa se isomerizaron a lactulosa, fructosa y tagatosa, respectivamente, apareciendo un nuevo carbohidrato en la región de los trisacáridos, el cual fue aislado y caracterizado por RMN y EM, correspondiendo al trisacárido 6' galactosil lactulosa. Se optimizaron las condiciones de isomerización de los GOS realizando la reacción a diferentes temperaturas y con distintas concentraciones de aluminato sódico; en la figura 6 quedan reflejados los porcentajes para cada una de las cetosas formadas cuando la reacción se lleva a cabo a 40°C durante 24 horas. En las condiciones óptimas de reacción, 40°C durante 9h y una relación molar de aluminato sódico/lactosa 3/1, el rendimiento de la reacción de isomerización fue del 60% y la cantidad de carbohidratos finales cercana al 90% del producto inicial. Como ha podido demostrarse durante la isomerización de los GOS, además de los nuevos GOS formados, también se redujo considerablemente el contenido en lactosa, glucosa y galactosa, azúcares no recomendados para la población con problemas de diabetes o intolerancia a la lactosa.

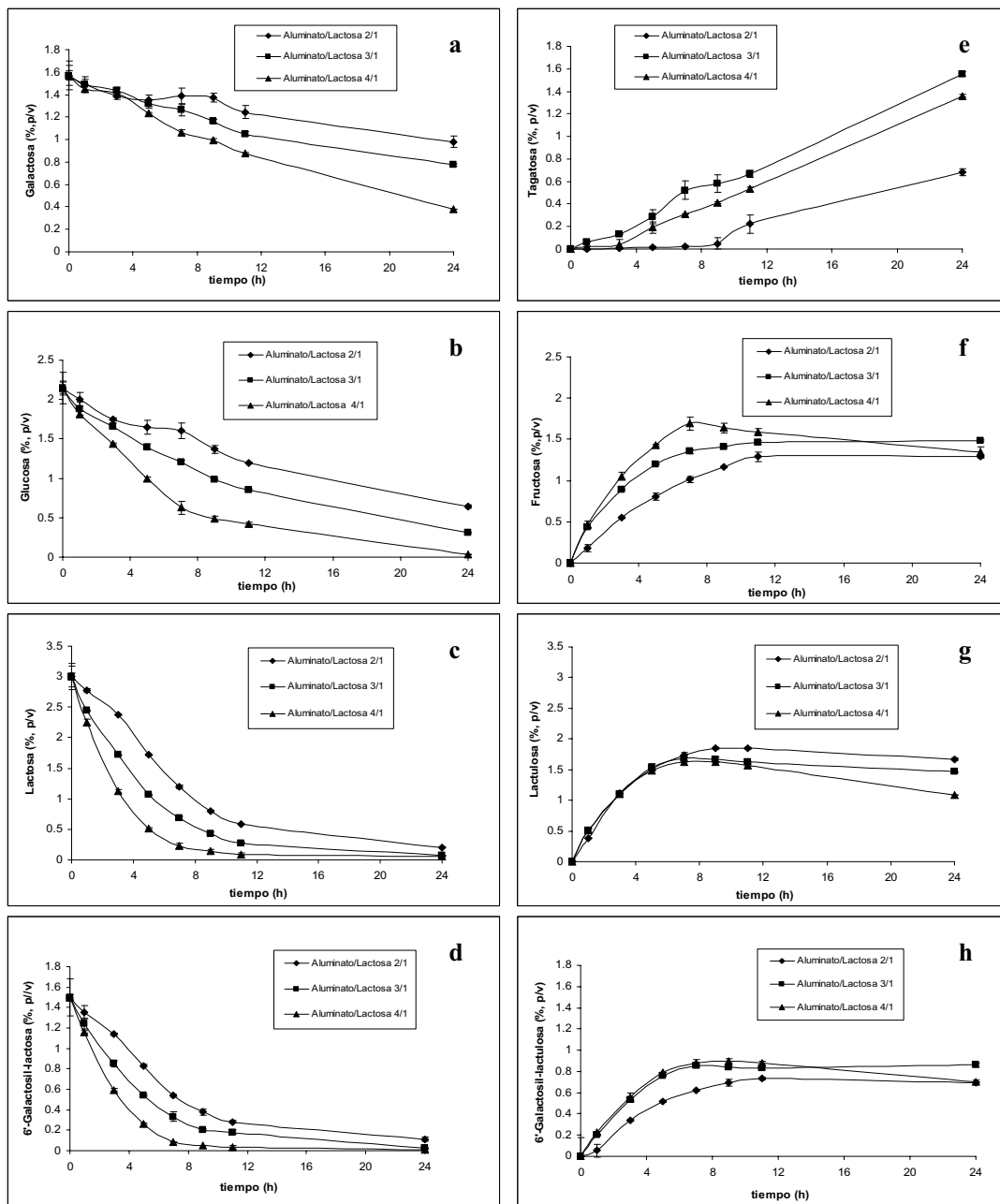


Figura 6.- Efecto del contenido en aluminato sódico en la isomerización de hidrolizados enzimáticos de lactosa a 40° C durante 24 h de reacción.

Conclusiones

Los oligosacáridos derivados de la lactosa pueden ser considerados como ingredientes que presentan un amplio rango de beneficios nutricionales particularmente centrados en promover la salud intestinal. Existe un amplio número de trabajos que avalan este hecho, sin embargo se debe profundizar en la búsqueda de un punto : nuevos oligosacáridos con propiedades prebióticas complementarias

Una de las vías podría ser la utilización de β -galactosidasas de diferentes orígenes para producir oligosacáridos derivados de la lactulosa así como la isomerización de carbohidratos prebióticos reductores.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por diferentes proyectos de investigación: CYTED N° XI.24; ALIBIRD S-0505/AGR/000153 de la Comunidad de Madrid y CONSOLIDER Ingenio 2010 (FUN-C-FOOD) CSD 2007-00063 del Ministerio de Educación y Ciencia.

Referencias

- Adachi, S., Patton, S. (1961). Presence and significance of lactulose in milk products: A review. *Journal of Dairy Science*, 44, 8, 1375-1393.
- Aider, M., de Halleux, D. (2007). Isomerization of lactose and lactulose production: review. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 356-364.
- Bode, L. (2006). Recent advances on structure, metabolism and function of human milk oligosaccharides. *Journal of Nutrition*, 136, 2127-2130.
- Boon, M. A., Janssen, A. E. M., van't Riet, K. (2000). Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 271-281.
- Bown, R. L., Gibson, J. A., Sladen, G. E., Hicks, B., Dawson, A. M. (1974). Effects of lactulose and other laxatives on ileal and colonic pH as measured by a radiotelemetry device. *Gut*, 15, 999-1004.
- Bridiau, N., Taboubi, S., Marzouki, N., Legoy, M. D., Maugard, T. (2006). β -Galactosidase catalyzed selective galactosylation of aromatic compounds. *Biotechnology Progress*, 22, 326-330.
- Cardelle-Cobas, A., Villamiel, M., Olano, A., Corzo, N. (2008 a). Study of galacto-oligosaccharides formation from lactose using Pectinex-Ultra SP-L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 954-961.
- Cardelle-Cobas, A., Martínez Villaluenga, C., Villamiel, M., Olano, A., Corzo, N. (2008 b). Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and Pectinex Ultra SP-L. *Journal of the Agriculture and Food Chemistry*, 56, 3328-3333.
- Cardelle-Cobas, A., Villamiel, M., Olano, A., Corzo, N. (2008 c). Isomerization of lactose-derived oligosaccharides: a case study using sodium aluminate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10954-10959.
- Cheng, C. C., Yu, M. C., Cheng, T. C., Sheu, D. C., Duan, K. J., Tai, W. L. (2006). Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 28, 793-797.
- Chockchaisawasdee, S., Athanasopoulos, V. I., Niranjana, K., Rastall, R. A. (2005). Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 434-443.
- Delzenne, N. M. (2003). Oligosaccharides: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 177-182.

- Finch, P., Yoon, J. H. (1997). The effects of organic solvents on the synthesis of galactose disaccharides using beta-galactosidases. *Carbohydrate Research*, 303, 339-345.
- García Peris, P., Velasco Gimeno, C. (2007). Evolución en el conocimiento de la fibra. *Nutrición Hospitalaria*, 22 Supl. 2, 5-20.
- Gaur, R., Pant, H., Jain, R., Khare, S. K. (2006). Galacto-oligosaccharides synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry*, 97, 426-430.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota.-Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.
- Goulas, A., Tzortzis, G., Gibson, G. R. (2007). Development of a process for the production and purification of α and β -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *International Dairy Journal*, 17, 648-656.
- Hung, M. N., Lee, B. H. (2002). Purification and characterization of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 439-445.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Vicaria, J. M. (2004). Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 33-40.
- Kaneko, T., Kohmoto, T., Kikuchi, H., Shiota, M., Iino, H., Mitsuoka, T. (1994). Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human faecal bifidobacteria. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58, 2288-2290.
- Kaplan, H., Hutkins, R. W. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2682-2684.
- Kozempel, M. F., Kurantz M. J., Craig, J. C., Hicks, K. B. (1995). Development of a continuous lactulose process: Separation and purification. *Biotechnology Progress*, 11, 592-595.
- Mahoney, R.R. (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, 63, 147-154.
- Martínez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., Villamiel, M. (2008 a). Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*, 258-264.
- Martinez-Villaluenga, C., Cardelle-Cobas, A., Olano, A., Corzo, N., Villamiel, M., Jimeno, M. L. (2008 b). Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides

- produced from lactulose by transgalactosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 557-563.
- Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M. D., Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Letters*, 25, 623-629.
- Mendez, A., Olano, A. (1979). Lactulose. A review of some chemical properties and applications in infant nutrition and medicine. *Dairy Science. Abstracts*, 41, 9, 531-535.
- Miller, J. N., Whistler, R. L. (2000). Carbohydrates. In *Food Chemistry*, Fennema O (ed). Marcel Dekker, New York, USA, pp 207.
- Montgomery, E.M., Hudson, C.S. (1930). Relations between rotatory power and structure in the sugar group. XXVII. Synthesis of a new disaccharide ketose (lactulose) from lactose. *Journal of the American Chemical Society*, 52, 2101-2106.
- Palframan, R., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2003). Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 281-284.
- Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J.F., Kumar, H. (2006). Review: Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 530-543.
- Petuely, F. (1957). *Lactobacillus bifidus* flora produced in artificially-fed infants by bifidogenic substances (bifidus factor). *Z. Kinderheilk*, 79, 174-179.
- Prenosil, J. E., Stuker, E., Bourne, J. R. (1987). Formation of oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of lactose. Part 1: State of the art. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 1019-1025.
- Roberfroid, M. (2003). Los prebióticos: concepto, criterio y propiedades nutricionales. *Nutrición Hospitalaria*, 18 (5) 273.
- Rowland I. R., Tanaka, R. (1993). The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with human faecal microflora. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 667-674.
- Roy, I., Gupta, M. N. (2003). Lactose hydrolysis by Lactozym TM immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochemistry*, 39, 325-332.
- Ruttloff, H., Taufel, A., Krause, W., Haenel, H., Taufel, K. (1967). The intestinal enzymatic decomposition of galacto-oligosaccharides in the human and animal intestine, with particular regard to *Lactobacillus bifidus*. Part 2. On the intestinal behaviour of lactulose. *Nahrung*, 11, 39-46.

- Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Internacional Dairy Journal*, 9, 69-80.
- Sanz, M. L., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2005). Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5192-5199.
- Sears, P., Wong, C. H. (2001). Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. *Science*, 291, 2344-2350.
- Splechtna, B., Nguyen, T. H., Steinböck, M., Kulbe, K. D., Lorenz, W., Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4999-5006.
- Schumann, C. (2002). Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. *European Journal of Nutrition*, 41, 17-25
- Tuohy, K. M., Rouzaud, G. C. M., Brück, W. M., Gibson, G. R. (2005). Modulation of the human gut flora towards improved health using prebiotics – *Assesment of efficacy*. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 75-90.
- Tzortzis, G., Goulas, A. K., Gibson, G. R. (2005). Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 412-416.
- Yoon, J. H., Mckenzie, D. (2005). A comparison of the activities of three beta-galactosidases in aqueous-organic solvent mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 439-446.