

Nº 10 - Año 2022

IDITEC

ISSN 2525-1597

ISSN 2525-1597



USP-T

UNIVERSIDAD DE SAN PABLO - TUCUMÁN

R
N
A
A

R E V I S T A
A C A D É M I C A

I D I T E C

Instituto de
Desarrollo
e Innovación
Tecnológica
para la
Competitividad
Territorial



**UNIVERSIDAD
DE SAN PABLO-T**
Tucumán | Argentina

IDITEC

Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial

Revista Académica

Universidad de San Pablo-Tucumán

Tucumán, República Argentina

Autoridades de la Universidad

Presidente de la Fundación para el Desarrollo

Dra. Catalina Lonac

Rector

Dr. Ramiro Albarracín

Vicerrector

Dr. Inés de los Ángeles Yamúss

Director del Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial

Dr. Federico Pérez Zamora

Director del Instituto de Estudios Sociales, Política y Cultura

Abogado .Mariano Arcas

Director del Instituto de Salud y Calidad de Vida

Dr. Horacio Deza

Director del Instituto de Diseño, Estrategia & Creatividad

Arq. Matías Rohmer-Liztmann

Dirección de Posgrado

Lic. Juan Pablo Pinna

Dirección de unidad administrativa y Financiera

CPN María Cristina Peralta

Dirección de Extensión y Cultura

Abogado Juan Grande

Dirección de evaluación y acreditación

Mg. Silvia Martínez

Secretario de Investigación, Desarrollo y Cultura

Dr Javier Habib

Director

Prof. Mg. Karina González (USPT)

Consejo Editorial Científico:

Prof. Dra. María José Catalán (UNT-USPT)

Prof. Mg. Margarita Jaramillo (USPT)

Prof. Dr. Alejandro Daniel Ríos (UNT-USPT)

Prof. Mg. Adriana del Valle Pastoriza (UNT)

Prof. Dra. Gabriela Zárate (USPT-CONICET)

Prof. CPN Cecilia Fabiana Gagliardi (USPT)

Prof. Arq. Josefina María del Valle Ocampo (USPT)

Pares evaluadores:

Prof. Mg. Marcela Blanca Colombo (UNT - USPT)

Prof. Mg. Adriana del Valle Pastoriza (UNT)

Prof. Dra. Juana Albarracín (USPT)

Dra. Luz Lastres Flores (ADEQRA)

Dra. Eugenia Giamminola (IEAH-UNSA)

Dr. Dariel Cabrera Mederos (IPAV-INTA)

Prof. Héctor Ostengo (UNT)

Prof. Mg. Alicia Margarita Nasif (UNT)

Prof. Dra. Natalia Zavadivker (UNT)

Dra. Pamela Terán Baptista (UNT)



UNIVERSIDAD
DE SAN PABLO-T
Tucumán | Argentina

PRESENTACIÓN

IDITEC es una publicación semestral que recoge los resultados de los trabajos de investigación de profesores e investigadores nacionales y extranjeros, que sean de interés para la comunidad en las áreas de la Ciencia de los Alimentos ; Agricultura y Gestión. La misión de IDITEC es abordar temas multidisciplinarios de investigación y/o análisis que posean un interés regional, nacional e internacional. Las publicaciones pueden realizarse en español, inglés o portugués. La Revista, está puesta al servicio de la comunidad científica y académica en general (docentes, investigadores y estudiantes), dirigida tanto a la teoría como a la práctica.

EVALUACIÓN DE LA DIGESTIÓN DE LOS GALACTOOLIGOSACÁRIDOS SINTETIZADOS POR PROPIONIBACTERIAS.

Fara A.^a, Hernández Hernández O.^b, Montilla A.^b, and Zárate G.^{a,c*}.

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

^bGrupo de Química y Funcionalidad de Carbohidratos y Derivados, CIAL (CSIC-UAM), Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, España.

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

* gzarate@uspt.edu.ar ; gzarate@cerela.org.ar

Resumen

Las modificaciones en composición y concentraciones que sufren los oligosacáridos prebióticos durante su pasaje por el tracto gastrointestinal pueden afectar sus propiedades y sus efectos en el huésped. En el presente estudio evaluamos la digestibilidad *in vitro* de los oligosacáridos sintetizados por la β -galactosidasa de *Acidipropionibacterium acidipropionici* (LET120- β -gal) a partir de lactosa (LET120-GOS) incubándolos con vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV) de cerdo como modelo de mucosa intestinal de mamíferos. Los oligosacáridos potencialmente prebióticos sintetizados por las propionibacterias se degradaron parcialmente cuando fueron expuestos a BBMV durante 5 horas siendo los enlaces $\beta(1\rightarrow6)$ de los disacáridos y trisacáridos presentes, los más resistentes a las enzimas digestivas. El análisis de la digestibilidad de compuestos potencialmente prebióticos es crucial para determinar la fracción que llegaría al colon para ser fermentada y determinar la dosis necesaria para ejercer sus efectos benéficos en el consumidor.

Palabras clave: Propionibacterias; oligosacáridos, BBMV.

Abstract

The changes in concentrations and composition that prebiotic oligosaccharides undergo during their passage through the gastrointestinal tract can affect their properties and effects on the host. In the present study we evaluated the *in vitro* digestibility of the oligosaccharides synthesized by *Acidipropionibacterium acidipropionici* (LET120- β -gal) β -galactosidase from lactose (LET120-GOS) by incubating them with pig brush border membrane vesicles (BBMV) as a model of mammalian intestinal mucosa. Potential prebiotic oligosaccharides synthesized by propionibacteria were partially degraded when exposed to BBMV during 5 h and $\beta(1\rightarrow6)$ linkages between units showed the greatest resistance to mammalian digestive enzymes. The assessment of digestibility of potential prebiotics is crucial for determining the active fraction that would reach the colon to be fermented and to define the dose required for beneficial effects in the host.

Keywords: Propionibacteria; oligosaccharides, BBMV

INTRODUCCIÓN

La dieta influye en gran medida en el establecimiento, la estructura y la actividad metabólica de la microbiota intestinal, el órgano más grande y activo del cuerpo humano, con un papel clave en numerosos procesos fisiológicos, nutricionales e inmunológicos (Li et al., 2016; Singh et al., 2017). El desarrollo de muchas enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como la diabetes tipo 2, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, cáncer colorrectal, etc, ha sido asociado a los hábitos alimentarios de la sociedad (Singh et al., 2017; Noce et al., 2019). Estudios recientes han sugerido que las ECNT son el resultado de la alteración negativa del equilibrio de la microbiota (disbiosis) (Power et al., 2014, Li et al., 2016) causada por el consumo de alimentos altamente procesados, ricos en grasas y pobres en fibra dietaria. (Singh et al., 2017; Popkin, et al., 2021). Es por ello, que se buscan estrategias para modular de forma positiva la microbiota intestinal a fin de prevenir y/o tratar estas patologías (Power et al., 2014, Li et al., 2016).

Los probióticos y los prebióticos son los ingredientes funcionales más aceptados y respaldados como herramientas para la modulación del microbioma (Scott et al., 2015; Collins y Reid, 2016; Sanders et al., 2019). Los prebióticos se definieron como sustratos que son utilizados de manera selectiva por los microorganismos del huésped que confieren un beneficio para la salud (Gibson et al., 2017). Entre los más reconocidos se encuentran los oligosacáridos no digeribles (OND). Los galactooligosacáridos (GOS) han recibido especial atención por sus propiedades biotecnológicas y para la salud. Si bien son componentes naturales de la leche materna (HMO) y están presentes en algunos alimentos, sus concentraciones muchas veces son insuficientes para ejercer efectos significativos, lo que ha alentado su producción mediante reacciones químicas o enzimáticas (Moreno et al., 2017).

La enzima β -galactosidasa (β -gal) ha sido descrita en numerosos microorganismos y cataliza la hidrólisis y la transgalactosilación de la lactosa (Vera et al., 2016; Xavier et al., 2018). En la reacción de transgalactosilación, el residuo de galactosa se transfiere a lactosa u otros aceptores para formar GOS de diferente grado de polimerización (1 a 8 unidades de galactosa y una glucosa terminal) y diferentes enlaces. Varios estudios han demostrado la síntesis de galactosil derivados por β -gal de *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus circulans*, *bifidobacteria* y bacterias del ácido láctico entre otras fuentes microbianas (Osman et al., 2010; Gobinath et al., 2014; Cardelle-Cobas et al., 2016; Yin et al., 2017; Chanalía et al., 2018; Fara et al., 2020).

La mayoría de los estudios se han centrado en su síntesis, estructura, propiedades tecnológicas y beneficios en la salud, y solo unos pocos han evaluado sus modificaciones durante su paso por el tracto gastrointestinal superior, aun cuando esto podría afectar sus propiedades (Laparra et al., 2014; Li et al., 2015; Ferreira-Lazarte et al., 2021). Estudios recientes (Ferreira-Lazarte et al., 2017; 2019, Gallego-Lobillo et al., 2020) han propuesto el uso de enzimas del intestino delgado de rata o cerdo para evaluar la digestión intestinal *in vitro* de oligosacáridos. En estudios previos (Sabater et al., 2019) determinamos la capacidad de la enzima β -gal de *Acidipropionibacterium acidipropionici* LET120 para sintetizar GOS a partir de lactosa (LET120-GOS). En el presente trabajo, evaluamos su digestibilidad utilizando vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV) de cerdo, como un método accesible que simula el proceso *in vivo* que ocurre en el intestino delgado de los mamíferos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y microorganismo usados

Se usaron los siguientes reactivos: D-galactosa, D-glucosa, fructosa, lactosa, rafinosa, estaquiosa, fenil- β -glucósido, o-nitrofenol (ONP), y o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.); El reactivo de Bradford fue proporcionado por Bio-Rad Laboratory (GmbH, Munich, Alemania). *A. acidipropionici* LET 120 fue activado por 3 pases sucesivos cada 24 hs en caldo MRS con incubación a 37 °C.

Inducción y extracción de β -gal.

Para inducir la síntesis de la enzima, *A. acidipropionici* LET120 se inoculó al 2% (v/v) en caldo MRS, suplementado con lactosa como fuente de carbono (0,5%) y se incubó durante 24 h a 37 °C. Las células bacterianas se recolectaron centrifugando en frío a 10000 x g por 15 min, se lavaron y resuspendieron en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 6.5. Las células se rompieron con perlas de vidrio estériles (diámetro, 150-212 μ m; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) con FastPrep (Bio101; Savant Instruments, Holbrook, NY, EE. UU.). Las perlas de vidrio se eliminaron mediante centrifugación y el extracto libre de células (ELC) que contenía β -gal, se almacenó a -80 °C. El contenido de proteínas se determinó mediante kit de proteínas Bio-Rad. La albúmina de suero bovino se usó como estándar.

Síntesis de LET120-GOS

La síntesis de galactooligosacáridos por β -gal de *A. acidipropionici* LET120 se realizó siguiendo el protocolo de Sabater (2019). La lactosa (300 g L⁻¹ de concentración final), se mezcló con el ELC de *A. acidipropionici* LET120 a pH 6.5, 45 °C y 1.3 U mL⁻¹ de enzima durante 5 h y las reacciones se detuvieron sumergiendo los tubos en agua hirviendo para inactivar la enzima. Para la semi-purificación de los LET120-GOS se mezcló 1 mL de la mezcla de GOS y 3 g de carbón activado (malla 100–400) en 100 mL de etanol al 10% y se agitó durante 30 min. Las mezclas se filtraron a través de papel Whatman No. 1 y el carbón se agitó con 100 mL de etanol al 50% durante 30 min para eliminar los oligosacáridos. Luego de una segunda filtración, la solución se concentró en un evaporador rotatorio al vacío (40 °C), se disolvió en 1 mL de agua desionizada y se almacenó a -20 °C (Fara et al., 2020). Las muestras de GOS semi-purificadas se analizaron mediante cromatografía de gases (GC-FID).

Preparación de vesículas de membrana del borde en cepillo (BBMV) de intestino delgado de cerdo.

Para obtener las BBMV se siguió la metodología de Ferreira-Lazarte et al. (2019). La mucosa de intestino delgado de cerdos de 7-10 meses de edad se suspendió en tampón de fosfato de sodio con manitol 50 mM (4 °C), se homogeneizó con CaCl₂ 10 mM (Ultra-Turrax, IKA T18 Basic) y se centrifugó a 3000 x g durante 30 min. El sobrenadante se centrifugó a 27000 x g durante 40 min. Se descartó la fracción soluble y el precipitado, que contenía las BBMV se liofilizó y se mantuvo a -80 °C hasta su uso.

Determinación de la actividad de β -galactosidasa de BBMV y RSIE

La actividad de β -gal de los extractos de mucosa de cerdo se cuantificó midiendo la tasa de hidrólisis del sustrato ONPG con un método colorimétrico de acuerdo con nuestro protocolo previo (Sabater et al., 2019): 10 mg mL⁻¹ BBMV se homogeneizaron en tampón de fosfato de sodio 0,05 M frío que contenía azida de sodio al 0,1 % (p/v) y luego se centrifugaron durante 10 min a 3000 x g. La actividad enzimática y el contenido de proteína se determinaron en los sobrenadantes. Para la reacción enzimática se mezcló 1,9 mL de 0,5 mg mL⁻¹ de ONPG con 0,1 mL de solución de BBMV. La liberación de ONP se monitorizó durante 2 h a 37 °C y 420 nm

en un espectrofotómetro de microplacas automatizado (Specord® Plus, Analytik Jena). El contenido de proteínas de cada extracto se determinó mediante el método de Bradford (1976). Las actividades enzimáticas se expresaron como actividades específicas (U mg^{-1}). 1 unidad de β -gal se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de ONP por minuto en las condiciones descriptas.

Digestión in vitro de LET120-GOS usando BBMV.

Las soluciones de intestino delgado de cerdo (10 mg mL^{-1} en tampón de fosfato de sodio 0,05 M, pH 7) se mezclaron con $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ LET120-GOS y se incubó a 37°C durante 5 h a 450 rpm. Se tomaron muestras a las 0, 1, 2, 3,5 y 5 horas de reacción y se inactivaron en agua hirviendo para detener la digestión. Lactosa y BBMV también se analizaron como controles sin GOS. La cuantificación de los oligosacáridos luego de la digestión se determinó mediante GC-FID.

Cuantificación de oligosacáridos por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).

La concentración de carbohidratos en la mezcla antes y después de las digestiones se analizaron mediante GC-FID de acuerdo con Fara et al., 2020. $15 \mu\text{L}$ de la mezcla de reacción ($4,5 \text{ mg}$ de oligosacáridos) se añadieron a $0,4 \text{ mL}$ de fenil- β -glucósido ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de patrón interno). La mezcla se secó en un evaporador rotatorio (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza) a 40°C . Las trimetiloximas se formaron añadiendo $250 \mu\text{L}$ de cloruro de hidroxilamina ($2,5\%$) en piridina, seguido por incubación a 70°C durante 30 min. Luego se añadieron $250 \mu\text{L}$ de hexametildisilazano y $25 \mu\text{L}$ de ácido trifluoroacético. La mezclas se incubaron a 50°C por 30 min y se centrifugaron durante 2 min a 10 000 rpm. Los sobrenadantes se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A (Wilmington, DE, EE. UU.) con una columna capilar de sílice fundida comercial DB-5HT, ligada, fase reticulada ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$ de diámetro interior y $0,25 \mu\text{m}$ de espesor de película) (J&W Scientific, Folsom, California, EE. UU.). Inicialmente, la temperatura del horno fue de 180°C , se aumentó a una velocidad de 3°C min^{-1} a 350°C y finalmente se mantuvo durante 25 min. El inyector y detector se fijaron en 280 y 355°C , respectivamente. Las inyecciones se realizaron utilizando nitrógeno a 1 mL min^{-1} como gas portador, en modo dividido (1:30). Los resultados se analizaron con software Agilent ChemStation Rev. B.03.01. Soluciones que contenían galactosa, glucosa, lactosa, rafinosa y estaquiosa y se prepararon en el rango de concentración esperado y los factores de respuesta se calcularon en relación con el patrón interno.

Análisis Estadístico.

Las reacciones de digestión se hicieron en dos análisis GC-FID ($n = 2$) y por duplicado. El test de Tukey permitió determinar las diferencias significativas entre los valores medios después del análisis de varianza (ANOVA de una vía). Se utilizó el programa GraphPad Prism 6 y se consideró estadísticamente significativa una $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La digestibilidad de los galactooligosacáridos (GOS) ha sido poco evaluada y mediante el uso de métodos inadecuados, como soluciones gastrointestinales artificiales sin carbohidrasas (Minekus et al., 2014). El tracto intestinal de los mamíferos contiene varias enzimas lipolíticas (lipasa, colipasa), proteolíticas (tripsina, quimotripsina) e hidrolasas como lactasa, maltasa-glucoamilasa, sacarasa-isomaltasa y trehalasa, que son enzimas involucradas en el catabolismo

de los carbohidratos (Hooton et al., 2015). En este trabajo utilizamos enzimas de la mucosa intestinal de cerdos (BBMV) para evaluar la digestibilidad de los GOS sintetizados por propionibacterias mediante un método *in vitro* desarrollado por Ferreira-Lazarte et al. (2017; 2019). Su capacidad para hidrolizar β -glucósidos (actividad β -gal) fue de 4.9 U mg⁻¹ y su contenido de proteína de 2.2 \pm 0.1 % (p/p).

Según el análisis cromatográfico en la mezcla de GOS sintetizados por β -gal de propionibacterias (LET-120-GOS) y purificados con carbón activado se pudo detectar los siguientes disacáridos y trisacáridos: lactosa [β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc], alolactosa [β -Gal-(1 \rightarrow 6)-Glc], 6-galactobiosa [β -Gal-(1 \rightarrow 6)-Gal] y otros disacáridos no identificados. La fracción de trisacáridos estuvo compuesta mayoritariamente por 3-galactosil lactosa, [β -Gal-(1 \rightarrow 3)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc], seguido de 6-galactosil lactosa [β -Gal-(1 \rightarrow 6)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc], 4-galactosil lactosa [β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc] y otros trisacáridos no identificados. La composición porcentual fue: 1.3% de galactosa, 4.7% de glucosa, 40.9% de lactosa, 1.1% de alolactosa, 0.5% de 6'galactobiosa, 9.5% de otros disacáridos desconocidos, 15.2% de 3'galactosil lactosa, 6.3% de 4'galactosil lactosa, 6.8% de 6'galactosil lactosa y 13.8% de otros trisacáridos, resultando un total de 53.2% de GOS totales.

La Tabla 1 muestra los contenidos de carbohidratos en la mezcla de oligosacáridos a lo largo de la digestión con BBMV. La lactosa se incluyó para comparar la digestión del sustrato libre. A medida que avanzaba la digestión, se observó un aumento en los niveles de monosacáridos y disminución progresiva en las fracciones de di- y trisacáridos (Tabla 2). Al finalizar la digestión, el 46,8 % de los GOS fue degradado por BBMV. Un análisis individual de los carbohidratos mostró que tras 2 h de reacción con las enzimas digestivas (tiempo promedio de tránsito en el intestino delgado), solo se hidrolizó la lactosa (β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc) mientras que la alolactosa (β -Gal-(1 \rightarrow 6)-Glc) y 6-galactobiosa [β -Gal-(1 \rightarrow 6)-Gal] no se degradaron en absoluto (Figura 1). La mayor degradación de la lactosa, con respecto a sus isómeros, así como la mayor resistencia de las galactosilgalactosas en lugar de las galactosilglucosas ha sido previamente demostrada en estudios *in vitro* e *in vivo* (Hernández-Hernández et al., 2012; Julio-Gonzalez et al., 2019). En cuanto a los trisacáridos, aquellos con enlace β (1 \rightarrow 6) mostraron una mayor resistencia a la degradación intestinal que los GOS con enlaces β (1 \rightarrow 4) y β (1 \rightarrow 3) (Tabla 1 y figura 2), en concordancia con estudios previos (Hernández-Hernández et al., 2012, Ferreira-Lazarte et al., 2019). A las 2 h de reacción con la mezcla de LET120-GOS, BBMV hidrolizó 23,5% de 6'GaLa, 25,4% de 4'GaLa y 44,7% de 3'GaLa.

El uso de modelos realistas, como la digestión *in vitro* con enzimas de mucosa de intestinal de mamíferos ha demostrado que muchos GOS potencialmente prebióticos se podrían hidrolizar en diferente grado, lo que afectaría su disponibilidad en el colon. La β -gal de *A. acidipropionici* LET120 produce mediante transgalactosilación, oligosacáridos con enlaces β (1 \rightarrow 3) y β (1 \rightarrow 6) (Sabater et al., 2019), al igual que otras cepas de bacterias lácticas y bifidobacterias (Iqbal et al., 2010, Fara et al., 2020). Se ha reportado que los enlaces β (1 \rightarrow 6) son preferidos por la β -gal de bifidobacterias (Cardelle-Cobas et al., 2011), y de acuerdo a nuestros resultados y los de otros estudios serían los más resistentes a la digestión intestinal, por lo que estos compuestos estarían biodisponibles para ejercer su efecto bifidogénico en el colon. Por el contrario, los enlaces β (1 \rightarrow 3) y β (1 \rightarrow 4) son mayormente degradados por las enzimas intestinales. Las disacaridasas presentes en las BBMV de cerdo han demostrado hidrolizar LET120-GOS, y esto podría deberse a su composición dominada por β (1 \rightarrow 3) galactosil lactosa. La tabla 3 muestra el porcentaje de carbohidratos iniciales (como di-GOS, tri-GOS y sustratos totales) que accederían al colon para ser fermentados luego del pasaje por el intestino delgado.

Los resultados de este estudio revelaron que la digestión intestinal *in vitro* con BBMV degradó parcialmente los GOS potencialmente prebióticos sintetizados por *A. acidipropionici* LET120 lo que afectaría la dosis que accede al colon para ejercer sus efectos beneficiosos. Sin embargo, se deben realizar estudios *in vivo* para confirmar estos resultados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por EMHE-CSIC 2017, PICT-3504 de ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina) y Proyecto IC-901 de la USPT (Universidad de San Pablo-Tucumán).

BIBLIOGRAFÍA

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-445 dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1): 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(1): 81–87.
- Cardelle-Cobas A, Olano A, Irazoqui G, Giacomini C, Batista-Viera F, Corzo N; Corzo-Martinez, M. 2016. Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose (OsLu) using soluble and immobilized *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4, 1–21.
- Chanalia, P., Gandhi, D., Attri, P., Dhanda, S. 2018. Purification and characterization of β -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. *Bioorg. Chem.* 77: 176-189.
- Collins S, Reid G. 2016. Distant site effects of digested prebiotics. *Nutrients.* 8:523.
- Fara, A., Sabater, C., Palacios, J., Requena, T., Montilla, A., & Zárata, G. 2020. Prebiotic galactooligosaccharides production from lactose and lactulose by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450. *Food & Funct.* 11(7): 5875-5886.
- Ferreira-Lazarte, A., P. Gallego-Lobillo, F. J. Moreno, M. Villamiel, and O. Hernández-Hernández. 2019. In vitro digestibility of galactooligosaccharides: Effect of the structural features on their intestinal degradation. *J. Agric. Food Chem.* 67 (16): 4662–70.
- Ferreira-Lazarte, A., A. Olano, M. Villamiel, and F. J. Moreno. 2017. Assessment of in vitro digestibility of dietary carbohydrates using rat small intestinal extract. *J. Agric. Food Chem.* 65(36): 8046–53.
- Ferreira-Lazarte, A., Moreno, F. J., & Villamiel, M. 2021. Bringing the digestibility of prebiotics into focus: update of carbohydrate digestion models. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 61(19): 3267-3278.
- Gallego-Lobillo, P., A. Ferreira-Lazarte, O. Hernández-Hernández, and M. Villamiel. 2020. Kinetic study on the digestibility of lactose and lactulose using small intestinal glycosidases. *Food Chem.* 316, 126326.
- Gibson, G. R., R. Hutkins, M. E. Sanders, S. L. Prescott, R. A. Reimer, S. J. Salminen, K. Scott, C. Stanton, K. S. Swanson, P. D. Cani, et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14(8): 491–502.
- Gobinath, D., Prapulla, S.G. Permeabilized probiotic *Lactobacillus plantarum* as a source of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides. 2014. *Biotechnol Lett.* 36, 153–157.
- Hernández-Hernández, O., M. C. Marin-Manzano, L. A. Rubio, F. J. Moreno, M. L. Sanz, and A. Clemente. 2012. Monomer and linkage type of galacto-oligosaccharides affect their resistance to ileal digestion and prebiotic properties in rats. *J Nutr.* 142(7):1232–9.

- Hernández-Hernández, O., A. Olano, R. A. Rastall, and F. J. Moreno. 2019. In vitro digestibility of dietary carbohydrates: Toward a standardized methodology beyond amylolytic and microbial enzymes. *Front. Nutr.* 6, 61.
- Hooton, D., Lentle, R., Monro, J., Wickham, M., & Simpson, R. 2015. The secretion and action of brush border enzymes in the mammalian small intestine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 59-118.
- Iqbal, S., Nguyen, T.H., Nguyen, T.T., Maischberger, T., Haltrich, D., 2010. β -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 345, 1408–1416.
- Julio-Gonzalez, L. C., O. Hernández-Hernández, F. J. Moreno, A. Olano, M. L. Jimeno, and N. Corzo. 2019. Trans-b-galactosidase activity of pig enzymes embedded in the small intestinal brush border membrane vesicles. *Sci. Rep.* 9(1): 960.
- Laparra, J. M., M. Díez-Munición, M. Herrero, and F. J. Moreno. 2014. Structural differences of prebiotic oligosaccharides influence their capability to enhance iron absorption in deficient rats. *Food Funct.* 5 (10): 2430–7.
- Li, W., K. Wang, Y. Sun, H. Ye, B. Hu, and X. Zeng. 2015. Influences of structures of galactooligosaccharides and fructooligosaccharides on the fermentation in vitro by human intestinal microbiota. *JFF.* 13: 158–68.
- Li D, Wang P, Wang P, Hu X, Chen F: 2016. The gut microbiota: a treasure for human health. *Biotechnol Adv*, 34: 1210-1224.
- Minekus, M.; Alming, M.; P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carriere, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, et al., 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* 5, 1113–1124.
- Moreno, FJ; N Corzo, A. Montilla, M. Villamiel, A. Olano. 2017. Current state and latest advances in the concept, production and functionality of prebiotic oligosaccharides. *Curr. Opin. Food Sci.* 13:50–55.
- Noce, A., Marrone, G., Di Daniele, F., Ottaviani, E., Jones, G.W., Bernini, R., Romani, A., Rovella, V. 2019. Impact of gut microbiota composition on onset and progression of chronic non-communicable diseases. *Nutrients.* 11(5): 1073.
- Osman, A., Tzortzis, G., Rastall, R.A., Charalampopoulos, D. 2010. A comprehensive investigation of the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides by whole cells of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *J. Biotechnol.* 150: 140–148.
- Popkin, B.M., Barquera, S., Corvalan, C., Hofman, K.J., Monteiro, C., Ng, S.W., Swart, E.C., Taillie, L.S. 2021. Towards unified and impactful policies to reduce ultra-processed food consumption and promote healthier eating. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 9(7): 462-470.
- Power, S. E., O'Toole, P. W., Stanton, C., Ross, R. P., & Fitzgerald, G. F. 2014. Intestinal microbiota, diet and health. *BJN.* 111(3): 387-402.
- 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.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16(10): 605-616.

Scott KP, Antoine J-M, Midtvedt T, van Hemert S. 2015. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microb Ecol Health Dis.* 26:25877.

Singh, R. K., Chang, H., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, T. H., Tina Bhutani, T. & Liao, W. 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Transl Med.* 15(1): 1-17.

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.

Xavier, J. R., Ramana, K. V., & Sharma, R. K. 2018. β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. *J. Food Biochem.* 42(5), e12564.

Yin, H., Bultema, J.B., Dijkhuizen, L., van Leeuwen, Sander, S., 2017. Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. *Food Chem.* 225: 230–238.

Figura 1: Grado de hidrólisis (%) de di- y tri-sacáridos durante la digestión de LET120-GOS, a las 2 h y 5 h de reacción.

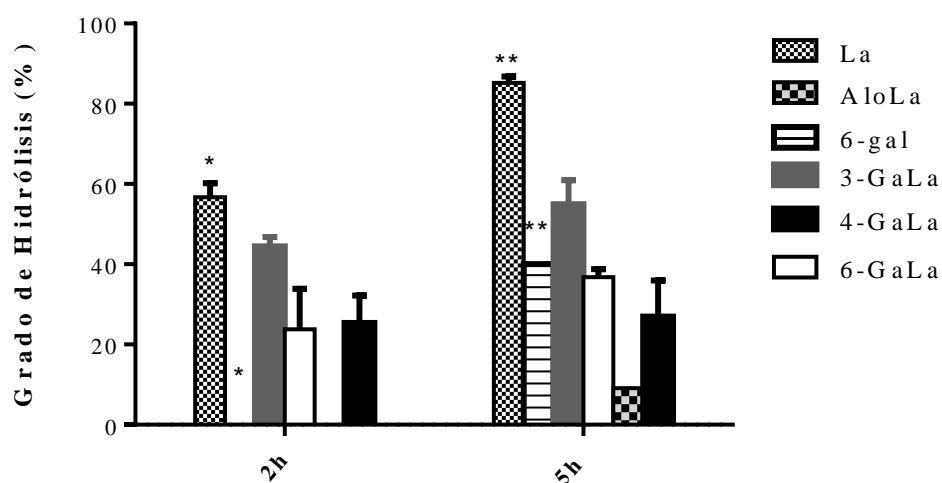


Tabla. 1 Contenido de carbohidratos (% de carbohidratos totales cuantificados) determinado por GC–FID en muestras digeridas con BBMV a 37 °C y pH 7.

Digestión (h)	Glucosa	Galactosa	Lactosa	AloLa	6-gal	Otros DI-GOS	3' GaLa	4' GaLa	6' GaLa	Otros TRI-GOS	GOS
Lactosa											
0	0.0±0.0	0.0±0.0	100.0±0.0								
1	29.6±2.8	26.0±1.4	44.4±1.3								
2	36.9±0.6	31.6±0.4	31.5±1.1								
3.5	43.4±2.2	43.3±2.5	13.3±0.3								
5	44.4±1.8	48.0±1.8	7.6±0.0								
LET120-GOS											
0	4.7±0.0	1.3±0.1	40.9±0.8	1.1±0.1	0.5±0.0	9.5±0.6	15.2±0.2	6.3±0.1	6.8±0.1	13.8±0.6	53.2±0.9
1	16.1±0.9	13.6±0.8	28.4±0.9	1.1±0.0	0.5±0.0	5.9±0.0	11.4±0.1	5.7±0.1	5.6±0.4	11.8±1.4	41.9±0.7
2	23.1±1.2	23.1±1.6	17.6±1.3	1.1±0.0	0.5±0.0	5.8±0.3	8.4±0.3	4.7±0.4	5.2±0.8	10.4±0.4	36.2±1.5
3.5	28.6±1.7	26.3±1.0	11.5±0.5	1.1±0.0	0.4±0.0	5.5±0.2	7.2±0.3	4.7±0.7	5.2±0.4	9.5±1.8	33.6±2.1
5	31.2±0.2	34.4±1.2	6.1±0.6	1.0±0.0	0.3±0.0	4.5±0.2	6.8±0.9	4.6±0.6	4.3±0.1	6.8±0.6	28.3±0.9

Los datos son la media ± DE (n=2). AloLa = alolactosa, 6-Gal= 6-galactobiosa, 3' GaLa= β-1.3-galactosil lactosa, 4' GaLa= β-1.4-galactosil lactosa, 6' GaLa= β-1.6-galactosil lactosa. GOS= Contenido de oligosacáridos basado en la suma de di- y trisacáridos.

Tabla 2. Hidrólisis (%) evolución de di y trisacáridos durante la digestión con BBMV y RSEI.

120GOS	BBMV	
	Di-GOS	Tri-GOS
Tiempo (h)		
0	0.0	0.0
1	32.4	18.1
2	32.3	31.8
3.5	40.1	36.8
5	47.7	46.6.

Tabla 3. Carbohidratos remanentes (%) que estarían disponibles para ser fermentados por la microbiota colónica.

Tiempo (h)	0	1	2	3.5	5
Di-GOS	100±0.0 ^C	67.6±0.0 ^B	67.7±3.2 ^B	59.9±1.3 ^A	52.3±1.3 ^A
Tri-GOS	100±0.0 ^D	81.9±1.8 ^C	68.2±2.9 ^B	63.2±5.5 ^B	53.4±2.4 ^A
Sustratos totales*	100±0.0 ^D	94.1±0.1 ^D	74.8±1.8 ^C	57.2±3.0 ^B	36.6±1.5 ^A

*GOS + lactosa remanente en la mezcla

(A,B,C,D) Diferencias estadísticas significativas de los oligosacáridos entre cada tiempo (filas)