



## Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos

N. Corzo<sup>1</sup>, J. L. Alonso<sup>2</sup>, F. Azpiroz<sup>3</sup>, M. A. Calvo<sup>4</sup>, M. Cirici<sup>5</sup>, R. Leis<sup>6</sup>, F. Lombó<sup>7</sup>, I. Mateos-Aparicio<sup>8</sup>, F. J. Plou<sup>9</sup>, P. Ruas-Madiedo<sup>10</sup>, P. Rúperez<sup>11</sup>, A. Redondo-Cuenca<sup>12</sup>, M. L. Sanz<sup>13</sup> y A. Clemente<sup>14</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM) Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Vigo. Facultad de Ciencias, Campus de Ourense, Ourense. <sup>3</sup>Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona. <sup>4</sup>Grupo de investigación en Microbiología aplicada y medio-ambiental, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Barcelona. <sup>5</sup>BENEO. Connecting nutrition and health, BENEIO-Ibérica Barcelona. <sup>6</sup>Unidad de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica, Dpto. Pediatría, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Área de Gestión Integrada de Santiago, Universidad de Santiago de Compostela. <sup>7</sup>Grupo de Investigación de Biotecnología y Terapia Experimental basada en Nutraceuticos (BITTEN), Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, Facultad de Medicina, Oviedo. <sup>8</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid. <sup>9</sup>Grupo de Biotecnología Aplicada, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Madrid. <sup>10</sup>Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias - (IPLA-CSIC) Asturias. <sup>11</sup>Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) Madrid. <sup>12</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología II, Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. <sup>13</sup>Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental, Instituto de Química Orgánica General (CSIC), Madrid. <sup>14</sup>Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada. España.

### Resumen

Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles (oligosacáridos) que llegan al colon y sirven de sustrato a los microorganismos, originando energía, metabolitos y micronutrientes utilizados por el hospedador y estimulando el crecimiento selectivo de determinadas especies beneficiosas (principalmente, bifidobacterias y lactobacilos) de la microbiota intestinal. En este artículo se realiza una revisión sobre los carbohidratos prebióticos desde diferentes perspectivas, comenzando por las definiciones de prebióticos formuladas a lo largo de los últimos treinta años por científicos y diferentes organismos internacionales. Se realiza una descripción detallada de los prebióticos aceptados, como tales, que presentan propiedades beneficiosas fundamentadas en estudios llevados a cabo en humanos (fructanos tipo inulina y FOS; GOS, lactulosa y oligosacáridos de leche humana), los que se consideran prebióticos emergentes y aquellos que se encuentran en fases iniciales de estudio. Además y teniendo en cuenta que la estructura química de los carbohidratos influye notablemente en sus propiedades prebióticas, se describen las técnicas más utilizadas para su análisis y caracterización. Asimismo, se detallan los modelos *in vitro* e *in vivo* más utilizados para estudiar la resistencia de los prebióticos a la digestión y la absorción gastrointestinal, la fermentación de los prebióticos en el colon así como los criterios a tener en cuenta para llevar a cabo ensayos de intervención en humanos. Por último se realiza una amplia descripción de los efectos beneficiosos de los prebióticos para la salud a nivel intestinal y

### PREBIOTICS: CONCEPT, PROPERTIES AND BENEFICIAL EFFECTS

#### Abstract

Prebiotics are non-digestible food ingredients (oligosaccharides) that reach the colon and are used as substrate by microorganisms producing energy, metabolites and micronutrients used for the host; in addition they also stimulate the selective growth of certain beneficial species (mainly bifidobacteria and lactobacilli) in the intestinal microbiota. In this article, a multidisciplinary approach to understand the concept of prebiotic carbohydrates, their properties and beneficial effects in humans has been carried out. Definitions of prebiotics, reported by relevant international organizations and researchers, are described. A comprehensive description of accepted prebiotics having strong scientific evidence of their beneficial properties in humans (inulin-type fructans, FOS, GOS, lactulose and human milk oligosaccharides) is reported. Emerging prebiotics and those which are in the early stages of study have also included in this study. Taken into account that the chemical structure greatly influences carbohydrates prebiotic properties, the analytical techniques used for their analysis and characterization are discussed. *In vitro* and *in vivo* models used to evaluate the gastrointestinal digestion, absorption resistance and fermentability in the colon of prebiotics as well as major criteria to design robust intervention trials in humans are described. Finally, a comprehensive

**Correspondencia:** Nieves Corzo  
Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos.  
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación.  
CIAL (CSIC-UAM) Campus Cantoblanco CEIO UAM + CSIC  
Nicolás Cabrera, 9 28029 Madrid  
E-mail: nieves.corzo@csic.es

sistémico. Como conclusión, podría decirse que la investigación existente hasta el momento, sobre prebióticos, es extensa y pone de manifiesto que es necesario considerar un gran número de factores para poder atribuir alegaciones de salud a un prebiótico.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):99-118)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8715

Palabras clave: *Prebióticos. Definiciones. Análisis. Modelos. Efectos beneficiosos.*

## Introducción

Actualmente los consumidores están cada vez más concienciados de la relación que existe entre dieta y salud, hecho que ha impulsado el desarrollo y la comercialización de alimentos funcionales con propiedades beneficiosas. El nuevo estilo de vida ha provocado el abandono de determinados hábitos saludables de alimentación que durante años han formado parte de nuestra historia y tradición. Existe una gran variedad de compuestos con una determinada actividad funcional y que se podrían utilizar como ingredientes alimentarios o suplementos dietéticos. De todos ellos, los prebióticos son los que han provocado un mayor interés en los últimos años, probablemente debido a la gran incidencia de patologías relacionadas con la función gastrointestinal. El mercado de los alimentos funcionales es muy variado y concretamente el de los prebióticos ha ido creciendo de tal forma que en 2007 se contabilizaron unos 400 productos alimenticios prebióticos<sup>1</sup>. Por otra parte, el mercado global de alimentos y bebidas que contienen prebióticos y probióticos continuó subiendo de forma que las ventas en el año 2008 se incrementaron un 12,5% con respecto a las estimadas en el año 2007<sup>2</sup>.

De entre todos los ingredientes alimentarios, los carbohidratos no digeribles (oligo- y polisacáridos) son los candidatos más importantes para ser considerados como prebióticos. Estos carbohidratos pueden estar presentes de forma natural en alimentos tales como la leche y la miel, así como en hortalizas, verduras, frutas, cereales, legumbres y frutos secos, pudiéndose obtener, de estos últimos, por extracción directa mediante solubilización en agua o soluciones acuosas (p.ej. inulinas, oligosacáridos de achicoria o soja) y por tratamientos químicos (utilizando álcalis o ácidos) o enzimáticos [por ejemplo, la hidrólisis enzimática de inulina para obtener los fructooligosacáridos (FOS)]. La hidrólisis enzimática suele ser la elegida ya que se utilizan condiciones de tratamiento más suaves. En la figura 1 se indican las diferentes fuentes y procedimientos de obtención de los carbohidratos no digeribles considerados prebióticos, así como de los potencialmente prebióticos y de los que están actualmente en estudio<sup>3</sup>.

Los carbohidratos prebióticos pueden también obtenerse mediante síntesis, ya sea química o enzimática

summary of the beneficial effects of prebiotics for health at systemic and intestinal levels is reported. The research effort on prebiotics has been intensive in last decades and has demonstrated that a multidisciplinary approach is necessary in order to claim their health benefits.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):99-118)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8715

Key words: *Prebiotics. Definitions. Analysis. Models. Beneficial effects.*

(reacciones de transglucosilación). En esta última se utilizan diferentes tipos de enzimas, como las  $\beta$ -fructofuranosidasas para obtener FOS, las  $\beta$ -galactosidasas para obtener galactooligosacáridos (GOS), las transglucosidasas para obtener isomaltooligosacáridos (IMOS), etc. Estas enzimas pueden proceder de diferentes microorganismos (hongos, levaduras y bacterias) y, en las reacciones pueden dar lugar a mezclas de oligosacáridos prebióticos de composición y estructura (longitud de cadena, tipos de monosacáridos, grado de ramificación) variadas. Mediante síntesis química pueden obtenerse oligosacáridos prebióticos, como la lactulosa, disacárido que se obtiene por isomerización de la lactosa utilizando catalizadores básicos.

## Definición de prebiótico

Durante los últimos 30 años los prebióticos han suscitado un gran interés entre investigadores de ámbitos tan variados como la nutrición, la biomedicina, la industria de alimentos y la administración. A lo largo de todos estos años, se han propuesto diferentes definiciones, persistiendo todavía hoy el debate de si éstas reflejan todas las propiedades que pueden presentar los prebióticos.

Los primeros estudios sobre prebióticos se remontan a los años 80 cuando investigadores japoneses demostraron, en cultivos *in vitro* utilizando como inóculo heces humanas, que ciertos oligosacáridos no digeribles (fundamentalmente FOS) eran fermentados selectivamente por bifidobacterias y que además tenían la capacidad de estimular su crecimiento. Los resultados de estas investigaciones fueron confirmados por Gibson y Roberfroid<sup>4</sup> investigadores que propusieron la primera definición de prebiótico en la que indicaron que: “*es un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o un limitado número de especies bacterianas en el colon, y que por lo tanto mejora la salud*”. En 2004, Gibson y col.<sup>5</sup>, revisaron este concepto y definieron de nuevo los prebióticos como: “*ingredientes que al ser fermentados selectivamente dan lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal confiriendo beneficios tanto para la salud como para el bienestar del individuo*”.



por enzimas humanas) que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas”.

### Utilización de prebióticos por la microbiota intestinal

El intestino grueso es, en comparación con otras zonas del tracto gastrointestinal, un ecosistema muy complejo que contiene un gran número de microorganismos que se denominan microbiota intestinal. El medio es favorable para el crecimiento de bacterias (beneficiosas y perjudiciales) debido al pH cercano a la neutralidad, a la alta disponibilidad de nutrientes, así como al tránsito lento de los mismos. Dado que la microbiota puede dar lugar a compuestos beneficiosos para la salud, actualmente existe un gran interés en usar dietas que promuevan el crecimiento de estos grupos bacterianos<sup>10</sup>. En la figura 2 pueden apreciarse los principales metabolitos generados a partir de la utilización de los carbohidratos prebióticos por los microorganismos (fermentación sacarolítica), en el intestino grueso<sup>4</sup>. Tras la ingestión de un alimento se origina una serie de gases tales como hidrógeno (H<sub>2</sub>), anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) y metano (CH<sub>4</sub>) que no tienen efectos negativos, con la excepción de producir flatulencia e hinchazón; y ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (acetato, butirato y propionato, principalmente), además de lactato, que son beneficiosos tanto para la mi-

crobiota intestinal (disminuyendo ligeramente el pH), como para las células intestinales (que necesitan estos SCFA para obtener energía). Ciertos componentes de la microbiota producen etanol que es metabolizado rápidamente por otras bacterias intestinales y no ejerce ningún efecto en el hospedador. En la figura 2, también pueden apreciarse los productos originados por la microbiota intestinal, como resultado del metabolismo de las proteínas. Así, se genera sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>), que puede reaccionar fácilmente y tener efectos negativos en el intestino, ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA) tales como isobutirato, isovalerato. Se produce amoníaco (NH<sub>3</sub>), tioles, aminas, y fenoles e indoles que son irritantes para las células intestinales, posiblemente mutagénicos o pueden tener un efecto negativo en el sistema inmune en altas concentraciones. Una excesiva fermentación de las proteínas, especialmente en el colon distal (el más cercano al ano), se ha relacionado con enfermedades tales como el cáncer de colon o enfermedades inflamatorias del intestino. Por todo lo expuesto, es muy importante favorecer la fermentación sacarolítica en el intestino grueso.

### Oligosacáridos como prebióticos

Para que un ingrediente o alimento pueda considerarse como prebiótico debe cumplir una serie de requisitos tales como: i) no ser hidrolizado o absorbido en el tracto gastrointestinal (GIT) superior (esófago, estómago y duodeno) y, por lo tanto, ser resistente a

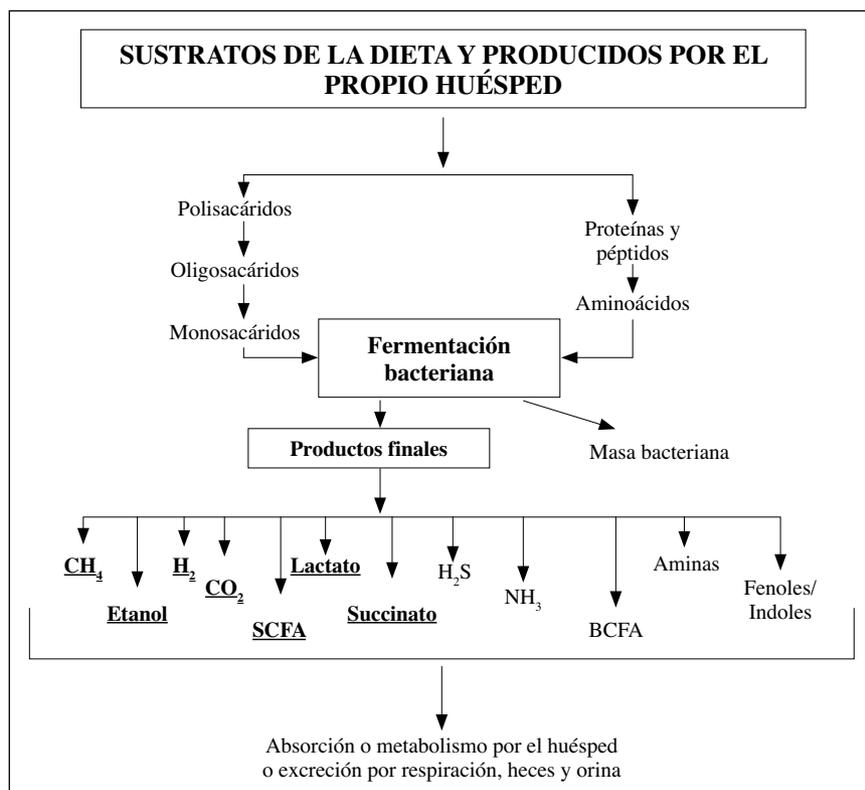


Fig. 2.—Esquema general de la fermentación por la microbiota colónica humana de proteínas y carbohidratos. SCFA = Ácidos Grasos de Cadena Corta BCFA= Ácidos Grasos Ramificados (Gibson y Roberfroid<sup>4</sup>. Reproducción con permiso de American Society for Nutrition). (En negrita y subrayado los metabolitos originados por la utilización de los carbohidratos prebióticos por los microorganismos, en el intestino grueso).

la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas digestivas y no absorberse en el intestino delgado; ii) ser fermentado selectivamente por bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal y; iii) ser capaz de inducir efectos fisiológicos beneficiosos para la salud<sup>4</sup>.

Los carbohidratos no digeribles pueden clasificarse en dos tipos, *colónicos* (fibra alimentaria) y *prebióticos*. Los ingredientes *colónicos* son carbohidratos que llegan al colon, sirven como sustrato para los microorganismos que lo habitan originando energía, sustratos metabólicos y micronutrientes para el hospedador. Dentro de este grupo se incluyen los polisacáridos estructurales de plantas, tales como pectinas, hemicelulosas o celulosa, gomas o algunos oligosacáridos derivados de la soja, glucooligosacáridos, arabinooligosacáridos, etc.

Los *prebióticos* realizan todas las actividades mencionadas anteriormente, pero además, estimulan el crecimiento selectivo de determinadas especies beneficiosas (bifidobacterias, lactobacilos, etc.), de la microbiota intestinal. Aunque en el mercado mundial se están comercializando, como prebióticos, un gran número de carbohidratos, solamente existe evidencia científica de sus propiedades en humanos, en los fructanos tipo inulina y los FOS, los GOS, la lactulosa y los oligosacáridos de leche humana (HMO)<sup>2,11-12</sup>.

#### *Inulina y Fructooligosacáridos (FOS)*

Su fórmula general puede ser  $GF_n$  indicando la presencia de varias unidades de fructosa unidas a una glucosa terminal mediante enlaces glicosídicos  $\beta$ -(2→1) o  $FF_n$  conteniendo unidades de fructosa unidas entre sí, también, por enlaces  $\beta$ -(2→1).

La inulina está formada por oligosacáridos y polisacáridos en los que el grado de polimerización (DP) varía de 2 a 65 unidades con un valor medio de 10 y con una estructura mayoritaria  $GF_n$ . También puede contener una cantidad menor de estructuras  $FF_n$ .

Los FOS son oligosacáridos que se obtienen por hidrólisis de la inulina presente en productos vegetales, o mediante transfructosilación enzimática, a partir de sacarosa, utilizando fructosiltransferasas. Por hidrólisis parcial utilizando endo-inulinasas, se obtiene oligofructosa (FOS) que es una mezcla de fructanos, con una estructura  $GF_n$  o  $FF_n$  que pueden presentar un DP de 2 a 7 con un promedio de 4. Los FOS, obtenidos por síntesis enzimática utilizando sacarosa, son una mezcla de fructanos, con una estructura  $GF_n$  y en este caso los enlaces glicosídicos pueden ser  $\beta$ -(2→1) o del tipo  $\beta$ -(2→6)<sup>13</sup>.

Actualmente está aceptado que la inulina y los FOS no se degradan ni se absorben en el tracto gastrointestinal superior de tal forma que llegan intactos al colon donde son metabolizados por la microbiota intestinal. La configuración  $\beta$  en posición 2→1, del carbono anomérico de la fructosa, les hace resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas<sup>10</sup>. Diferentes ensayos de fermentación *in vitro* utilizando cultivos puros de microorganismos o cultivos de heces

humanas, así como ensayos en humanos, han puesto de manifiesto que la inulina y los FOS favorecen el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos disminuyendo el de bacteroides y clostridios<sup>14</sup>.

El reconocimiento de la inulina y los FOS como ingredientes GRAS (Generally Recognized as Safe) en USA y como FOSHU (Foods of Specified Health Use) en Japón ha permitido que actualmente, la inulina y la oligofructosa se utilicen sin restricciones en un gran número de alimentos como yogures, bebidas, barritas de cereales, galletas, cereales y productos de bollería o formando parte de alimentos simbióticos.

Existe una amplia variedad de productos comerciales, que se utilizan actualmente en la industria de alimentos tal como queda reflejado en la tabla I.

#### *Lactulosa*

El prebiótico más sencillo es la lactulosa, disacárido sintético que se obtiene industrialmente mediante isomerización, en medio básico, de la lactosa presente en el permeado del suero de quesería. También puede obtenerse por síntesis enzimática utilizando lactosa y fructosa y  $\beta$ -galactosidasas de diferentes orígenes<sup>17</sup>.

La lactulosa es resistente a las enzimas digestivas de tal forma que no es hidrolizada, a diferencia de la lactosa, alcanzando el colon inalterada donde es metabolizada selectivamente por las bifidobacterias y lactobacilos. Esta propiedad bifidogénica, se conoce desde hace muchos años, siendo Petuely<sup>18</sup> el primero en usar este carbohidrato como ingrediente en la elaboración de leches infantiles, para favorecer el crecimiento de las bifidobacterias en lactantes. En los años siguientes, diversos autores desarrollaron nuevos productos basándose en el mismo principio y en 1961 Adachi y Patton<sup>19</sup> recapitulaban 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. En diferentes ensayos de fermentación *in vitro* y en ensayos en humanos se demostró la baja absorción de la lactulosa en el intestino delgado y su metabolismo en el colon favoreciendo el crecimiento de la microbiota beneficiosa y produciendo una significativa disminución de bacteroides clostridios, estreptococos y enterobacterias<sup>10</sup>. Las propiedades prebióticas de la lactulosa se han puesto de manifiesto cuando se ha añadido a alimentos como yogures, fórmulas infantiles, leche de soja, etc<sup>20-22</sup>. Sin embargo, para utilizar la lactulosa como prebiótico hay que establecer la dosis adecuada ya que una cantidad excesiva puede producir flatulencias y diarrea.

Recientemente se han descrito nuevos oligosacáridos derivados de la lactulosa (OsLu)<sup>23-24</sup> que al presentar mayor peso molecular que este disacárido pueden llegar intactos a zonas más distales del colon (donde es mayor la incidencia de determinadas patologías). Diferentes ensayos de fermentación *in vitro* utilizando cultivos puros y heces humanas, así como ensayos *in vivo* utilizan-

**Tabla I**  
*Inulina y FOS comerciales y empresas elaboradoras para la industria de alimentos*

<i>Prebiótico</i>	<i>Obtención</i>	<i>Nombre comercial</i>	<i>Empresas elaboradoras</i>	<i>Referencias</i>
Inulina	Extracción a partir de achicoria	Orafti® Inulin Frutafit Fibruline	Beneo Orafti (Bélgica) Sensus (Holanda) Cosucra (Bélgica)	WGO <sup>9</sup> Rodríguez Colinas <sup>15</sup>
FOS (Fructo-oligosacáridos de cadena corta; scFOS)	Síntesis enzimática a partir de sacarosa	Actilight	Beghin-Meiji (Japón) Tereos (Francia)	Gibson y col. <sup>10</sup> Rodríguez Colinas <sup>15</sup>
FOS (Fructo-oligosacáridos de cadena corta; scFOS)	Extracción de caña de azúcar o remolacha	Nutraflora	GTC Nutrition Company, Westminster, CO	Birkett y Francis <sup>16</sup> WGO <sup>9</sup>
FOS (Oligofructosa)	Hidrólisis parcial de inulina	Orafti® Oligofructose Frutalose Fibrulose	Beneo Orafti Sensus Cosucra	Gibson y col. <sup>10</sup> Rodríguez Colinas <sup>15</sup>
FOS (Oligofructosa)		Oligo-sugar (jarabe/polvo)	Cheil Foods and Chemicals (Corea)	Gibson y col. <sup>10</sup>
		Meiologo (jarabe/polvo)	Meiji Seika Kaisha, (Japón)	Gibson y col. <sup>10</sup>

do animales, han puesto de manifiesto las propiedades bifidogénicas que presentan estos oligosacáridos<sup>25-28</sup>.

Además, por todas las propiedades que presenta, la lactulosa se utiliza no solo en nutrición, como prebiótico, sino también como medicamento para el tratamiento del estreñimiento crónico o de la encefalopatía portal hepática<sup>22</sup>.

La lactulosa también está considerada en Japón como un ingrediente FOSHU<sup>21</sup>. Por otra parte la EFSA (European Food Safety Agency)<sup>29</sup> ha reconocido que reduce el tiempo de tránsito intestinal y recomienda una ingesta de al menos 10 g, en una sola toma, para obtener dicho efecto. Existe una gran variedad de productos comerciales que contienen lactulosa<sup>30</sup>, que se utilizan actualmente en la industria farmacéutica y alimentaria tal como queda reflejado en la tabla II.

#### *Galactooligosacáridos (GOS)*

Los GOS son compuestos obtenidos industrialmente a partir de la lactosa del permeado de suero de quesería, mediante transglucosilación catalizada por  $\beta$ -galactosidasas (lactasas). Estas enzimas, en determinadas condiciones, son capaces de catalizar tanto la hidrólisis de la lactosa como la formación de un enlace  $\beta$ -glicosídico entre la galactosa liberada en la hidrólisis y la lactosa u otros carbohidratos presentes en el medio de reacción. Los GOS también se encuentran de forma natural en la leche humana y animal.

Estos oligosacáridos contienen de 2-10 moléculas de galactosa unidas a una glucosa terminal y se diferencian entre sí en la longitud de la cadena y en el tipo de enlace<sup>31</sup>. En los primeros trabajos de elaboración y evaluación de los GOS se usaba la terminología de

TOS (oligosacáridos obtenidos por transgalactosilación). La composición de la mezcla de GOS resultante depende del tipo de enzima utilizado, de la concentración y naturaleza del sustrato y de las condiciones de reacción (pH, temperatura y tiempo)<sup>32-33</sup>. Estos azúcares presentan un reconocido carácter prebiótico, ya que estimulan el crecimiento de bacterias lácticas y bifidobacterias en el intestino humano<sup>6</sup>.

Los GOS también han sido reconocidos, en todos los países de la Unión Europea, como ingredientes ali-

**Tabla II**  
*Lactulosa comercial y empresas elaboradoras para la industria farmacéutica y de alimentos (Playne y Crittenden<sup>30</sup>)*

<i>Nombre comercial</i>	<i>Empresas elaboradoras</i>
Duphalac (jarabe) Bifiteral (jarabe) Chromulac (jarabe) Cephulac (jarabe) Lactulose (en polvo)	Solvay Pharmaceuticals GmbH, Hannover Germany
MLS-50 (jarabe) MLP-40 (en polvo) MLC-A (en polvo) MLC-H (en polvo) Milei lactulose (jarabe)	Morinaga Milk Industry Co. Higashihara, Kanagawa, Japón
Lactulose MIP (jarabe)	Chephasar Chem-Pharm Ingbert, Germany
Danilax (jarabe)	Danipharm A/S Denmark
Laevolac (jarabe)	Fresenius Pharma Austria GMBH, Austria
Regulact	Laboratorios Server, México

mentarios y no como aditivos debido a su presencia de forma natural en la leche materna y están considerados en USA, por la FDA, como GRAS y en Japón como FOSHU<sup>34</sup>. Se utilizan en la elaboración de leches maternizadas (junto con FOS) con objeto de imitar los efectos de la leche humana sobre la microbiota de los lactantes.

Debido a las posibles propiedades beneficiosas para la salud asociadas al consumo de estos prebióticos, la demanda de alimentos que los contienen se ha incrementado enormemente, particularmente en Japón y Europa<sup>35</sup>. Por ello, se han realizado numerosos estudios encaminados a optimizar su producción especialmente mediante transgalactosilación vía enzimática, ya que la síntesis química es muy tediosa<sup>36-38</sup>. En la tabla III puede observarse la gran variedad existente, en cuanto a productos comerciales se refiere, de los GOS que se usan actualmente en la industria de alimentos.

### Oligosacáridos de leche humana (HMO)

La leche humana contiene hasta un 10% de carbohidratos de los cuales la lactosa es el mayoritario (55-70 g/L) mientras que los HMO se encuentran en concentraciones comprendidas entre 12-14 g/L, siendo el calostro el que posee los mayores niveles de oligosacáridos (22-24 g/L). La fracción que constituye los HMO es muy compleja ya que está formada por al menos 1000 componentes, estando la gran mayoría de ellos, en cantidades muy bajas. A estos oligosacáridos se les ha considerado como los primeros prebióticos, ya que se ha comprobado que son los responsables del alto número de bifidobacterias presentes en heces de lactantes y también se les conoce como “factor bifidogénico”. Hasta el momento se han identificado más de 200 HMO, de los cuales solo 80 han podido ser totalmente caracterizados<sup>43-45</sup>.

**Tabla III**  
GOS comerciales y empresas elaboradoras para la industria de alimentos

Nombre comercial del prebiótico	Empresas elaboradoras	Procedencia de $\beta$ -galactosidasas	Referencias
Bimuno (en jarabe y en polvo)	Clasado Ltd Milton Keynes, UK	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Lamsal <sup>2</sup> Torres y col. <sup>39</sup> Sangwan y col. <sup>40</sup>
Cup-oligo H-70 (jarabe) Cup-oligo P (en polvo)	Nissin Sugar Manufacturing Compny Tokio Japón	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Lamsal <sup>2</sup> Playne y Crittenden <sup>30</sup> Torres y col. <sup>39</sup> Sangwan y col. <sup>40</sup>
Dairygold GOS	Dairygold Food Ingredients (Irlanda)		Sangwan y col. <sup>40</sup>
Garakutoorigo (jarabe) (origomeito 55 N)	San-ei Suchochemical Co., Ltd		Playne y Crittenden <sup>30</sup>
Oligomate 50		<i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Streptococcus thermophiles</i>	Ito y col. <sup>41</sup>
Oligomate 55 (jarabe) Oligomate 55 P (polvo) TOS-100	Yakult Honsha(Tokyo, Japón)	<i>Sporobolomyces singularis</i> y <i>Kluyveromyces lactis</i>	Lamsal <sup>2</sup> Torres y col. <sup>39</sup> Sangwan y col. <sup>40</sup> Otieno <sup>42</sup>
Promovita GOS	Fayrefield Food, Crece, UK First milk ingredients, Paisley UK	<i>Aspergillus oryzae</i>	Lamsal <sup>2</sup> Torres y col. <sup>39</sup> Sangwan y col. <sup>40</sup>
Purimune	GTC Nutrition (United States)	<i>Bacillus circulans</i>	Lamsal <sup>2</sup> Torres y col. <sup>39</sup> Sangwan y col. <sup>40</sup>
P7L	Snow Brabdt Milk Products (Japón)		Sangwan y col. <sup>40</sup>
Transgalactosylated: - oligosacáridos - disacáridos		<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Torres y col. <sup>39</sup>
Vivinal-GOS; TOS syrup	Borculo Domo Ingredients (Friesland Foods Domo) (Zwolle, The Netherlands)	<i>Bacillus circulans</i>	Lamsal <sup>2</sup> Playne y Crittenden <sup>30</sup> Torres y col. <sup>39</sup> Sangwan y col. <sup>40</sup> Otieno <sup>42</sup>

Los HMO están constituidos, principalmente, por una molécula de lactosa en su extremo reductor a la que, mediante la acción de diferentes glicosil-transferasas, se unen distintos carbohidratos. Al igual que los GOS, los HMO neutros están compuestos de glucosa y galactosa pero también contienen varias unidades de *N*-acetil-glucosamina y fucosa. Los HMO ácidos contienen, además de los carbohidratos mencionados anteriormente, unidades de ácido *N*-acetil-neuramínico (también conocido como ácido siálico)<sup>45-46</sup>. La presencia del ácido siálico y de la fucosa en posición terminal convierte a estos oligosacáridos en no digeribles por las enzimas digestivas y, por tanto, llegan intactos al colon donde son metabolizados por la microbiota intestinal. Además, los HMO que contienen fucosa y ácido siálico comparten estructuras con glicanos (mucina) del epitelio intestinal de lactantes. Estos glicanos son receptores de patógenos por lo que, la presencia de estos oligosacáridos en la leche materna supone un mecanismo de defensa<sup>47</sup>. Aunque los beneficios que aporta el consumo de dichos oligosacáridos son considerables, su utilización en la elaboración de alimentos a gran escala es prácticamente imposible dado su escaso contenido en las leches de origen animal (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.

### Carbohidratos prebióticos emergentes

En la actualidad hay un creciente interés en la búsqueda y comercialización de nuevos oligosacáridos

prebióticos con propiedades funcionales mejoradas. Algunos de ellos están disponibles comercialmente (Tabla IV) y ya se consideran, en cierta medida, prebióticos a pesar de no haber suficientes evidencias científicas, mientras que otros están todavía en una fase inicial de estudio.

#### *Xilooligosacáridos (XOS)*

Los XOS son oligosacáridos formados por cadenas de D-xilosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1→4) que se obtienen por hidrólisis de xilano presente en la hemicelulosa. En algunos casos presentan sustituyentes como ácidos urónicos, grupos acetilo y residuos de arabinosa. En este último caso, reciben el nombre de arabinoxilooligosacáridos (AXOS). Los estudios *in vitro*<sup>48-49</sup> e *in vivo* tanto en animales<sup>50</sup> como de intervención en humanos<sup>51-53</sup> han puesto de manifiesto que los XOS tienen efecto bifidogénico. Además, se les atribuyen otras propiedades beneficiosas tales como disminuir los niveles de glucosa, colesterol total y LDL en pacientes con diabetes mellitus tipo 2<sup>54</sup>; actividad antimicrobiana<sup>55</sup> o actividad inmunomoduladora<sup>56</sup>.

#### *Lactosacarosa (LS)*

La LS es un trisacárido no reductor que se usa como edulcorante artificial. Es resistente a la digestión en el estómago e intestino delgado y, en estudios realizados *in vivo* con animales (pollos, perros y gatos), se ha demostrado que su ingesta aumenta el número de bifi-

<b>Tabla IV</b>		
<i>Otros productos prebióticos comerciales y empresas elaboradoras para la industria de alimentos</i>		
<i>Prebiótico</i>	<i>Nombre comercial</i>	<i>Empresas Elaboradoras</i>
Almidón resistente	Hi-Maize resistant starch	National Starch*
$\alpha$ -Glucooligosacáridos	BioEcolians	Solabia
Gentio-oligosacáridos	Gentose 45 (L), 80 (L) y 80 (P)	Nihon Shokuhin Co., (Japón)
Isomaltooligosacáridos	Isomalto: 500 (L), 900 (L) y 900 (P)	Showa Sangyo Co. (Japón)
“	Panorup (L)	Hayashibara Shoji Inc. (Japón)
“	Panorich (L); Biotose 50 (L)	Nihon Shokuhin Co., (Japón)
Lactosacarosa	Nyuka-Origo LS 40, 55 (L) Nyuka-Origo LS 55 (P)  Pet Oligo L55 (L y P)  Newka-Oligo LS : 35 y 55 (L) Newka-Oligo LS 55 (P)	Ensuiko Sugar Refining Co.,
Oligosacáridos de soja	Soya-oligo (L)	The Calpis Food Industry Co., (Japón)
Xilooligosacáridos	Xylo-oligo 20, 35, 95 (P) Xylo-oligo 70 (L)	Suntory Ltd, Japón

\*Tomado de WGO 9. El resto de información tomado de Gibson y col.<sup>10</sup>  
L: en jarabe; P: en polvo.

dobacterias (y en algunos casos lactobacilos) y hace descender algunos clostridios incluido el *Clostridium perfringens* y estafilococos<sup>57-58</sup>. En los escasos estudios clínicos publicados<sup>59-60</sup>, también se ha observado el efecto bifidogénico.

Aunque se usa en Japón para elaborar alimentos funcionales y los resultados sobre su selectividad pueden ser prometedores, todavía no hay suficiente evidencia científica (hay pocos estudios y con poblaciones muy reducidas) como para ser considerado un prebiótico<sup>61</sup>.

#### *Isomaltooligosacáridos (IMOS)*

Los IMOS se obtienen a partir del almidón en un proceso que consta de dos etapas. En una primera, las enzimas  $\alpha$ -amilasa y pululanasa generan  $\alpha$ -(1→4)-maltooligosacáridos a partir de almidón y, en una segunda, una transglucosidasa transforma estos oligómeros en  $\alpha$ -(1→6)-isomaltooligosacáridos, obteniéndose como producto una mezcla heterogénea de  $\alpha$ -(1→4) y  $\alpha$ -(1→6)-oligosacáridos<sup>5</sup>.

Estos oligosacáridos se digieren lentamente, por lo que pueden alcanzar el colon donde son parcialmente fermentados<sup>62</sup>. Mediante la realización de estudios *in vitro*<sup>63-66</sup> e *in vivo*, con animales<sup>67-70</sup>, y humanos<sup>71-72</sup> se han puesto de manifiesto sus propiedades bifidogénicas.

Por otra parte, también se les atribuyen otras propiedades tales como disminuir los niveles de colesterol total y triglicéridos en pacientes tratados con hemodiálisis<sup>73</sup> y la estimulación del sistema inmune en ratones<sup>74</sup>.

#### *Oligosacáridos de soja*

Las semillas de soja son una fuente importante de oligosacáridos como rafinosa y estaquiosa. Estos oligosacáridos se denominan también  $\alpha$ -galactósidos,  $\alpha$ -galactooligosacáridos u oligosacáridos de la familia de la rafinosa. Estudios *in vitro* han demostrado que las enzimas digestivas humanas no pueden hidrolizar este tipo de oligosacáridos, por carecer de  $\alpha$ -galactosidasa, por lo que pueden alcanzar el colon intactos donde son fermentados por las bifidobacterias<sup>75-76</sup>. Los trabajos realizados con humanos indican que estos oligosacáridos presentan actividad prebiótica<sup>77-78</sup> y, en un estudio *in vivo* llevado a cabo con animales, Chen y col.<sup>79</sup> sugirieron que estos oligosacáridos pueden reducir significativamente los niveles de glucosa y lípidos en sangre y el estrés oxidativo.

#### *Glucooligosacáridos*

Los glucooligosacáridos son carbohidratos lineales de unidades de glucosa unidas con enlaces  $\alpha$ -(1→6) que presentan además ramificaciones en  $\alpha$ -(1→2) y  $\alpha$ -(1→3). Se pueden obtener a partir de sacarosa en presencia de maltosa por síntesis enzimática (usando

dextranosacarosas) o por síntesis biológica mediante el microorganismo *Leuconostoc mesenteroides*. En ensayos con humanos y con animales, se ha puesto de manifiesto que estos enlaces glucosídicos son resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas<sup>80</sup>. Además, en estudios de fermentación *in vitro*, se ha demostrado que presentan propiedades bifidogénicas, ya que favorecen el crecimiento de bifidobacterias frente al de bacterias perjudiciales<sup>5,81-84</sup>.

### **Candidatos a prebióticos en fase de estudio**

#### *Pectooligosacáridos (POS)*

Los POS se obtienen por despolimerización parcial de la pectina, heteropolisacárido ramificado de elevada complejidad estructural. Dada su estructura y composición (con distintos tipos de enlaces  $\alpha$  y  $\beta$ , y hasta 14 monosacáridos diferentes), a partir de la pectina se pueden obtener distintos tipos de productos, incluyendo oligogalacturónidos (OGalA), GOS, arabinooligosacáridos (AraOS), ramnogalacturonoligosacáridos (RhaGalAOS) y arabinogalactooligosacáridos (AraGalOS). Además, pueden estar esterificados con grupos metilo y/o acetilo e incluso con ácido ferúlico.

Hasta el momento son muy escasos los estudios realizados sobre las propiedades prebióticas de estos oligosacáridos, realizándose, en la mayoría de los trabajos, ensayos *in vitro* utilizando mezclas complejas de oligómeros, por lo que no existen evidencias suficientes sobre todo su potencial. Sin embargo, se ha podido comprobar que los POS tienen propiedades prebióticas y que éstas dependen de sus características físico-químicas<sup>85-86</sup>. Estudios *in vitro*, usando tanto cepas puras representativas de los principales géneros de la microbiota intestinal<sup>87-88</sup> como cultivos con heces<sup>89</sup>, permitieron comprobar que los oligómeros neutros (AraOS y GOS) presentan un fuerte efecto bifidogénico (incluso similar a la inulina). Actualmente, no hay publicados resultados de ensayos con animales y, en los pocos estudios de intervención humana que se han realizado, se utilizaron mezclas de POS ácidos, GOS y FOS. Se ha podido comprobar que la adición de POS a fórmulas infantiles potencia el efecto bifidogénico de los dos últimos prebióticos mencionados<sup>90</sup>; produce un aumento del número de bacterias totales y de bifidobacterias, en niños pretérmino<sup>91</sup>; y un incremento de las bifidobacterias y un descenso de patógenos pertenecientes al grupo *Clostridium lituseburense/Clostridium histolyticum*<sup>92</sup>. Además de su potencial prebiótico, se ha publicado que algunos tipos de POS tienen propiedades inmunológicas, anti-adherentes e incluso anticancerígenas.

#### *Polidextrosa (PDX)*

La PDX es un polímero de glucosa altamente ramificado con un DP medio de 12 y un amplio espectro de

enlaces y se emplea como ingrediente alimentario, considerándose seguro y bien tolerado. Se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* en los que se ha demostrado que la PDX es poco digerible y poco absorbible en el tracto gastrointestinal humano<sup>93-95</sup>. Existe también un número importante de estudios de intervención en humanos, aunque son muy pocos los que evalúan el efecto del consumo de PDX sobre microbiota. En general, parece claro que la adición de mezclas de PDX/GOS a fórmulas infantiles mejora la consistencia de las heces y tiene un efecto bifidogénico similar al de la leche materna<sup>96-98</sup>, pero no está suficientemente demostrado que el efecto bifidogénico se deba a la PDX y no a los GOS, ya que, por ejemplo, también se ha observado un pobre crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en PDX en comparación con el producido por GOS o lactulosa. Será necesario llevar a cabo más estudios orientados a valorar los efectos en la microbiota intestinal. La EFSA<sup>99</sup> rechazó las alegaciones relativas a la mejora de la salud intestinal y al efecto prebiótico/bifidogénico de la PDX por no encontrar lo suficientemente consistentes las relaciones causa-efecto entre el consumo de PDX y los beneficios producidos.

#### *Exopolisacáridos bacterianos (EPS)*

Los polímeros de carbohidratos de origen bacteriano, denominados exopolisacáridos por su acumulación en la superficie celular o en el medio de cultivo, son sustratos resistentes a la digestión gástrica y fermentables por la microbiota intestinal, por lo que podrían ser buenos candidatos prebióticos. En el caso de bacterias Gram-positivas, se han descrito dos tipos de polímeros según su composición química y modo de síntesis: homopolisacáridos (HoPS):  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucanos y  $\beta$ -fructanos) y heteropolisacáridos (HePS). Entre los HoPS, existe una clasificación secundaria en función del tipo y posición del enlace entre monosacáridos. A modo de ejemplo en el contexto de prebióticos, el dextrano es un  $\alpha$ -glucano (D-glucosa (1 $\rightarrow$ 6) producido por *Leuconostoc mesenteroides*), y entre los  $\beta$ -fructanos están el tipo inulina [D-fructosa (2 $\rightarrow$ 1), de *Lactobacillus reuteri*] o tipo levano [D-fructosa (2 $\rightarrow$ 6), de *Lactobacillus sanfranciscensis*] que pueden asemejarse en su composición a FOS, aunque de mayor tamaño.

A excepción de algunos HoPS, la aplicación de estos EPS, como ingredientes prebióticos en alimentación, no es viable actualmente debido a la limitación que supone su escasa producción, pero son polímeros con un alto potencial debido a otras propiedades funcionales adicionales, por ejemplo, como moduladores de la respuesta inmune<sup>100</sup>.

#### *Polisacáridos de macroalgas*

Dentro de los nuevos carbohidratos de interés por su potencial efecto prebiótico *in vitro* e *in vivo* se encuen-

tran los polisacáridos de macroalgas marinas<sup>101-103</sup>. Su estructura química es muy variada. Las algas verdes (*Chlorophyta*) contienen heteropolisacáridos sulfatados denominados ulvanos<sup>104</sup>. Los principales polisacáridos de las algas pardas (*Heterokontophyta*, *Pheophyceae*) son laminarina, alginatos y fucoidanos/fucanos. Las algas rojas (*Rhodophyta*) poseen galactanos-sulfatados como agar o carragenanos, dependiendo de la especie.

Desde el punto de vista nutricional todos ellos son polisacáridos no digeribles, resistentes a las enzimas digestivas, y forman parte del complejo fibra, pudiendo ser fermentados por la microbiota colónica<sup>103</sup>. El potencial prebiótico de los polisacáridos de algas se ha estudiado *in vivo* en animales de laboratorio alimentados con algas enteras<sup>105-106</sup> o con polisacáridos purificados<sup>102</sup>.

Tradicionalmente, las algas y sus polisacáridos se consumen en Oriente como parte de la dieta, mientras que en occidente se usan principalmente como ingredientes alimentarios por su capacidad espesante y gelificante. Para poder hacer alegaciones en salud hacen falta más estudios en humanos.

#### **Análisis y caracterización de carbohidratos prebióticos**

En general, cuando se lleva a cabo la síntesis enzimática o la extracción de fuentes naturales de los prebióticos, se obtienen mezclas complejas que pueden presentar carbohidratos con diferentes grados de polimerización e incluso isómeros que dificultan enormemente la caracterización de los mismos.

La estructura de los carbohidratos prebióticos, es decir la composición en monosacáridos, el tipo de enlace glicosídico y el peso molecular, ejerce una gran influencia en las propiedades que estos pueden presentar. En la hoja de ruta que establece la FAO<sup>7</sup> para evaluar y comprobar las propiedades de los prebióticos, para su utilización en alimentos, indica que deben de caracterizarse adecuadamente, además de considerar otros factores tales como la procedencia (origen y fuente de obtención), la pureza y la composición química del prebiótico. Por ello, es necesario disponer de técnicas analíticas adecuadas que permitan aislar, identificar y caracterizar los carbohidratos prebióticos facilitando de esta forma el estudio que permita relacionar la influencia de la estructura en la función de los mismos.

En primer lugar, es importante disponer de metodologías para realizar la preparación de la muestra (purificación, fraccionamiento, etc.) así como optimizarlas. En ocasiones, se emplean diversas técnicas de fraccionamiento, tales como cromatografía de exclusión molecular (SEC) o de intercambio iónico, tratamientos con carbón activo o con microorganismos (p.ej. levaduras) para el fraccionamiento de carbohidratos previo a su análisis<sup>107</sup>, facilitando así su caracterización.

Actualmente, para la determinación de azúcares totales en los oligosacáridos, se utilizan métodos enzimáti-

cos o colorimétricos como el del fenol-sulfúrico, antro-na-sulfúrico, dinitro-salicílico, etc.<sup>108</sup>. Sin embargo, las técnicas cromatográficas (incluidas la cromatografía de gases y de líquidos), electroforéticas, espectrométricas o espectroscópicas son las más empleadas para la caracterización de carbohidratos prebióticos, tanto a nivel cualitativo (determinación de su estructura) como cuantitativo (determinación de su concentración).

La cromatografía de gases (GC) es una técnica con un alto poder de resolución, sensibilidad y selectividad y además, junto con el acoplamiento a espectrómetros de masas, hace que sea una técnica muy versátil para la caracterización de carbohidratos prebióticos<sup>109</sup>. La cromatografía de gases se emplea principalmente para el análisis de carbohidratos de bajo peso molecular (generalmente hasta tetrasacáridos) mediante columnas basadas en metilpolisiloxano<sup>110-111</sup>. Sin embargo, el empleo de columnas con grupos carborano presentes en la estructura principal del polisiloxano, resistentes a temperaturas elevadas, permite extender su aplicación a oligosacáridos con DP de hasta 8. Esta técnica también se emplea para determinar la composición monomérica de oligo- y polisacáridos mediante procesos de hidrólisis, tanto ácida como enzimática, seguidos por la derivatización de los monosacáridos liberados<sup>112</sup>. Es necesario también destacar el uso de la cromatografía de gases para el análisis estructural de carbohidratos prebióticos de alto peso molecular<sup>107</sup>.

La cromatografía de líquidos (HPLC) es la técnica más utilizada para el análisis de oligosacáridos prebióticos por su alta versatilidad y múltiples modos de operación. Aunque la derivatización de los carbohidratos no es imprescindible para su análisis por HPLC, puede realizarse tanto antes (pre-columna) como después de la separación (post-columna) para facilitar su detección (inclusión de grupos cromóforos o fluoróforos que permiten la detección mediante ultravioleta o fluorescencia) e incluso la separación (aumento de la retención y la resolución). Se han utilizado muchos modos de operación para el análisis de carbohidratos prebióticos, sin embargo los más comunes son la cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia (HPAEC)<sup>23,113-114</sup>, la cromatografía de intercambio iónico-exclusión molecular<sup>115</sup>, y la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)<sup>109,116</sup>. Los detectores más usados para el análisis de oligosacáridos prebióticos son el de índice de refracción (RID), el evaporativo de dispersión de luz (ELSD) y el detector amperométrico de pulsos (PAD), este último empleado para HPAEC. Los acoplamientos de HPLC con espectrometría de masas permiten además determinar el grado de polimerización de los oligosacáridos y en algunos casos obtener información sobre sus enlaces glicosídicos<sup>109</sup>.

La espectrometría de masas (MS) se puede emplear mediante su acoplamiento a GC o HPLC o como técnica independiente para la caracterización de prebióticos. La fuente de ionización más común para acoplamientos con GC es el impacto electrónico (EI) que proporciona fragmentos  $m/z$  apropiados para la identificación

de las estructuras, mientras que la ionización por electrospray (ESI) o la ionización química a presión atmosférica (APCI) son los más empleados en acoplamientos con HPLC, dando lugar únicamente a la formación del ion cuasi-molecular. En estos últimos casos, los analizadores de cuadrupolo (Q) únicamente proporcionan información del grado de polimerización de los oligosacáridos. Sin embargo, el empleo de analizadores híbridos o en tándem (QTOF, QqQ, etc.) da lugar a la obtención de datos de MS<sup>2</sup> y facilita la caracterización estructural de disacáridos<sup>117</sup>. Los analizadores de trampa iónica permiten además la obtención de datos de MS<sup>n</sup> de oligosacáridos de mayor DP<sup>109</sup>. La disociación inducida por colisión (CID) es el método de fragmentación más común para la caracterización de prebióticos<sup>118-119</sup>, aunque otros métodos como la disociación por transferencia de electrones (ETD), la disociación por captura de electrones (ECD) y la disociación por infrarrojo multifotón (IRMPD) pueden también aplicarse. La desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) con el analizador de tiempo de vuelo (TOF) permite la determinación del grado de polimerización de oligosacáridos de alto peso molecular<sup>120</sup>.

La resonancia magnética nuclear (NMR) es otra de las técnicas más empleadas para la caracterización estructural de carbohidratos prebióticos. Existen varios tipos de NMR basadas en relajación de spin nuclear, constantes de acoplamiento escalares o dipolares y simulaciones de dinámica molecular que permiten la caracterización fiable y eficaz de carbohidratos prebióticos<sup>121</sup>. Sin embargo, esta técnica es especialmente útil para la caracterización de carbohidratos puros, aunque ocasionalmente se ha aplicado a mezclas de oligosacáridos<sup>107</sup>. Por tanto, resulta altamente recomendable un proceso previo de fraccionamiento de dichos carbohidratos, que puede ser llevado a cabo mediante procedimientos tales como cromatografía de exclusión molecular, empleo de carbón activo, técnicas de membrana, etc.<sup>122</sup> (Hernández y col., 2009).

## Evaluación del efecto prebiótico

Se ha desarrollado un gran número de modelos para evaluar la fermentación (o biodegradabilidad) intestinal de los prebióticos previamente caracterizados (origen, fuente, pureza composición química y estructura). En la figura 3 se reflejan las diferentes fases a seguir para evaluar y validar el carácter prebiótico de un compuesto. En primer lugar, se realizan estudios *in vitro*, para el escrutinio y selección de sustratos con potencial prebiótico, que posteriormente serán validados en modelos animales. Para finalizar, el sustrato seleccionado con los modelos anteriores, sería candidato para llevar a cabo los estudios de intervención en humanos que permitan evaluar su eficacia en el sitio de acción y demostrar científicamente su capacidad prebiótica. La FAO<sup>7</sup> en su hoja de ruta para la evaluación de las propiedades de prebióticos también indica que debe de

realizarse una caracterización funcional del prebiótico mediante la utilización de diferentes modelos.

#### Resistencia de los prebióticos a la digestión gastro-intestinal

Se han desarrollado una serie de modelos para estudiar la resistencia de los candidatos a prebióticos a la digestión y absorción, al menos parcial, en el tracto gastrointestinal superior<sup>123</sup>. Los modelos *in vitro* siguen un diagrama común que consiste en simular las condiciones de acidez (pH < 2,0) y alto contenido en enzimas gástricas (incluyendo la saliva) y pancreáticas, empleando condiciones de temperatura (37 °C), motilidad y tiempo de tránsito que mimeticen las condiciones fisiológicas humanas. En los estudios *in vivo* los candidatos a prebióticos son administrados por vía oral a animales (generalmente roedores) libres de microorganismos, o a animales que han sido previamente tratados con un antibiótico para suprimir la microbiota intestinal. Se usan marcadores indigeribles para valorar, por un lado, la digestibilidad ileal de los oligosacáridos (para cuantificar lo que llega sin digerir al comienzo del intestino grueso) y, por otro lado, para evaluar su fermentabilidad (en el intestino grueso) al cuantificar la presencia/ausencia de los oligosacáridos en las muestras fecales.

#### Fermentación de prebióticos en el colon

El estudio de la capacidad de prebióticos para modular la composición de la microbiota intestinal y/o la producción de compuestos que pudieran ser beneficio-

sos para la salud, como los SCFA, requiere el estudio de muestras de origen fecal y de tejidos o contenidos intestinales así como el manejo de una serie de técnicas analíticas que van desde las clásicas más simples a las nuevas “ómicas”.

Tradicionalmente se han empleado técnicas microbiológicas dependientes de cultivo (medios selectivos y/o diferenciales) para el recuento de bacterias cultivables de la microbiota como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y más recientemente *Bacteroides* y *Clostridium*. Desde hace más de una década el empleo de técnicas moleculares, generalmente basadas en la secuencia del gen que codifica el 16S rRNA, ha permitido ampliar el conocimiento relativo a la composición de la microbiota intestinal cultivable y no cultivable<sup>124</sup>. Los métodos más utilizados para cuantificar (enumerar) distintos grupos y especies bacterianas son la PCR cuantitativa (qPCR) y FISH (hibridación fluorescente *in situ*), lo que requiere marcadores genéticos específicos (primers y sondas fluorescentes, respectivamente). En el caso de FISH, el recuento celular se puede realizar por microscopía de fluorescencia o mediante citometría de flujo.

El análisis funcional del metaboloma proporciona información relevante sobre la formación de metabolitos derivados de la actividad de la microbiota intestinal. Este análisis puede ser específico (centrado en un grupo de compuestos) o no selectivo, pudiéndose determinar y cuantificar un número elevado de compuestos de diversa naturaleza (SCFA, ácidos orgánicos, carbohidratos, péptidos, aminoácidos, vitaminas, etc.)<sup>125</sup>. Por otro lado, si hay disponibles sustratos prebióticos marcados (por ejemplo con <sup>13</sup>C) se pueden emplear en cultivos inoculados con homogenei-

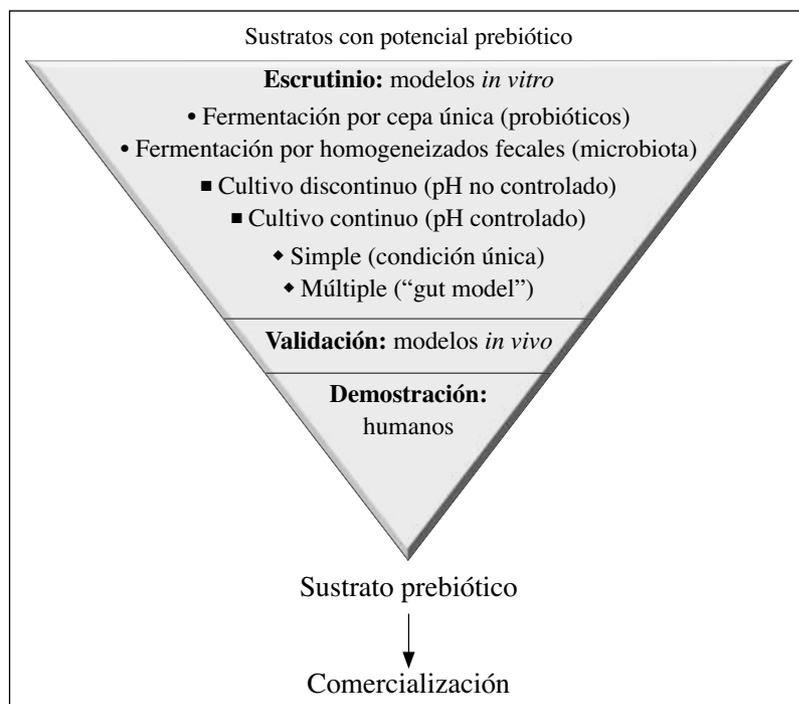


Fig. 3.—Hoja de ruta para la evaluación del potencial prebiótico de nuevos sustratos.

zados fecales para determinar las especies bacterianas que los están utilizando y cuantificar la generación de SCFA marcados. Además, este sistema se puede emplear en animales de experimentación y, dado que parte de los SCFA se absorben en el intestino y pasan a sangre, se podrían cuantificar los niveles de marcaje radioactivo circulantes.

#### Modelos de fermentación *in vitro*

Para estudiar la biodegradación de compuestos con potencial prebiótico es muy útil el empleo de sistemas de fermentación *in vitro* que pueden alcanzar diversos grados de complejidad. El modelo más simple, y ampliamente utilizado en el contexto de los primeros estudios con prebióticos, consiste en evaluar el comportamiento, como inóculo, de cultivos simples definidos (de cepa única) generalmente pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en presencia del sustrato. Actualmente, se tiende a analizar la evolución de la microbiota intestinal en su conjunto empleando, principalmente, homogenizados de origen fecal de individuos donantes sanos que han dado su consentimiento informado para suministrar la muestra. Estos homogenizados fecales se utilizan para inocular un medio de cultivo basal que, después de un proceso de estabilización en condiciones anaeróbicas a 37 °C, es suplementado con el prebiótico a estudiar para seguir, en tiempos definidos, la dinámica (diversidad y/o número) de las poblaciones microbianas así como su actividad metabólica (perfil de SCFA) por las técnicas descritas anteriormente. La tecnología empleada para llevar a cabo las fermentaciones *in vitro* implica la utilización de biorreactores, generalmente vasijas de volumen pequeño (< 250 mL), para realizar cultivos en discontinuo (*batch*) a pH no controlado, o para cultivos en continuo a pH controlado que pueden ser simples (para estudiar una condición única) o múltiples. Entre los sistemas múltiples, es frecuente la utilización de modelos de fermentación continuos o dinámicos (*gut model*) que constan de diversas vasijas para simular las condiciones de las distintas partes del colon en función de los valores de pH: colon ascendente (o proximal) pH ~5,6-5,9, colon transversal pH ~6,1-6,4 y colon descendente (o distal) pH ~6,6-6,9. Algunas versiones más complejas incluyen otros biorreactores que simulan las condiciones del estómago (pH < 2 y presencia de oxígeno) y las del intestino delgado (adición de jugo intestinal y subida progresiva del pH) previas a las condiciones del colon<sup>126-128</sup>. Finalmente, los nuevos modelos que se están desarrollando intentan incluir componentes del hospedador, como mucus o mucinas así como líneas celulares de colon (Caco2, HT29, etc.), para estudiar la posible interacción prebiótico, microbiota y hospedador<sup>129-131</sup>. Sin embargo, este último desarrollo metodológico para simular las condiciones *in vivo* es complejo y, por el momento, el siguiente paso sería el uso de modelos animales una

vez seleccionado *in vitro* un candidato con potencial prebiótico.

#### Modelos de fermentación *in vivo* (animales)

Los ensayos *in vivo* con animales de experimentación son útiles para confirmar el efecto de los prebióticos sobre la dinámica y actividad de la microbiota intestinal y también para estudiar posibles mecanismos de acción<sup>123</sup>. Con estos objetivos, el modelo animal más empleado es el de roedor (ratón y rata), aunque también hay estudios con animales domésticos y de granja para validar potenciales prebióticos para su utilización en alimentación animal. En un estudio típico con roedores estándar “sanos”, el candidato prebiótico se suministra por vía oral, en agua o en comida, o por sonda gástrica y durante el período de intervención se pueden recoger muestras de heces para analizar la dinámica de la microbiota intestinal. Tras sacrificar los animales al final del ensayo, se procede al análisis completo del contenido intestinal, contenido cecal y tejidos, pudiendo emplear estudios histológicos complementarios, además de las técnicas descritas anteriormente. Estos estudios también permiten descartar posibles efectos adversos debidos al consumo del prebiótico, por ejemplo, visualizando al microscopio el estado del tejido intestinal del grupo de animales alimentados con el prebiótico respecto al control.

Por otro lado, se han empleado animales libres de microorganismos (*germ-free animals*) que se colonizan con microbiota humana (*gnotobiotic animals*), permitiendo de este modo estudiar *in vivo* el efecto de potenciales prebióticos, considerando, además, las consecuentes diferencias debidas al organismo animal. Finalmente, para demostrar los efectos relacionados con la ingesta de determinados prebióticos, sobre ciertas disfunciones fisiológicas o enfermedades, se emplean modelos animales específicos modificados genéticamente o inducidos para simular, por ejemplo, cáncer de colon, enfermedades inflamatorias intestinales, síndrome metabólico, diabetes, u osteoporosis, entre otros<sup>132</sup>.

#### Estudios de intervención en humanos

Para finalizar con la hoja de ruta que permite demostrar científicamente la eficacia de los prebióticos, sería necesario llevar a cabo estudios estándar de evaluación clínica de fase 2 (demostración de eficacia) en humanos. En primer lugar, hay que definir el resultado principal (y secundarios, si hubiera) que se espera conseguir con el estudio de intervención con el prebiótico. También hay que definir el tamaño de muestra (población) necesario para demostrar con significación estadística el resultado(s) que se espera obtener y hay que proponer los parámetros fisiológicos a medir para demostrar el efecto. El diseño experimental del estudio

de intervención debe ser doble-ciego, aleatorizado y controlado con placebo<sup>7</sup>.

A modo de ejemplo, en el caso de que el estudio de intervención estuviera diseñado para evaluar la eficacia de un prebiótico sobre la función gastrointestinal, se pueden realizar estudios mecanísticos, que miden respuestas específicas a estímulos de prueba. Actualmente, existe la metodología para evaluar distintos tipos de respuestas digestivas: intraluminales (volumen de gas o heces, productos metabólicos, composición - actividad metabólica de la microbiota), sensitivas (cognitiva - hedonista), motoras (motilidad - tránsito) y de la función de membrana (secreción - absorción)<sup>133-134</sup>.

### Efectos beneficiosos de los prebióticos

Algunos estudios sugieren que los prebióticos podrían ejercer efectos fisiológicos beneficiosos para la salud y el bienestar del organismo, en relación con su capacidad para modular la microbiota intestinal. Estos efectos pueden ser ejercidos no sólo en el colon, sino también en todo el organismo contribuyendo, de esta forma, a reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades intestinales o sistémicas.

Entre los efectos producidos en el colon, cabe mencionar, que los prebióticos estimulan el crecimiento de bacterias fermentativas (bifidobacterias y lactobacilos) con efectos beneficiosos; generan SCFA que producen un descenso de pH, controlando el desarrollo de ciertas comunidades que pueden generar efectos perjudiciales (p. ej. algunas especies de *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Clostridium spp.*<sup>135-136</sup>). Las bifidobacterias no producen butirato pero estimulan el crecimiento de bacterias productoras de este SCFA en el colon, como son las eubacterias<sup>137</sup>. Además, los prebióticos actúan sobre determinadas funciones intestinales reduciendo el tiempo de tránsito intestinal, al producir un aumento del volumen del bolo fecal y del número de deposiciones. Esto es debido a que los SCFA se absorben eficazmente y son utilizados por las células epiteliales del colon estimulando la secreción de agua y de sales.

Además, existen datos que apoyan el hecho de que la ingesta de prebióticos podría reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades intestinales tales como el síndrome de intestino irritable (Irritable bowel syndrome IBS) y de enfermedades inflamatorias intestinales (Inflammatory bowel disease IBD) como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y la pouchitis. El síndrome de intestino irritable es un desorden funcional del colon que se manifiesta por dolor abdominal, malestar, distensión, sensación de hinchazón, flatulencia y cambios variables en la frecuencia y en la forma de las deposiciones. Estudios recientes han descrito diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre pacientes con síntomas digestivos funcionales y sujetos sanos, pero los resultados no son totalmente concordantes. Se ha observado, en estos pacientes, una

reducción de la microbiota beneficiosa (lactobacilos y bifidobacterias) combinada con un incremento del número de enterobacterias, coliformes, bacteroides, y diferentes especies de firmicutes<sup>138</sup>. Por otra parte, no está muy claro que los prebióticos sean adecuados para el tratamiento o la mejoría de la sintomatología en esta enfermedad ya que, además de los SCFA originados por la microbiota durante la fermentación de los mismos, también se producen gases (dióxido de carbono, metano e hidrógeno), que pueden exacerbarla<sup>137</sup>. Por tanto, son necesarios más estudios para determinar el papel de los prebióticos en la fisiopatología y mejoría de los síntomas en la IBS.

Por otro lado, en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa existe una inflamación de la pared intestinal que se manifiesta por síntomas tales como diarrea (frecuentemente con sangre y moco en las heces), dolor abdominal, fiebre, pérdida de peso y formación de fístulas. Y si bien, factores genéticos y ambientales parecen estar implicados, en el desarrollo de estas dos enfermedades inflamatorias, el papel de la microbiota intestinal en su génesis aún está por dilucidar. Así, algunos estudios han descrito niveles reducidos de bifidobacterias y un incremento de microorganismos con efectos potencialmente perjudiciales así como alteraciones de la respuesta inmune en estos pacientes. Además, en animales de experimentación se ha observado que la ingesta de prebióticos (inulina, GOS, FOS) produce un descenso en los niveles de marcadores inflamatorios, traduciéndose este hecho, en una mejora de la inflamación de la mucosa intestinal. En algunos ensayos en humanos se ha observado que la ingesta de inulina, FOS o la combinación de ambos se asocia con mejoría tanto en la exploración endoscópica como en la histología de las lesiones<sup>12,137</sup>.

Los prebióticos podrían también tener un efecto protector frente a infecciones intestinales. Se han descrito varios mecanismos, uno de ellos se basa en la liberación, por parte de muchas especies de lactobacilos y bifidobacterias, de agentes antimicrobianos (SCFA y péptidos) de amplio espectro de acción. También se han utilizado prebióticos conjuntamente con probióticos, en estudios *in vitro*, obteniendo muy buenos resultados de inhibición de microorganismos patógenos. Otro mecanismo de acción se puede atribuir a las propiedades antiadherentes que presentan los prebióticos bloqueando los lugares donde se adhieren los microorganismos patógenos o sus toxinas en las células epiteliales, actuando por lo tanto, como análogos de los receptores<sup>2</sup>. Por ejemplo, los GOS contienen estructuras similares a las encontradas en las microvellosidades que intervienen en la unión con la adhesina bacteriana; así las bacterias se unen a los GOS evitando que se adhieran al epitelio colónico<sup>40</sup>. Los prebióticos podrían ejercer un efecto protector frente a la diarrea del viajero o la diarrea post tratamiento antibiótico. En el primer caso, se ha observado, en un grupo de personas que viajaban a destinos con alto o medio riesgo, que la ingestión de prebióticos dos semanas antes del viaje,

disminuye la duración de la diarrea así como la severidad de la sintomatología frente a un grupo al que se le administró placebo<sup>11</sup>. Los antibióticos pueden producir un desequilibrio en la microbiota intestinal (disbiosis intestinal). Diferentes estudios muestran que las dietas con prebióticos favorecen el crecimiento de las bacterias intestinales con efectos potencialmente beneficiosos<sup>12</sup>.

También se ha especulado sobre la influencia que ejercen los carbohidratos prebióticos en la carcinogénesis. Diferentes estudios han puesto en evidencia la disminución del riesgo de padecer cáncer de colon, sin embargo son necesarios más ensayos para confirmar estos datos. La secuencia de las fases involucradas en el desarrollo de este tipo de cáncer es muy compleja y en su génesis están involucrados factores genéticos y ambientales. De los factores ambientales, la dieta parece jugar un papel fundamental, así varios estudios relacionan el consumo de dietas ricas en carne procesada o ingestas elevadas de alcohol con un incremento del riesgo, mientras que dietas ricas en fibra y leche lo reducen<sup>12</sup>.

Por otra parte, se ha descrito que la microbiota puede interaccionar en la secuencia del desarrollo de un tumor, ya que puede producir, por sí misma, compuestos carcinogénicos y/o enzimas capaces de liberar sustancias carcinogénicas. Así, las  $\beta$ -glucuronidasas utilizan conjugados del ácido glucurónico; las azo- y nitrorreductasas reducen sustratos nitrogenados a aminas, que son generalmente más tóxicos que los productos de origen, y la nitrato reductasa genera el anión nitrito. También la producción de metabolitos en heces, tales como el amoníaco originado a partir de proteínas y de la urea, se relaciona con la formación de tumores. Otros como fenoles y cresoles son también potenciales promotores de enfermedades del colon. Las bifidobacterias y los lactobacilos no producen cantidades significativas de dichas enzimas<sup>139</sup>.

A la vista de las investigaciones, la posible protección que ejercen los prebióticos frente al cáncer de colon puede deberse a la producción de metabolitos como los SCFA, especialmente butirato, en la fermentación por de la microbiota intestinal. El butirato está implicado en los mecanismos que controlan la apoptosis, la división y la proliferación celular. El propionato es otro metabolito originado en la fermentación de los carbohidratos prebióticos y se ha descrito que tiene propiedades anti-inflamatorias que pueden jugar un papel en la génesis del cáncer de colon<sup>11,40,140</sup>.

También se ha estudiado ampliamente la capacidad inmunomoduladora de los prebióticos. Sin embargo no se ha establecido el mecanismo por el cual tiene lugar este efecto, ya que los marcadores a utilizar deben seleccionarse con mucho cuidado debido a su variación y a que dependen, en gran medida, de las condiciones del estudio. La respuesta inmune involucra a un número variable de células con diferente funcionalidad que dan lugar a, por ejemplo, eliminar al patógeno implicado en una infección. Por ello en esta respuesta

no hay un único marcador inmunológico que refleje o permita predecir una resistencia individual a la infección. Existen varias hipótesis y una de ellas propone que las bacterias ácido lácticas, o bien la pared celular o los componentes citoplasmáticos de las mismas penetran en las células epiteliales intestinales activando el tejido linfático asociado al mismo<sup>141</sup>. Otras hipótesis están relacionadas con la propiedad que tienen los prebióticos de favorecer el crecimiento de determinados géneros o especies de microorganismos con efectos potencialmente beneficiosos frente a la disminución de otros, ya que este hecho podría cambiar el perfil colectivo inmuno-interactivo de la microbiota. Varios estudios que han utilizado animales libres de gérmenes y gnotobióticos han puesto de manifiesto que la microbiota es esencial para un óptimo desarrollo estructural y funcional del sistema inmune<sup>6</sup>. También, los SCFA originados a partir de la fermentación de los prebióticos pueden interactuar con las células relacionadas con la respuesta inmune. Se ha comprobado que el ácido butírico puede suprimir la proliferación de linfocitos e inhibir la producción de citoquinas<sup>34</sup>. Otra hipótesis indica que la modulación de la respuesta inmune, por parte de los prebióticos, podría ser debida a que éstos se unen a unos posibles receptores en las células relacionadas, sin embargo no hay evidencia suficiente de la presencia de estos receptores.

Por otra parte, en países desarrollados se ha observado un aumento de la prevalencia de las enfermedades alérgicas, en probable relación con un incremento de la protección de los niños frente a microorganismos (hipótesis de higiene excesiva) dando lugar a cambios en su microbiota, así como al aumento del uso y abuso de antibióticos. Diferentes estudios han puesto de manifiesto la relación existente entre microbiota colónica y desarrollo de alergias, especialmente en el eczema y la alergia a alimentos<sup>142</sup>. Se ha comprobado que niños alérgicos presentan una microbiota con menores niveles de lactobacilos y bifidobacterias. Por ello la ingesta de prebióticos podría disminuir el desarrollo de estas patologías favoreciendo el crecimiento de estos microorganismos. Recientemente se ha estudiado el efecto de una mezcla de prebióticos (Vivinal-GOS: inulina; 90:10) en la incidencia de la dermatitis atópica en lactantes demostrándose una reducción de la incidencia y un aumento significativo de bifidobacterias en la microbiota fecal, no observándose ningún cambio significativo en el número de lactobacilos<sup>34</sup>.

Los prebióticos también favorecen la absorción de minerales tales como el calcio, magnesio, zinc y el hierro debido a la capacidad de unirse a ellos impidiendo, de este modo, su absorción en el intestino delgado alcanzando el colon donde son liberados y posteriormente absorbidos<sup>141</sup>. La deficiencia de calcio está asociada a una deficiente mineralización ósea y la de hierro a anemia microcítica e hipocrómica. Asimismo, el zinc es necesario para el desarrollo y maduración del esqueleto. Una mejor absorción del calcio está asociada a que la fermentación de los prebióticos, por parte

de la microbiota intestinal, produce SCFA y baja el pH luminal aumentando la biodisponibilidad y la absorción pasiva del calcio a través de los colonocitos<sup>12</sup>. También se ha comprobado que la biodisponibilidad del calcio mejora cuando se libera por hidrólisis del complejo “fitato de calcio” por la acción de las fitasas bacterianas presentes en la microbiota beneficiosa y cuando el calcio se vuelve más soluble gracias al aumento de agua en el colon, producido por el efecto osmótico que tienen los prebióticos<sup>136</sup>. El aumento de la absorción del calcio repercute favorablemente en la salud del hueso fortaleciendo la masa ósea y retardando la osteoporosis siendo este hecho de especial interés en períodos de crecimiento, donde se alcanza el pico de masa ósea, en mujeres postmenopáusicas y en personas mayores.

El hierro se encuentra unido al ácido fítico y existe una relación inversa entre cantidad de este ácido en la dieta y su absorción. Se necesitan muy pequeñas cantidades de este ácido (0,7%) en la dieta para reducir a la mitad la absorción de este mineral. Los prebióticos estimulan la absorción de hierro en el colon, por el aumento de la fracción soluble en las células. En el caso del zinc, también está unido al ácido fítico que inhibe su absorción. En estudios en humanos se ha comprobado que los fitatos están altamente relacionados con una disminución de la absorción de zinc en jóvenes sanos y personas mayores. Los prebióticos estimulan la biodisponibilidad del zinc. Por ello su administración en la dieta restablece la absorción de este mineral<sup>137</sup>.

Además, se atribuyen a los prebióticos, otra serie de propiedades relacionadas con determinadas enfermedades sistémicas. Los carbohidratos prebióticos (GOS, FOS, inulina) reducen la presión arterial, así como los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos y fosfolípidos en sangre; además de la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos en el hígado minimizando el riesgo de desarrollar diabetes, obesidad y aterosclerosis<sup>40,141</sup>. Por otra parte, los cambios producidos en el metabolismo lipídico pueden ser una consecuencia de la producción de SCFA, que pueden inducir cambios metabólicos en el hígado.

Los prebióticos y concretamente la lactulosa, también se utilizan en el tratamiento de la encefalopatía portal sistémica, enfermedad que afecta al sistema nervioso central, por la elevación del contenido de amoníaco en sangre. Está provocada por el amoníaco y otras neurotoxinas generadas por ciertas bacterias gastrointestinales y puede deberse a una ingesta alta de proteínas en la dieta. Los prebióticos restablecen la microbiota beneficiosa e inhiben el crecimiento de bacterias productoras de amoníaco. En el caso de pacientes con cirrosis se han utilizado XOS<sup>143</sup> y lactulosa<sup>144</sup> para controlar los niveles de amoníaco y fenoles libres en sangre.

A pesar de los numerosos efectos beneficiosos que pueden ejercer los oligosacáridos prebióticos, hay que considerar la importancia que tiene el establecimiento de la ingesta adecuada para evitar efectos adversos ya

que, si ésta es excesiva, podría provocar molestias intestinales, diarrea y flatulencia. Se ha demostrado que una ingesta por encima de 20 g/día de GOS podría provocar diarrea<sup>3</sup>. Para establecer la ingesta adecuada, hay que tener en cuenta el tipo de oligosacárido, aunque en la mayoría de los casos una ingesta de 15 g/día puede incrementar la población de bifidobacterias<sup>145</sup>. Por otra parte, también habría que tener en cuenta la microbiota de cada individuo, Roberfroid<sup>146</sup> estableció que una ingesta diaria de prebióticos no es tan determinante en el efecto bifidogénico, sino que está directamente relacionada con el número de bifidobacterias/g presentes en el organismo antes de empezar la suplementación con el prebiótico en la dieta. Hay estudios que han demostrado que una ingesta de 10 g/día de GOS, en individuos sanos de edad media, sería suficiente para ejercer el efecto bifidogénico. Sin embargo, si el número de bifidobacterias de partida es bajo, como podría ser el caso de personas mayores, la ingesta de 2,5 g/día sería suficiente para producir un aumento en la población de las bifidobacterias.

### Perspectivas futuras de investigación

En este artículo se pone de manifiesto que la investigación existente sobre prebióticos, hasta el momento, es extensa y variada. De hecho se ha mostrado que ha de tenerse en cuenta un gran número de factores para asignar y demostrar las alegaciones de salud que se formulan en cada uno de los estudios realizados y para cada carbohidrato considerado. Sin embargo, a nuestro entender, todavía queda un importante trabajo multidisciplinar que realizar, orientado a profundizar en los aspectos siguientes:

- i) Mejora de los métodos de análisis y de detección para caracterizar correctamente los carbohidratos prebióticos facilitando, de esta forma, la asignación de propiedades bioactivas y posible diseño de prebióticos de segunda generación con beneficios concretos de salud;
- ii) Definición de biomarcadores para seleccionar los grupos microbianos, beneficiosos para la salud, en función de la fermentación del prebiótico;
- iii) Ensayos de intervención en humanos bien diseñados, robustos y de buena calidad que permitan valorar el efecto del consumo de los prebióticos en la selectividad, incluyendo para ello un mayor número de grupos bacterianos. Los estudios mecanísticos utilizando biomarcadores objetivos podrían ser de gran utilidad;
- iv) Establecimiento de la ingesta diaria del prebiótico para desarrollar la actividad o las actividades atribuidas al mismo, así como la monitorización de los posibles efectos adversos o secundarios a largo plazo del prebiótico ingerido;
- v) Estudio de nuevas aplicaciones de los prebióticos en la prevención y tratamiento de enfermedades como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, las alteraciones inmunitarias (alergias, etc.), entre otras.

## Referencias

1. Mohammadi R, Mortazavian AM. Technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks *Food Rev Int* 2011; 27: 192-212.
2. Lamsal BP. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *J Sci Food Agric* 2012; 92: 2020-2028.
3. Sako T, Matsumoto K, Tanaka R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int Dairy J* 1999; 9: 69-80.
4. Gibson GR., Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125:1401-1412.
5. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 2004; 17: 259-275.
6. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall RA, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Leotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A. Prebiotics effects: metabolic and health benefits. *Brit J Nutr* 2010; 104: S1-S63.
7. FAO Technical Meeting on prebiotics. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Food Quality and Standards Service (AGNS). September 15-16, 2007.
8. ISAPP (2008) 6<sup>th</sup> Meeting of the International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics, London, Ontario.
9. World Gastroenterology Organisation (WGO) (2011). En: Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos (<http://www.worldgastroenterology.org>). 2011.
10. Gibson GR, Ottaway PB, Rastall RA. Prebiotics. New developments in functional foods. ISBN 1-902423-43-7, Chadwick House Group Limited 2000, 1-108.
11. Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, Gareau M, Murphy EF, Saulnier D, Loh G, Macfarlane S, Delzenne N, Ringel Y, Kozianowski G, Dickman R, Lenoir-Wijnkoop I, Wlaker C, Buddington R. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull* 2010; 7: 1-19.
12. Rastall RA. Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annu Rev Food Sci Technol* 2010; 1: 305-339.
13. Van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *J Appl Microbiol* 2006; 102: 452-460.
14. Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J Appl Microbiol* 2008; 104: 305-344.
15. Rodríguez-Colinas B. Obtención enzimática, caracterización y propiedades prebióticas de oligosacáridos empleados en leches infantiles. Tesis Doctoral Noviembre 2013.
16. Birkett AM, Francis CC. Short-Chain Fructo-Oligosaccharide. A Low Molecular Weight Fructan. En: Handbook of prebiotics and probiotics ingredients. Health benefits and food applications (eds S.S. Cho & E.T. Finocchiaro) CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton New York , 2010 Capítulo 2, pp 13-42. ISBN-10: 1-4200-6213-1; ISBN-13: 978-1-4200-6213-7.
17. Villamiel M, Montilla A, Olano A, Corzo N "Production and bioactivity of oligosaccharides derived from lactose". En: Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity. ISBN: 978-1-118-42649-4. Eds F. Javier Moreno y M. Luz Sanz. Wiley-Blackwell, Chichester, United Kingdom. pp.137-167 (2014).
18. Petuely F. Lactobacillus bifidus flora produced in artificially-fed infants by bifidogenic substances (bifidus factor). *Z Kinderheilkd* 1957; 79: 174-179.
19. Adachi S, Patton S. Presence and significance of lactulose in milk products: A review. *J Dairy Sci* 1961; 44: 1375-1393.
20. Olano A, Corzo N. Lactulose as a food ingredient. *J Sci Food Agric* 2009; 89: 1987-1990.
21. Schuster-Wolff-Bühning R, Fischer L, Hinrichs J. (2010) Production and physiological action of the disaccharide lactulose. *Int Dairy J* 2010; 20: 731-741.
22. Panesar PS, Kumari S. Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnol Adv* 2011; 29: 940-948.
23. Cardelle-Cobas A, Martínez-Villaluenga C, Villamiel M, Olano A, Corzo N. Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and Pectinex Ultra SP-L. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 3328-3333.
24. Martínez-Villaluenga C, Cardelle-Cobas A, Olano A, Corzo N, Villamiel M, Jimeno, ML. Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides produced from lactulose by transgalactosylation. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 557-563.
25. Cardelle-Cobas A, Fernández M, Salazar N, Martínez-Villaluenga C, Villamiel M, Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán C. Bifidogenic effect and stimulation of short chain fatty acid production in human faecal slurry cultures by oligosaccharides derived from lactose and lactulose. *J Dairy Res* 2009; 76: 317-325.
26. Cardelle-Cobas A, Corzo N, Olano A, Peláez, C, Requena T, Ávila M. (2011b) Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Bifidobacterium* growth. *Int J Food Microbiol* 2011; 149: 81-87.
27. Cardelle-Cobas A, Olano A, Corzo N, Villamiel M, Collins M, Kolida S, Rastall, RA (2012) In vitro fermentation of lactulose-derived oligosaccharides by mixed fecal microbiota. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 2024-2032.
28. Marín-Manzano MC, Abecia L, Hernández-Hernández O, Sanz ML, Montilla A, Olano A, Rubio LA, Moreno FJ, Clemente A. Galacto-oligosaccharides derived from lactulose exert a selective stimulation on the growth of *Bifidobacterium animalis* in the large intestine of growing rats. *J Agric Food Chem* 2013; 61: 7560-7567.
29. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2010. Scientific opinion on the substantiation of health claims related to lactulose and decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 806) and reduction in intestinal transit time (ID 807) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 8, 1806-1821.
30. Playne MJ, Crittenden RG (2009) Galacto-oligosaccharides and Other Products Derived from Lactose. In: *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3, Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*. (eds, P.L.H. McSweeney & P.F. Fox), pp. 121-201. Espringer, New York.
31. Miller JN, Whistler RL. 2000. Carbohydrates. In O. Fennema (ED). *Food Chemistry* (pp207) New York: Marcel Dekker.
32. Boon MA, Janssen AEM, Van't Riet K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme Microb Technol* 2000; 26: 271-281.
33. Splechtina B, Nguyen TH, Steinböck M, Kulbe KD, Lorenz W, Haltrich D. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 4999-5006.
34. Tzortzis G, Vulevic J. Galactooligosaccharide prebiotics, In: *Prebiotics and Probiotics: Science and Technology* (eds D. Charalampopoulos & R.A. Rastall), Springer Science, New York, 2009, pp. 207-244.
35. Gaur R, Pant H, Jain R, Khare SK. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase. *Food Chem* 2006; 97:426-430.
36. Sears P, Wong CH. Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins, *Science* 2001; 291: 2344-2350.
37. Padilla B, Ruiz-Matute A.I, Belloch C, Cardelle-Cobas A, Corzo N, Manzanares, P. Evaluation of oligosaccharide synthesis from lactose and lactulose using  $\beta$ -galactosidases from *Kluyveromyces* isolated from artisanal cheeses. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 5134-5141.
38. Rodríguez-Colinas B, Poveda A, Jiménez-Barbero J, Ballesteros AO, Plou FJ (2012) Galacto-oligosaccharide synthesis from lactose solution or skim milk using the  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 6391-6398.

39. Torres D, Gonçalves M, Teixeira J, Rodrigues L. (2010) Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2010; 9: 438-454.
40. Sangwan V, Tomar SK, Singh RRB, Singh AK, Ali, B. (2011) Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. *J Food Sci* 2011; 76: R103-R111.
41. Ito M, Deguchi Y, Miyamori A, Matsumoto K, Kikuchi H, Matsumoto K, Kobayashi Y, Yajima T, Kan T. Effects of administration of galactooligosaccharides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation. *Microb Ecol Health Dis* 1990; 3: 285-292.
42. Otieno DO. Synthesis of  $\beta$ -galactooligosaccharides from lactose using microbial  $\beta$ -galactosidases. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2010; 9: 471-482.
43. Bode L. Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J Nutr* 2006; 136 (8):2127-30.
44. Venema K. Intestinal fermentation of lactose and prebiotic lactose derivatives, including human milk oligosaccharides. *Int Dairy J* 2012; 22: 123-140.
45. Barile D, Rastall RA. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Curr Opin Biotechnol* 2013; 24: 214-219.
46. Kunz C, Kuntz S, Rudloff S. "Bioactivity of human milk oligosaccharides". En: *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. ISBN: 978-1-118-42649-4. Eds F. Javier Moreno y M. Luz Sanz. Wiley-Blackwell, Chichester, United Kingdom. pp. 5-20, 2014.
47. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Jiang X, Newburg DS. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea". *J Nutr* 2005; 135: 1304-1307.
48. Mäkeläinen H, Forssten S, Saarinen M, Stowell J, Rautonen N, Ouwehand AC. Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and Bifidobacterium lactis in a simulated colon model. *Beneficial Microbes* 2010; 1: 81-91.
49. Muralikrishna G, Schwarz S, Dobleit G, Fuhrmann H, Krueger M. Fermentation of feruloyl and non-feruloyl xylooligosaccharides by mixed fecal cultures of human and cow: a comparative study in vitro. *Eur Food Res Technol* 2011; 232: 601-61.
50. Van Craeyveld V, Swennen K, Dornez E, Van de Wiele T, Marzorati M, Verstraete W, Delaet Y, Onagbesan O, Decuyper E, Buyse J, De Ketelaere B, Broekaert WF, Delcour JA, Courtin Ch M. Structurally different wheat-derived arabinoxylooligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats. *J Nutr*, 2008; 138: 2348-2355.
51. Chung Y, Hsu, C, Ko C, Chan Y. Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal Moisture, and pH Value in the elderly. *Nutr Res* 2007; 27: 756-761.
52. Lecerf JM, Depeint F, Clerc E, Dugenet Y, Niamba CN, Rhazi L, Cayzele A, Abdelnour G, Jaruga A, Younes H, Jacobs H, Lambrey G, Abdelnour AM, Pouillart PR. Xylo-oligosaccharide (XOS) in combination with inulin modulates both the intestinal environment and immune status in healthy subjects, while XOS alone only shows prebiotic properties. *Br J Nutr* 2012; 108: 1847-1858.
53. Francois IEJA, Lescroart O, Veraverbeke WS, Marzorati M, Possemiers S, Evenepoel P, Hamer H, Houben E, Windey K, Welling GW, Delcour JA, Cour tin Ch M, Verbeke, K, Broekaert WF. Effects of a wheat bran extract containing arabinoxylan oligosaccharides on gastrointestinal health parameters in healthy adult human volunteers: a double-blind, randomised, placebo-controlled, cross-over trial. *Br J Nutr* 2012; 108: 2229-2242.
54. Sheu WHH, Lee IT, Chen W, Chan YC. Effects of xylooligosaccharides in type 2 diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol* 2008; 54: 396-401.
55. Moure A, Gullón P, Dominguez H Parajó JC. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochem* 2006; 41: 1913-1923.
56. Chen HH, Chen YK, Chang HC, Lin SY. Immunomodulatory effects of xylooligosaccharides. *Food Sci Technol Res* 2012; 18(2): 195-199.57.- Terada A, Hara H, Kato S, Kimura T, Fujimori I, Hara K, Maruyama T, Mitsuoka T. Effect of lactosucrose (4<sup>G</sup>- $\beta$ -D-galactosylsucrose) on fecal flora and fecal putrefactive products of cats. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 291-295.
57. Terada A, Hara H, Kato S, Kimura T, Fujimori I, Hara K, Maruyama T, Mitsuoka T. Effect of lactosucrose (4<sup>G</sup>- $\beta$ -D-galactosylsucrose) on fecal flora and fecal putrefactive products of cats. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 291-295.
58. Terada A, Hara H, Sakamoto J, Sato N, Takagi S, Mitsuoka T, Mino R, Hara, K, Fujimori I, Yamada T. Effects of dietary supplementation with lactosucrose (4<sup>G</sup>- $\beta$ -D-galactosylsucrose) on cecal flora, cecal metabolites, and performance in broiler-chickens. *Poult Sci* 1994; 73: 1663-1672.
59. Ohkusa T, Ozaki Y, Sato C, Mikuni K, Ikeda H. (1995) Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora. *Digestion* 1995; 56: 415-420.
60. Takei K, Akakura K, Ueda T, Mikami, K, Haruo I. Effect of oral lactosucrose supplementation on human enteric oxalate-degrading bacteria. *Hinyokika kyo. Acta Urologica Japonica* 2006; 52: 687-691.
61. Monsan P, Ouarné F. *Oligosaccharides derived from sucrose*. In: *Prebiotics and Probiotics, Science and Technology*, Eds. D. Charalampopoulos and R. A. Rastall, Springer. Science New York Ch 10 pp 293-336, 2009.
62. Kaneko T, Yokoyama A, Suzuki M. Digestibility characteristics of isomalto-oligosaccharides in comparison with several saccharides using the rat jejunum loop method. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995; 9: 1190-1194.
63. Rycroft C E, Jones M E, Gibson G R, Rastall R A A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91: 879-887.
64. Makelainen H, Hasselwander O, Rautonen N, Ouwehand AC. Panose, a new prebiotic candidate. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49: 666-672.
65. Ketabi A, Dieleman LA, Gänzle MG. Influence of isomalto-oligosaccharides on intestinal microbiota in rats. *J Appl Microbiol* 2011; 110: 1297-1306.
66. Hu Y, Ketabi A, Buchko A, Gänzle MG. Metabolism of isomalto-oligosaccharides by *Lactobacillus reuteri* and bifidobacteria. *Lett Appl Microbiol* 2013; 57: 108-114.
67. Gu Q, Yang Y, Jiang G, Chang G. Study on the regulative effect of somaltooligosaccharides on human intestinal flora]. *Wei Sheng Yan Jiu* 2003; 32: 54-55.
68. Zhang F, Li DF, Lu WQ. and Yi, G.F. Effects of isomalto-oligosaccharides on broiler performance and intestinal microflora. *Poult Sci* 2003; 82: 657-663.
69. Thitaram SN, Chung CH, Day DF, Hinton A, Bailey JS, Siragusa GR Isomaltooligosaccharide increases cecal bifidobacterium population in young broiler chickens. *Poult Sci* 2005; 84: 998-1003.
70. Rehman H, Vahjen W, Kohl-Parisini A, Ijaz A, Zentek J. Influence of fermentable carbohydrates on the intestinal bacteria and enteropathogens in broilers. *Worlds Poult Sci J* 2009; 65: 75-90.
71. Chen HL, Lu YH, Lin JJ, Ko LY. Effects of isomalto-oligosaccharides on bowel functions and indicators of nutritional status in constipated elderly men. *J Am Coll Nutr* 2001; 20: 44-49.
72. Yen CH, Tseng YH, Kuo YW, Lee MC, Chen HL. Long-term supplementation of isomalto-oligosaccharides improved colonic microflora profile, bowel function, and blood cholesterol levels in constipated elderly people—a placebo-controlled, diet-controlled trial. *Nutrition* 2011; 17: 445-450.
73. Wang HF, Lim P-S, Kao MD, Chan EC, Lin LC, Wang NP. Use of isomalto-oligosaccharide in the treatment of lipid profiles and constipation in hemodialysis patients. *J Renal Nutr* 2001; 11: 73-79.
74. Watanabe T, Watanabe M, Kageyama, S. Prophylactic or ameliorating agent for immunological dysfunction, Prophylactic or ameliorating agent for microbism, tumor immunological enhancer and Prophylacticor ameliorating agent for in vivo various dysfunctions and functional food comprising  $\alpha(1\rightarrow6)$ -bonded chain glucose oligomer as active ingredient. *Japanese Patent*, JP 2002161039 (2002).

75. Espinosa-Martos I, Rupérez P. Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional foods. *Nutr Hosp* 2006; 21: 92-96.
76. Hayakawa K, Mizutani J, Wad K, Masai T, Yoshihara I, Mitsuoka T. Effects of soybean oligosaccharides on human fecal microflora. *Microb Ecol Health Dis* 1990; 3: 293-303.
77. Crittenden R. Emerging Prebiotic Carbohydrates. En: Prebiotics. Development & Application. Gibson, G.R. & Rastall, R.A. (Eds). John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. England, 2006 pp 111-33.
78. Leach JD, Rastall RA, Gibson GR. Prebiotics: Past, Present and Future. En: Prebiotics. Development & Application. Gibson, G.R. & Rastall, R.A. (Eds). John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. England, 2006.
79. Chen H, Liu LJ, Zhu JJ, Xu B, Li R. Effects of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats. *Food Chem* 2010; 119: 1633-1636.
80. Valette JP, Franquet B, Wolter R. Calcul de la ration du cheval trotteur (Calculation of the daily ration of the horsetrotter). *Equathlon* 1993; 5: 8-9.
81. Chung CH, Day DF. Glucosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 (ATCC 13146): a potential prebiotic. *J Indus Microbiol Biotechnol* 2002; 29: 196-199.
82. Wichienchot S, Prasertsan P, Hongpattarakere T, Gibson GR, Rastall RA. In vitro Fermentation of Mixed Linkage Glucosaccharides Produced by *Gluconobacteroxydans* NCIMB 4943 by the Human Colonic Microflora. *Curr Issues Intestinal Microbiol* 2006; 7: 7-12.
83. Wichienchot S, Prasertsan P, Hongpattarakere T, Gibson GR, Rastall RA. In vitro Three-stage Continuous Fermentation of Gluco-oligosaccharides Produced by *Gluconobacteroxydans* NCIMB 4943 by the Human Colonic Microflora. *Curr Issues Intestinal Microbiol* 2006; 7: 13-18.
84. Sarbini SR, Kolida S, Gibson GR, Rastall RA. In vitro fermentation of commercial  $\alpha$ -gluco-oligosaccharide by faecal microbiota from lean and obese human subjects. *Bri J Nutr* 2013; 109: 1980-1989.
85. Gulfi M, Arrigoni E, Amadó R. The chemical characteristics of apple pectin influence its fermentability in vitro. *LWT-Food Sci Technol* 2006; 39: 1001-1004.
86. Gullón B, Gómez, B, Martínez-Sabajanes M, Yañez R, Parajo JC. Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Trends Food Sci Technol* 2013; 30: 153-161.
87. Van Laere KMJ, Hartemink R, Bosveld M, Schols HA, Vora-gen AG. Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal Bacteria. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 1644-52.
88. Suzuki Y, Tanaka K, Amano T, Asakura T, Muramatsu, N. Utilization by intestinal bacteria and digestibility of arabi-no-oligosaccharides in vitro. *J Japan Soc Hort Sci* 2004; 73: 574-79.
89. Onumpai C, Kolida S, Bonnin E, Rastall RA. Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 5747-5754.
90. Magne F, Hachelaf W, Suau A, Boudraa G, Bouziane-Nedjadi K, Rigottier-Gois L, Touhami M, Desjeux JF, Pochart P. Effects on faecal microbiota of dietary and acidic oligosaccharides in children during partial formula feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46: 580-588.
91. Westerbeck EAM, Slump RA, Lafeber HN, Knol J, Georgi G, Fetter WPF, van Elburg RM. The effect of enteral supplementation of specific neutral and acidic oligosaccharides on the faecal microbiota and intestinal microenvironment in preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 269-276.
92. Gori A, Rizzardini G, van't Land B, Amor KB, van Schaik J, Torti C, Quirino T, Tincati C, Bandera, A, Knol J, Benhas-san-Chahour K, Trabattoni D, Bray D, Vriesema A, Welling G, Garssen J, Clerici M. Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naive HIV-infected adults: results of the "COPA" pilot randomized trial. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 554-563.
93. Mäkiyuokko H, Nurmi J, Nurminen P, Stowell J, Rautonen N. In vitro effects on polydextrose by colonic bacteria and Caco-2cell cyclooxygenase gene expression, 2005 *Nutrition Cancer*, 2005; 52: 94-104.
94. Beards E, Tuohy K, Gibson G. A Human volunteer study to assess the impact of confectionery sweeteners on the gut microbiota composition. *Br J Nutr* 2010; 104: 701-708.
95. Costabile A; Fava F; Roytito H. Forssten SD, Olli K, Klievink J, Rowland IR, Ouweland AC, Rastall RA, Gibson GR, Walton GE(2012). Impact of polydextrose on the faecal microbiota: a double-blind, crossover, placebo-controlled feeding study in healthy human subjects. *Brit J Nutr* 2012; 108: 471-481.
96. Ashley C, Johnston W H, Harris Ch L, Stolz S I, Wampler, J L, Berseth C L. Growth and tolerance of infants fed formula supplemented with polydextrose (PDX) and/or galactooligosaccharides (GOS): double-blind, randomized, controlled trial. *Nutr J* 2012; 11:1-10.
97. Ribeiro T C M, Costa-Ribeiro HJR, Almeida PS, Pontes MV, Leite MEQ, Filadelfo LR, Khoury J C, Bean JA, Mitmesser SH, Vanderhoof JA, Scalabrin DMF. Stool pattern changes in toddlers consuming a follow-on formula supplemented with polydextrose and galactooligosaccharides. *J Pedr Gastroenterol Nutr* 2012; 54: 288-290.
98. Scalabrin DMF, Mitmesser SH, Welling GW, Harris, CL, Marunycz JD, Walker DC, Bos NA, Tolkkio S, Salminen, S, Vanderhoof, JA New prebiotic blend of polydextrose and galacto-oligosaccharides has a bifidogenic effect in young infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012, 54: 343-352.
99. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polydextrose and changes in bowel function (ID 784), changes in short chain fatty acid (SCFA) production and/or pH in the gastro-intestinal tract (ID 784), decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 785) and reduction of gastro-intestinal discomfort (ID 784) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*. 2011, 9(6), 2256.
100. Nikolic M, López P, Strahinic I, Suárez A, Kojic M, Fernández-García M, Topisirovic L, Golic N, Ruas-Madiedo P. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int J Food Microbiol* 2012 ; 17: 158:155-62.
101. O'Sullivan L, Murphy B, McLoughlin P, Duggan P, Lawlor PG, Hughes H, Gardiner GE. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine Drugs* 2010; 8: 2038-2064.
102. Gupta S, Abu-Ghannam N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds (Review). *Trends Food Sci Technol* 2011; 22: 315-326.
103. Rupérez P, Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A. Biological activity of algal sulfated and non-sulfated polysaccharides. In: *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*. Hernández-Ledesma B. and Herrero M. (Eds), Wiley-Blackwell's Food Science and Technology book, 2013, pp. 219-248, ISBN: 978-1-118-41284-8.
104. Lahaye M, Robic A. Structure and function properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 2007; 6: 1765-1774.
105. Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A, Rupérez P. Effect of the red seaweed *Mastocarpus stellatus* intake on lipid metabolism and antioxidant status in healthy Wistar rats. *Food Chem* 2012; 135: 806-811.
106. Jiménez-Escrig A, Gómez-Ordóñez E, Tenorio MD, Rupérez P. Antioxidant and prebiotic effects of dietary fiber co-travelers from sugar Kombu in healthy rats. *J Appl Phycol* 2013; 25: 503-512.
107. Sanz ML, Ruiz-Matute AI, Corzo N, Martínez-Castro I. Analysis of prebiotic oligosaccharides. In: *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* (eds D. Charalampopoulos & R.A. Rastall), Springer Science, New York, 2009, Ch 13, pp. 465-534.
108. Brummer Y, Cui SW. Understanding carbohydrate analysis. In: Cui, S.W. (Ed) *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical*

- Properties, and Applications. CRC Press: West Palm Beach, 2005.
109. Hernández-Hernández O., I. Calvillo, R. Lebrón-Aguilar, F.J. Moreno, M.L. Sanz Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographic (HILIC) coupled to mass spectrometry for the characterization of prebiotic galactooligosaccharides. *J Chromatogr A* 2012; 1220: 57-67.
  110. Sanz M.L., J. Sanz, I. Martínez-Castro. Characterization of O-Trimethylsilyl oximes of disaccharides by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 2002; 56: 617-622.
  111. Cardelle-Cobas A, Martínez-Villaluenga C, Sanz, ML, Montilla A. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of galactosyl derivatives obtained by the action of two different  $\beta$ -galactosidases. *Food Chem* 2009; 114: 1099-1105.
  112. Marry M., D.M. Cavalier, J.K. Schnurr, J. Netland, Z.Y. Yang, V. Pezeshk, W.S. York, M. Pauly, A.R. White Structural characterization of chemically and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucan. *Carbohydr Polym* 2003; 51: 347-356.
  113. Ávila-Fernández A, Galicia-Lagunas N, Rodríguez-Alegría ME, Olvera C, López Munguía A. Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chem* 2011; 129: 380-386.
  114. Blanch M, Sanchez-Ballesta MT, Escribano MI, Merodio C Fructo-oligosaccharides in table grapes and response to storage. *Food Chem* 2011; 129: 724-730.
  115. Mateos-Aparicio I, Redondo A, Villanueva MJ, Zapata-Revilla MA, Tenorio-Sanz MD. Pea pod, brad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT-Food Sci Technol* 2010; 43: 1467-1470.
  116. Alpert A.J. Hydrophilic-Interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic-acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 1990; 499: 177-196.
  117. Zaia J. Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev* 2004; 23: 161-227.
  118. Pasanen S, Janis J, Vainiotalo P. Cello-, malto- and xylooligosaccharide fragmentation by collision-induced dissociation using QIT and FT-ICR mass spectrometry: a systematic study. *Int J Mass Spectrom* 2007; 263: 22-29.
  119. Matamoros-Fernández LE, Obel N, Scheller HV, Roepstorff P. Characterization of plant oligosaccharides by matrix assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2003; 38: 427-37.
  120. Dreisewerd K, Kolbl S, Peter-Katalinic J, Berkenkamp S, Pohlentz G. Analysis of native milk oligosaccharides directly from thin-layer chromatography plates by matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal-time-of-flight mass spectrometry with a glycerol matrix. *J Am Soc Mass Spectrom* 2006; 17: 139-150.
  121. Kajihara Y, Sato H. Structural analysis of oligosaccharides by nuclear magnetic resonance method. *Trends Glycosci Glyco-technol* 2003; 15: 197-220.
  122. Hernández O, A.I. Ruiz-Matute AI, Olano A, Moreno FJ, Sanz ML. Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. *Int Dairy J* 2009; 19: 531-536.
  123. Clemente A. *In vivo* assessment of the bioactivity of food oligosaccharides. In: "Food oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity". ISBN: 978-1-118-42649-4. Eds F. Javier Moreno y M. Luz Sanz., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England Ch 14, pp. 238-252.
  124. Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG. Detection and enumeration of gastrointestinal microorganisms. En: "Handbook of probiotics and prebiotics". Lee, YK, and Salminen S. (eds). John Wiley & Sons, Inc. (Ed.), Hoboken, New Jersey, USA. pp. 25-43, 2009.
  125. Martin FP, Collino S, Rezzi S, Kochhar S. Metabolomics applications to decipher gut microbial metabolic influence in health and disease. *Front Physiol* 2012; 3: 1-11.
  126. Van den Abbeele P, Grootaert C, Marzorati M, Possemiers S, Verstraete W, Gérard P, Rabot S, Bruneau A, El Aidy S, Derrien M, Zoetendal E, Kleerebezem M, Smidt H, Van de Wiele T. (2010). Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for *Bacteroidetes* and *Clostridium* cluster IX. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 5237-5246.
  127. Marzorati M, Van Den Abbeele P, Possemiers S, Benner J, Verstraete W, Van De Wiele T. Studying the host-microbiota interaction in the human gastrointestinal tract: basic concepts and *in vitro* approaches. *Ann Microbiol* 2011; 61: 709-715.
  128. Tabernero M, Venema K, Maathuis AJH, Saura-Calixto FD. Metabolite production during *in vitro* colonic fermentation of dietary fiber: analysis and comparison of two European diets. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 8968-8975.
  129. Cencič A, Langerholc T. Functional cell models of the gut and their application in Food microbiology – A review. *Int J Food Microbiol* 2010; 141:S4-S14.
  130. Van den Abbeele P, Roos S, Eeckhaut V, MacKenzie DA, Derde M, Verstraete W, Marzorati M, Possemiers S, Vanhooecke B, van Immerseel F, van de Wiele T. Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli. *Microb Biotechnol* 2012; 5: 106-115.
  131. Yu J, Peng S, Luo D, March JC. *In vitro* 3D human small intestinal villous model for drug permeability determination. *Biotechnol Bioeng* 2012; 109: 2173-2178.
  132. Parnell JA, Reimer RA. Prebiotics fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter *Bacteroidetes* and *Firmicutes* in lean and obese JCR:LA-cp rats. *Br J Nutr* 2012; 107: 601-613.
  133. Guarner F, Azpiroz F. La evaluación científica de los alimentos funcionales. En: Juárez M, Olano A, Morais F, eds. Alimentos Funcionales. Madrid: FECYT, 2005: 11-22.
  134. Azpiroz F. From sensation to perception: the gut brain connection. En: Pasricha J, Willis WD, Gebhart GF. Chronic Abdominal and Visceral Pain. Theory and Practice. Boca Raton FL: CRC Press, 2007: 193-203.
  135. Mussato SL, Mancilha IM. Non-digestible oligosaccharide: a review. *Carbohydr Polym* 2007; 68: 587-507.
  136. Caselato de Sousa VM, Freitas dos Santos E, Sgarbieri VC The importance of prebiotics in functional foods and clinical practice. *Food Nutr Sci* 2011; 2: 133-144.
  137. Steed H, Macfarlane, S. Mechanisms of prebiotic impact on health. En: Charalampopoulos, D., Rastall, R. A., (Eds.), En: *Prebiotics and Probiotics: Science and Technology* (eds D. Charalampopoulos & R.A. Rastall), Springer Science, New York, 2009, pp. 135-161.
  138. Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley EMM. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25: 4-15.
  139. Corzo N, Montilla A, Cardelle-Cobas A, Olano A. "Carbohidratos prebióticos derivados de la lactosa". En: Funcionalidad de componentes lácteos. Capítulo 8, pp 159-178. Proyecto CYTED: N° XI.24. Ed. Universidad Miguel Hernández, 2009.
  140. Bornet FRJ, Brouns F. Immune-stimulating and gut health-promoting properties of short-chain fructo-oligosaccharides. *Nutr Rev* 2002; 60: 326-334.
  141. Maning TS, Gibson, GR. Prebiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 287-298.
  142. Martin R, Nauta AJ, Ben Amor K, Knippels LMJ, Knol J, Garssen J. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Beneficial Microbes* 2010; 1: 367-382.
  143. Kajihara M, Kato S, Konishi M, Yamagishi Y, Horie Y, Ishii H. Xylooligosaccharide decreases blood ammonia levels in patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:2514.
  144. Szilagyí A. Functional Disaccharides: Lactulose, Lactitol, and Lactose. En: Handbook of prebiotics and probiotics ingredients. Health benefits and food applications (eds S.S. Cho & E.T. Finocchiaro) CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton New York, 2010 Capítulo 5, pp 95-122. ISBN-10: 1-4200-6213-1; ISBN-13: 978-1-4200-6213-7.
  145. Crittenden RG, Playne MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Technol* 1996; 7: 353-61.
  146. Roberfroid M. Prebiotics: The concept revisited. *J Nutr* 2007; 137: 830S-837S.