

BACTERIAS LÁCTICAS COMO HERRAMIENTAS PARA LA SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS PREBIÓTICOS

Fara Agustina^a; Montilla Antonia^b, Zárate Gabriela^{a,c}.

Laboratorio de Ecofisiología Tecnológica, CERELA-CONICET, Chacabuco 145, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina.

^bInstituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM), CEI (CSIC-UAM), Nicolás Cabrera 9- 28049 Madrid, España.

^cUniversidad de San Pablo Tucumán, Av. Solano Vera y Camino a Villa Nougés, (4129) San Pablo, Tucumán, Argentina.

Resumen

Los alimentos funcionales son una nueva generación de alimentos que además de nutrir buscan potenciar la salud del consumidor. Los prebióticos son ingredientes funcionales reconocidos por el Código Alimentario Argentino que ejercen un efecto beneficioso en la salud mediante la estimulación selectiva del crecimiento y actividad metabólica de ciertos componentes de la microbiota colónica. Los prebióticos más reconocidos por su seguridad y efectos en el consumidor son los fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS). Estos compuestos pueden extraerse de algunos alimentos o sintetizarse enzimáticamente. En este trabajo, analizamos la actividad β -galactosidasa (β -gal) de bacterias lácticas (BAL) como herramientas para la síntesis de oligosacáridos prebióticos a partir de lactosa (GOS). Quince lactobacilos expresaron actividad β -gal y crecieron a expensas de lactosa mientras que once de ellos fueron capaces de sintetizar GOS. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450, fue la cepa con mayor actividad β -gal, y sintetizó un máximo de 41,3 % GOS con enlaces β -(1 \rightarrow 6) y β -(1 \rightarrow 3). Los CRL450-GOS estimularon el desarrollo de la cepa productora y de cultivos probióticos e incrementaron las poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias y la producción de ácidos grasos de cadena corta en homogenatos colónicos de ratones usados como modelo intestinal *in vitro*. Los resultados obtenidos avalan el potencial de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450 para la producción de GOS prebióticos y alientan la optimización de su síntesis para formular nuevos ingredientes alimentarios funcionales.

Palabras claves: Bacterias ácido láctica (BAL), β -galactosidasa, galactooligosacáridos (GOS), potencial prebiótico.

Abstract

Functional foods are a new generation of food products that enhance consumer's health besides basic nutrition. Prebiotics are functional ingredients authorized by the Argentinian Food Code that produce a beneficial effect on health by stimulating the growth and metabolic activity of some components of the colonic microbiota. Fructooligosaccharides (FOS) and galactooligosaccharides (GOS) are the most recognized prebiotics due to their safety and health effects. These compounds can be obtained from some foods or be enzymatically synthesized. In this work, we analyze the activity of lactic acid bacteria (LAB) β -galactosidase (β -gal), to select strains for the synthesis of oligosaccharides from lactose (GOS) with potential prebiotic effect. Fifteen lactobacilli express β -gal activities and were able to grow in lactose, whereas eleven of them were able to synthesize GOS. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450, the strain with the highest β -gal activity, synthesized a maximum of 41.3% GOS, with β -(1 \rightarrow 6) and β -(1 \rightarrow 3) linkages. CRL450-GOS enhanced the growth of recognized probiotics and the producer strain, and increased the lactobacilli and bifidobacteria populations and the production of short chain fatty acids in colonic homogenates of mice used as *in vitro* intestinal model. The results obtained support the potential of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450 to produce prebiotic GOS and the need to optimize their synthesis for the design of new functional food ingredients.

Keywords: Lactic acid bacteria (LAB), β -galactosidase, galactooligosaccharides (GOS), prebiotic potential.

Introducción

Los prebióticos son sustratos que son utilizados selectivamente por los microorganismos de la microbiota endógena, confiriendo beneficios para la salud (Gibson y col., 2017). Dentro de los compuestos prebióticos más reconocidos, los galactooligosacáridos (GOS) han demostrado ser útiles para la modulación de la microbiota colónica hacia un equilibrio saludable, debido a que estimulan el aumento de microorganismos beneficiosos como bifidobacterias y lactobacilos y la disminución de clostridios, bacteroides y enterobacterias (Cardelle-Cobas y col., 2009a; Roberfroid y col., 2010). Además los GOS inhiben la adhesión de bacterias patógenas al epitelio del colon, reducen el colesterol sérico y la hipertensión, y previenen diferentes patolo-

gías como cáncer de colon, diabetes tipo 2, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, etc (Macfarlane y col., 2008; Fernández y col., 2018, Power y col., 2014, Li y col., 2016). Los GOS han sido definidos como carbohidratos no digeribles, formados por dos a ocho monómeros de galactosa y una unidad de glucosa terminal unida por enlaces glucosídicos (Chen y Ganzle, 2017; Tymczyszyn y col., 2014). En su síntesis interviene la enzima β -galactosidasa (β -gal) (EC 3.2.1.23), presente en numerosos microorganismos y muy importante desde el punto de vista tecnológico y por sus aplicaciones en alimentos y salud. Dependiendo de las condiciones de reacción (concentración de sustrato, actividad agua, pH, temperatura, tiempo de reacción), esta enzima puede catalizar la hidrólisis y la transgalactosilación de la lactosa, resultando en diferentes mezclas de los galactooligosacáridos mencionados (Vonk y col., 2012; Moreno y col., 2014; Vera y col., 2016; Zárate y col., 2013).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido ampliamente estudiadas debido a su papel en la fermentación y biopreservación de los alimentos y por su potencial como probióticos para la salud humana. (Douillard y de Vos, 2014). También han sido reconocidas como inocuas por autoridades internacionales (GRAS status para la FDA y QPS para la EFSA), lo que permite el uso seguro de sus enzimas para aplicaciones en alimentos. En este sentido, pocos estudios se han enfocado en la síntesis de GOS por la β -gal de BAL. Esta capacidad solo ha sido reportada para *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*, (Splechna y col., 2006; Nguyen y col., 2007; Gobinath y Iqbal y col., 2010; Lu y col., 2012; Prapulla, 2014; Carević y col., 2018). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad hidrolítica y transglucosilica de cepas de BAL aisladas de productos argentinos para seleccionar aquella capaz de producir GOS con un potencial prebiótico mayor que las mezclas de GOS obtenidas convencionalmente con enzimas fúngicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Glucosa, galactosa, fructosa, lactosa, rafinosa, estaquiosa, o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) y el carbón activado fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.). La enzima β -gal de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym®Pure 6500L) fue proporcionada por Novozymes (Dittingen, Suiza), el jarabe Vivinal®-GOS por Friesland Campina Domo (Países Bajos) y el medio de cultivo MRS y acetnitrilo grado HPLC fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania).

Cepas bacterianas

Se usaron once cepas de bacterias lácticas (BAL) pertenecientes a la colección de cultivos de CERELA-CONICET (CRL) aisladas a partir de productos lácteos (quesos y yogurt). Las cepas, se activaron en caldo MRS a 37 °C mediante tres transferencias sucesivas cada 24 h antes de su uso experimental. *Lacticaseibacillus casei* CRL431® (CERELA-CONICET, Chr.Hansen), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® (Chr.Hansen) y *Escherichia coli* C3 (Instituto de Microbiología “Luis Verna” de la Universidad de Tucumán) fueron usadas para ensayar la actividad prebiótica de los oligosacáridos.

Determinación de la actividad β -galactosidasa

La actividad hidrolítica β -gal (U mg⁻¹ de proteína) de las cepas se evaluó en extractos libres de células (ELC) obtenidos por ruptura mecánica, mediante un método colorimétrico que mide la hidrólisis del sustrato sintético ONPG a 420 nm (Sabater y col., 2019). La actividad transglucosilica se determinó cualitativamente por TLC. Cada ELC se mezcló (1:1) con lactosa (300 g L⁻¹ concentración final) y se incubó durante 8 h. Alícuotas (2 μ L) de cada mezcla de reacción fueron sembradas en placas de gel de sílice y se usó como fase móvil una mezcla de butanol, metanol y agua (70: 20: 10). Las placas de TLC se revelaron rociando ácido sulfúrico al 5% y α -naftol al 0,5 % en etanol y calentando durante 30 min a 100 °C.

Producción de galactooligosacáridos.

Para la síntesis de GOS, los ELC de BAL conteniendo β -gal (1,3 U mL⁻¹) se mezclaron con lactosa (300 g L⁻¹), y se incubaron a 45 °C, pH 6.5 durante 5 h, inactivando la reacción por calentamiento (95°C, 2 min) (Sabater y col., 2019). La enzima de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym) fue utilizada en las mismas condiciones con

finés comparativos. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Las reacciones se realizaron por duplicado y las muestras se analizaron dos veces.

Determinación de actividad prebiótica de CRL450-GOS.

Crecimiento de cepas bacterianas a expensas de oligosacáridos.

L. bulgaricus CRL450 (productora de GOS) y dos cepas probióticas *L. casei* CRL431 y *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 fueron inoculadas al 2% (v/v) (DO600 inicial 0.1) en caldo MRS sin glucosa, suplementado con glucosa, Vivinal-GOS y CRL450-GOS a una concentración final de 0,5% (p/v). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h. El crecimiento se evaluó midiendo incremento en el tiempo de la absorbancia a 600 nm en un lector de microplaca automatizado (Varioskan Flash) y descenso de pH con un pHmetro Altronix TPXI.

Índice Prebiótico

El potencial prebiótico de los GOS sintetizados por *L. bulgaricus* CRL450 fue determinado cuantitativamente mediante un índice de actividad prebiótica (PAS por sus siglas en inglés), un método basado en el cambio en la biomasa celular después de 24 h de crecimiento de un cepa de interés (*BAL* y bifidobacterias) sobre el prebiótico en estudio o glucosa, comparado con el cambio de biomasa de una cepa entérica (*Escherichia coli*) cultivada en iguales condiciones (Huebner y col., 2007). El PAS de Vivinal-GOS y CRL450-GOS se calculó como:

$$PAS = \frac{PP_{24}-PP_0}{PG_{24}-PG_0} - \frac{EP_{24}-EP_0}{EG_{24}-EG_0}$$

donde PP0 y PP24 es la biomasa probiótica (DO600) en prebióticos seleccionados a las 0 h y 24 h de fermentación. PG0 y PG24 es la DO600 probiótica en glucosa después de 0 h y 24 h respectivamente. EP0, EP24 y EG0, EG24 es la biomasa de *E. coli* en prebióticos y glucosa a las 0 h y 24 h, respectivamente. La concentración de carbohidratos fue monitoreado por GC-FID.

Fermentación in vitro de GOS por la microbiota colónica de ratones adultos C57BL/6

Ratones adultos C57BL/6 alimentados con una dieta convencional, fueron sacrificados y su contenido colónico fue suspendido al 10 % (p/v) en solución salina (NaCl 0,9%). El homogenato obtenido fue fraccionado y suplementado con CRL450-GOS y Vivinal-GOS (0,5% concentración final) y las mezclas resultantes fueron incubadas 24 h a 37°C en anaerobiosis. Los cambios en las poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias fueron determinados por recuento en placa empleando medios de cultivo selectivos, Rogosa Agar y TOS-propionato-agar suplementado con 0,2% LiCl, para el recuento de lactobacilos y bifidobacterias respectivamente. La actividad metabólica de la microbiota se evaluó cuantificando la producción de ácidos orgánicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-RID).

Determinación de carbohidratos y ácidos orgánicos

Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).

El contenido de carbohidratos fue determinado por GC-FID (Sabater y col., 2019). Los oligosacáridos se analizaron como oximas trimetilsililadas en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A; Wilmington, DE, EE. UU.) equipado con una columna capilar de sílice fundida DB-5HT, ligada, de fase reticulada (30 m × 0,25 mm d.i. y 0,25 µm de espesor de película, J&W Scientific, Folson, California, EE. UU.). La temperatura del horno fue inicialmente 180 °C aumentó a una velocidad de 3 °C min⁻¹ a 350 °C y luego se mantuvo durante 25 min. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron a 280 y 355 °C, respectivamente. Las inyecciones se realizaron en modo dividido (1 : 20) usando nitrógeno a 1 mL min⁻¹ como gas portador. La adquisición e integración de datos se realizaron con el software Agilent ChemStation Rev. B.03.01.

Cromatografía Líquida de alta resolución con detección del índice de refracción (RID).

Las concentraciones de ácidos orgánicos resultado del metabolismo de las bacterias de la microbiota colónica de ratones C57bl/6 se analizaron en un HPLC-RID (Knauer, Alemania). Con columna Rezex ROA (300 mm × 7,8 mm y tamaño de partícula de 8 µm, Phenomenex Torrance, USA) y la separación fue realizado en un modo isocrático a 55 °C usando H2SO4 0,01 M como la fase móvil, a un caudal de 0,6 mL min⁻¹. La obten-

ción y el procesamiento de datos se realizaron con Software Windows Basic Edition v.3.05 EuroChrom.

Análisis estadístico

Los análisis se realizaron por duplicado y los datos se expresaron como media \pm DE. En todos los ensayos se aplicó el análisis de varianza de una vía (ANOVA), el test de Tukey ($p < 0,05$) y el coeficiente de correlación de Pearson. Todos los análisis estadísticos se realizaron en R v3.5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la actividad β -galactosidasa

Se evaluó la actividad hidrolítica de los ELC de 11 cepas de BAL de origen lácteo (*L. plantarum*, $n = 3$; *L. paracasei*, $n = 3$; *L. bulgaricus*, $n = 4$; *L. acidophilus*, $n = 1$) pertenecientes a la colección de cultivos del CERE-LA-CONICET. Nueve cepas fueron capaces de crecer a expensas de lactosa y expresaron actividad β -gal. Entre ellas, la cepa *L. bulgaricus* CRL450 mostró valores significativamente más altos de actividad específica ($2,06 \text{ U mg}^{-1}$) que los otros microorganismos evaluados, indicando que esta propiedad es cepa dependiente y no una característica de especie (Figura 1). En cuanto a la actividad transglucosilasa, 6 cepas de BAL fueron capaces de sintetizar oligosacáridos, lo cual se vio reflejado en los cromatogramas en capa fina (TLC) en la posición correspondiente a los oligosacáridos (Vivinal-GOS fue utilizado como estándar). Actualmente, la mayoría de los GOS comerciales se sintetizan con enzimas fúngicas de los géneros *Aspergillus* o *Kluyveromyces* o bacterianas del género *Bacillus* (Chen y Gänzle, 2017). Sin embargo, la composición de monómeros y los enlaces entre las unidades de D-galactosa pueden variar dependiendo de la fuente de enzima y las condiciones de reacción, afectando su potencial prebiótico (Chen y Gänzle, 2017; Cardelle-Cobas y col., 2011). Al respecto, se ha postulado que los GOS sintetizados por bifidobacterias y lactobacilos tendrían mayor potencial prebiótico y selectividad específica al ser más fácilmente fermentados por sus mismos géneros bacterianos (Osman y col., 2010). Entre las cepas capaces de sintetizar GOS seleccionamos a *L. bulgaricus* CRL450 para estudiar las características de los GOS producidos.

Síntesis de oligosacáridos a partir de lactosa

La composición de la mezcla de oligosacáridos sintetizados por la CRL450- β -gal y Lactozym a partir de 300 g L^{-1} lactosa a 45°C , pH 6,5 y 5 horas fue analizada por GC-FID (Figura 2). En el perfil cromatográfico de ambas mezclas se pudo evidenciar la presencia de monosacáridos, disacáridos como lactosa, alolactosa (β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Glu) y 6-galactobiosa (β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Gal); los trisacáridos 6-galactosil-lactosa (β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-lactosa) y 3-galactosil-lactosa (β -D-Galp-(1 \rightarrow 3) lactosa). Se ha demostrado que otras especies de *Lactobacillus* producen enlaces β -(1 \rightarrow 6) y β -(1 \rightarrow 3) en sus productos de reacción de transglucosilación. (Splechna y col., 2006; Iqbal y col., 2010; Kittibunchakul y col., 2018). Esta característica es importante debido a que se ha demostrado en estudios recientes sobre digestibilidad de compuestos prebióticos utilizando vesículas de membrana de borde en cepillo de intestino delgado de cerdo (BBMV), que el enlace β (1 \rightarrow 6) posee mayor resistencia a la digestión gastrointestinal (Ferreira-Lazarte y col., 2019). El contenido de CRL450-GOS totales (%) al finalizar la reacción fue de 41.3%. La composición porcentual de la mezcla fue: 35.9 % de lactosa, 7.7% de alolactosa, 0.9% de 6-galactobiosa, 4.2% de otros di-GOS, 11.2% de 6-galactosil lactosa, 7.1% de 3-galactosil lactosa y 7.3% de otros tri-GOS. El contenido de GOS totales en la mezcla de Lactozym fue de 36.9 % con una composición porcentual de 44.8% de lactosa, 8% de alolactosa, 4.5% de 6-galactosil lactosa, 0.9 % de 4'GaLa, 12.9% 6'GaLa.

Determinación de la capacidad prebiótica de CRL450-GOS

Se espera que los compuestos prebióticos accedan en elevada proporción al intestino grueso para estimular el crecimiento y el metabolismo de bacterias beneficiosas como lactobacilos o bifidobacterias (Marín-Manzano y col., 2013). En este sentido, producir GOS empleando CRL450- β -gal podría ser importante para estimular su propia proliferación en un producto alimenticio u otros lactobacilos en el tracto intestinal. Por lo tanto, evaluamos la capacidad de *L. bulgaricus* CRL450 para crecer a expensas de sus propios GOS (CRL450-GOS), GOS comerciales (Vivinal GOS) y glucosa como control positivo (como control negativo se usó medio desprovisto de carbohidratos). El máximo desarrollo de este microorganismo se observó en los oligosacáridos

sintetizados por su propia β -gal ($9,75 \pm 0,22$ log UFC/ml), aunque en este sustrato la fase de latencia fue la más larga (7.32 ± 0.12 h) y se necesitó mayor tiempo para alcanzar la fase estacionaria (24 h) que en los otros sustratos (Tabla 1). Otros estudios también han informado que cepas de *Bifidobacterium* y *Propionibacterium* fermentan preferiblemente GOS antes que azúcares más fácilmente metabolizables como glucosa, galactosa o lactosa (Gopal y col., 2001; Amaretti y col., 2007; Barboza y col., 2009; Sabater y col., 2019).

Para probar la capacidad prebiótica de la mezcla de oligosacáridos sintetizados en otros microorganismos se realizaron ensayos con cultivos puros de probióticos reconocidos como las cepas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 y *Lactobacillus casei* CRL431. Las cepas se inocularon en medios que contenían como fuente de carbono Vivinal-GOS y CRL450-GOS. El crecimiento y metabolismo se evaluaron midiendo la absorbancia a 600 nm y cambios en los valores de pH del medio de crecimiento (Figura 3, Tabla 2). Para tener una actividad prebiótica, el carbohidrato estudiado debe ser metabolizado por la cepa de prueba preferentemente mejor que la glucosa. Ambos probióticos pudieron desarrollarse en GOS, como lo demuestra el aumento en DO₆₀₀ y la disminución en el pH de los medios (Figura 3, Tabla 2). Cuando se determinó el índice prebiótico (PAS) utilizando como sustratos las mezclas de oligosacáridos no purificados, se observó un valor positivo para todas las cepas y condiciones probadas (Tabla 3). Esto se debió al mayor crecimiento de las cepas benéficas probadas con respecto a la enterobacteria en los oligosacáridos testeados. Las poblaciones de lactobacilos (CRL431 y CRL 450) mostraron mayor incremento en biomasa con los oligosacáridos producidos por *L. bulgaricus* CRL 450 mientras que los oligosacáridos comerciales Vivinal-GOS, favorecieron en mayor medida el crecimiento de las bifidobacterias (Figura 3).

Fermentación in vitro de GOS por la microbiota colónica de ratones adultos C57BL/6

El principal sitio blanco de los prebióticos es el intestino grueso, en donde serán fermentados selectivamente por microorganismos beneficiosos de la microbiota endógena, como lactobacilos y bifidobacterias, productores de ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico). La suplementación de los homogenatos colónicos de ratones C57BL/6 con los nuevos oligosacáridos sintetizados por *L. bulgaricus* CRL 450 (CRL450-GOS) produjo incrementos similares en los recuentos de lactobacilos y bifidobacterias y en la concentración total de ácidos orgánicos (Tabla 3) que los observados con los GOS prebióticos comerciales Vivinal-GOS usados como referencia. La fermentación de estos sustratos produjo diferentes perfiles de ácidos orgánicos lo cual puede estar relacionado a cambios en la composición de la microbiota que involucra a otros grupos microbianos no analizados. La fermentación de CRL450-GOS produjo mayor incremento de ácidos propiónico y butírico que Vivinal-GOS, mientras que éste elevó en mayor medida la producción de ácidos láctico y acético (Tabla 3). Todos los ácidos grasos volátiles cumplen importantes funciones fisiológicas relacionadas al metabolismo energético, absorción de electrolitos, ciclo celular de los colonicitos, entre otras, por lo que su incremento es un efecto buscado mediante la manipulación dietaria. Al respecto, otros autores han demostrado el incremento de AGV por diferentes prebióticos como lactulosa, GOS y Oslu (oligosacáridos de lactulosa) tanto en ensayos in vitro como in vivo (Rycroft y col., 2001; Macfarlane y col. 2008, Cardelle Cobas y col., 2009) poniendo de manifiesto los potenciales beneficios para la salud que esto puede implicar. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren también que los nuevos oligosacáridos sintetizados por BAL (CRL450-GOS) podrían actuar favorablemente en la composición y actividad metabólica de la microbiota intestinal.

CONCLUSIONES

En las últimas décadas el interés de los consumidores por una dieta saludable ha incrementado la necesidad de la industria alimentaria de desarrollar nuevos productos funcionales, que más allá de su papel nutricional básico aporten beneficios para la salud. Al respecto, los microorganismos probióticos y los compuestos prebióticos son ingredientes funcionales que ya han sido reconocidos por el Código Alimentario Argentino lo que allana el camino en el desarrollo de nuevos productos. Entre lo prebióticos reconocidos, los GOS ocupan un lugar preponderante por su similitud con los oligosacáridos de la leche materna (HMO) y resultan de gran interés como aditivos alimentarios. Al presente, se usan mayormente enzimas fúngicas para la síntesis y/o compuestos importados, por lo que resulta de interés la síntesis usando enzimas de microorganismos autóctonos.

nos y que además proveen mayor selectividad de fermentación para la microbiota del consumidor. En este sentido, la cepa láctea *L. bulgaricus* CRL450, fue capaz de producir una mezcla de oligosacáridos a partir de lactosa (GOS) compuesta principalmente por trisacáridos con enlaces $\beta(1 \rightarrow 6)$ y $\beta(1 \rightarrow 3)$. Estos CRL450-GOS estimularon el crecimiento de la cepa productora y de cepas probióticas reconocidas (CRL431 y BB12) e incrementaron las poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias en homogenatos colónicos murinos, como también la producción de ácidos grasos de cadena corta beneficiosos para la fisiología intestinal. Actualmente, trabajamos en la optimización de la síntesis y los efectos in vivo de los GOS sintetizados para confirmar los alentadores resultados obtenidos en modelos in vitro.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el marco del Programa EMHE CSIC 2017 y financiado por PID2021-123862OB-I00 ALI de MICINN, ANPCyT PICT-3504 y Proyecto IC-901 de Universidad de San Pablo-Tucumán, Argentina.

Tabla 1. Parámetros relacionados con el crecimiento de *L. bulgaricus* CRL450 a expensas de diferentes fuentes de carbono. Los datos son medias de dos ensayos independientes (\pm DE). * pH inicial 6.5 ± 0.1 . a, b, Diferencias estadísticamente significativas en cada columna

Parámetros	Máximo crec. (h)	Log UFC/mL	Fase lag (h)	μ (h^{-1})
Glu	18	8.13 ± 0.18^a	2.83 ± 0.07^a	0.079 ± 0.001^a
Vivinal-GOS	10	7.84 ± 0.02^a	2.49 ± 0.02^a	0.145 ± 0.014^b
CRL450-GOS	24	9.75 ± 0.22^b	7.32 ± 0.12^b	0.151 ± 0.016^b

Tabla 2. Puntuaciones de actividad prebiótica (PAS) y pH final de probióticos seleccionados y *L. bulgaricus* CRL 450 en oligosacáridos. pH inicial 6.5 ± 0.1 .

	<i>L. bulgaricus</i> CRL450		<i>L. casei</i> CRL 431		<i>B. animalis</i> BB12	
	PAS	pH	PAS	pH	PAS	pH
Vivinal-GOS	1.0 (0.1)	5.6 (0.1)	1.1 (0.1)	3.8 (0.1)	0.8 (0.0)	5.8 (0.1)
CRL450-GOS	0.9 (0.2)	4.3 (0.0)	1.2 (0.0)	4.1 (0.0)	0.1 (0.1)	4.5 (0.2)

REFERENCIAS

- Amaretti, A, Bernardi, T, Tamburini, E, Zanoni, S, Lomma, M, Matteuzzi, D, Rossi, M. (2007). Kinetics and metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 growing on glucose, galactose, lactose, and galactooligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(11): 3637-3644.
- Barboza, M, Sela, DA, Pirim, C, LoCascio, RG, Freeman, SL, German, JB, Mills, DA, Lebrilla, CB. (2009). Glycoprofiling bifidobacterial consumption of galacto-oligosaccharides by mass spectrometry reveals strain-specific, preferential consumption of glycans. *Appl. Environ. Microbiol.* 23: 7319-7325.
- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cardelle-Cobas, A, Corzo, N, Olano, A, Peláez, C, Requena, T, Ávila, M. (2011). Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. *Int. J. Food Microbiol.* 149: 81-87.
- Cardelle-Cobas, A, Fernandez, M, Salazar, N, Martinez-Villaluenga, C, Villamiel, M, Ruas-Madiedo, P, de los Reyes-Gavilan, C. (2009a). Bifidogenic effect and stimulation of short chain fatty acid production in human faecal slurry cultures by oligosaccharides derived from lactose and lactulose. *J. Dairy Res.* 76: 317-325.
- Cardelle-Cobas, A, Martínez-Villaluenga, C, Sanz ML, Montilla, A. (2009b). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of galactosyl derivatives obtained by the action of two different β -galactosidases. *Food Chem.* 114: 1099-1105.
- Carević, M, Vukašinić-Sekulić, M, Ćorović, M, Rogniaux, H, Ropartz, D, Veličković, D, Bezbradica, D. (2018). Evaluation of β -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* as biocatalyst for galacto-oligosaccharides synthesis: Product structural characterization and enzyme immobilization. *J. Biosci. Bioeng.* 126(6): 697-704.
- Chen, XY, Gänzle, MG. (2017). Lactose and lactose-derived oligosaccharides: More than prebiotics?. *Int. Dairy J.* 67: 61-72.
- Douillard, FP, De Vos, WM. (2014). Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb. Cell factories* 13(1): 1-21.
- Fernández, J, Moreno, FJ, Olano, A, Clemente, A, Villar, CJ, Lombó, FA. (2018). Galacto-Oligosaccharides Preparation Derived From Lactulose Protects Against Colorectal Cancer Development in an Animal Model. *Front. Microbiol.* 9, 2004.
- Ferreira-Lazarte, A, Gallego-Lobillo, P, Moreno, FJ, Villamiel, M, Hernandez-Hernandez, O. (2019). In vitro digestibility of galactooligosaccharides: effect of the structural features on their intestinal degradation. *J. Agric. Food Chem.* 67(16): 4662-4670.
- Gibson, GR, Hutkins, R, Sanders, ME, Prescott, SL, Reimer, RA, Salminen, SJ, et al. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14: 491-502.
- Gobinath, D, Prapulla, SG. (2014). Permeabilized probiotic *Lactobacillus plantarum* as a source of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides. *Biotechnol. Lett.* 36(1): 153-157.
- Gopal, PK, Sullivan, PA, Smart, JB. (2001). Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Int. Dairy J.* 11: 19-25.
- Huebner, J, Wehling, RL, Hutkins, RW. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *Int. Dairy J.* 17(7): 770-775.
- Iqbal, S, Nguyen, TH, Nguyen, TT, Maischberger, T, Haltrich, D. (2010). β -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 345: 1408-1416.
- Kittibunchakul, S, Maischberger, T, Domig, KJ, Kneifel, W, Nguyen, HM, Haltrich, D, Nguyen, T H (2018).

- Fermentability of a novel galacto-oligosaccharide mixture by *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. *Molecules* 23(12): 3352.
- Li, D, Wang, P, Wang, P, Hu, X, Chen, F. (2016). The gut microbiota: a treasure for human health. *Biotechnol. Adv.* 34(7): 1210-1224.
- Lu, L, Xu, S, Jin, L, Zhang, D, Li, Y, Xiao, M. (2012). Synthesis of galactosyl sucralose by β -galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus* L3. *Food Chem.* 134(1): 269-275.
- Macfarlane, GT, Steed, H, Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* 104(2): 305-344.
- Marín-Manzano, MC, Abecia, L, Hernández-Hernández, O, Sanz, ML, Montilla, A, Olano, A, Clemente, A. (2013). Galacto-oligosaccharides derived from lactulose exert a selective stimulation on the growth of *Bifidobacterium animalis* in the large intestine of growing rats. *J. Agric. Food Chem.* 61(31): 7560-7567.
- Moreno, FJ, Montilla, A, Villamiel, M, Corzo, N, Olano, A. (2014). Analysis, structural characterization, and bioactivity of oligosaccharides derived from lactose. *Electrophoresis* 35: 1519-1534.
- Nguyen, TDT, Kang, JH, Lee, MS. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol.* 113(3): 358-361.
- Osman, A, Tzortzis, G, Rastall, R, Charalampopoulos, D. (2010). A comprehensive investigation of the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides by whole cells of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *J. Biotechnol.* 150(1): 140-148.
- Power, S, O'Toole, P, Stanton, C, Ross, R, Fitzgerald, G. (2014). Intestinal microbiota, diet and health. *Br. J. Nutr.* 111(3): 387-402.
- Roberfroid, M, Gibson, GR, Hoyles, L, McCartney, AL, Rastall, R, Rowland, I, et al. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104: S1-S63.
- Rycroft, CE, Jones, MR, Gibson, GR, Rastall, RA. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 91(5): 878-887.
- Sabater, C, Fara, A, Palacios, J, Corzo, N, Requena, T, Montilla, A, Zárata, G. (2019). Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides from lactose and lactulose by dairy propionibacteria. *Food Microbiol.* 77: 93-105.
- Splechtna, B., Nguyen, TH., Haltrich, D., (2006). Production of Prebiotic Galacto- Oligosaccharides from Lactose using β -Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4999-5006.
- Tymcyszyn EE, Santos, MI, Costa, MDC, Illanes, A, Gomez-Zavaglia, A. (2014). History, synthesis, properties, applications and regulatory issues of prebiotic oligosaccharides. In: *Carbohydrates Applications in Medicine* M.H. Gil (Ed.), Research Signpost, Kerala, India, pp. 127-154.
- Vera, C, Córdova, A, Aburto, C, Guerrero, C, Suárez, S, Illanes A. (2016). Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32:197, 1-20.
- Vonk, RJ, Reckman, GAR, Harmsen, HJM., Priebe, MG. (2012). Probiotics and Lactose Intolerance. In: *Probiotics*, Rigobelo, E. (Ed.). InTechOpen, DOI: 10.5772/51424. <https://www.intechopen.com/books/probiotics/probiotics-and-lactose-intolerance>
- Zárata, G, Sáez, G, Pérez Chaia, A. (2013). Microbial transformation of lactose: potential of β -galactosidases for probiotic and prebiotic purposes. In: *Lactose: structure, food industry applications and role in disorders*. Green D., Lee, E. (Eds). Nova Science Publishing, USA, pp. 1-50.