



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: Síntesis enzimática de prebióticos**

Autor: Ignacio Piñero Barrera

Fecha: 19 de julio

Tutor: Maria Josefa Hernaiz Gómez

## ÍNDICE

1. RESUMEN
2. OBJETIVOS
3. METODOLOGÍA
4. INTRODUCCIÓN
5. EVOLUCIÓN DEL TÉRMINO “PREBIÓTICO”
6. INMOVILIZACIÓN
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
  - 7.1. PREBIÓTICOS CLÁSICOS
  - 7.2. PREBIÓTICOS EMERGENTES
8. CONCLUSIONES
9. BIBLIOGRAFÍA

## 1. RESUMEN

En nuestro intestino habita una gran variedad de microorganismos a los que denominamos microflora intestinal o microbiota intestinal. Estos juegan un papel crucial en una interrelación constante con el hospedador y son capaces de digerir algunas moléculas que nuestro organismo no es capaz, a las cuales denominamos prebióticos.

Los prebióticos tienen diferentes estructuras químicas, pero en su mayoría son oligosacáridos, los cuales son polímeros formados de dos a diez unidades monosacáridicas. Debido a su importancia fisiológica, se ha puesto un gran foco de interés en estas moléculas, para poner de manifiesto sus efectos beneficiosos, cuáles son las moléculas que demuestran tal acción y además donde se centrará esta revisión: cómo producirlas a nivel industrial para poder utilizarlas.

Existen dos métodos principales de síntesis para todo este grupo de sacáridos, la síntesis química y la síntesis enzimática. Esta, demuestra numerosas ventajas frente a la primera, ya que la síntesis química requiere una multitud de pasos, protecciones y desprotecciones principalmente, y por lo tanto un bajo rendimiento y una gran cantidad de residuos. La síntesis enzimática mejora esta situación con especificidad, altos rendimientos y disminución de los residuos.

## 2. OBJETIVOS

Por todo esto, centraremos el objetivo de este trabajo en la revisión de los procesos de síntesis enzimática de prebióticos con sus pros y contras. Además de las diferentes estrategias utilizadas tanto a nivel de investigación básica como industrial para fabricarlos.

## 3. METODOLOGÍA

Para este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en las bases de datos Pubmed, Scielo, Scopus y Google Scholar. Además se han utilizado libros especializados en los temas a tratar. A través de estos, se ha obtenido toda la información necesaria para realizar la revisión.

## 4. INTRODUCCIÓN

Los hidratos de carbono son moléculas que se clasifican atendiendo a su tamaño molecular o grado de polimerización en: monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Así mismo, se pueden subdividir en digestibles y no digestibles (1). Los oligosacáridos no digestibles (NDOs) son los que demuestran actividad prebiótica, en general y se pueden obtener por diferentes métodos (2).

Los NDOs son fermentados por la microbiota intestinal favoreciendo un crecimiento selectivo de bacterias beneficiosas (bifidobacterias y lactobacilos), estas generan ácidos grasos de cadena corta (*small chain fatty acids*, SCFA) que reportan efectos beneficiosos para la salud. Los SCFA disminuyen el pH intestinal, protegiéndolo de bacterias perniciosas sensibles a medios ligeramente ácidos. Dentro de los SCFA, el butirato ha demostrado proteger al individuo frente al cáncer de colon (3).

Por lo tanto, todos los prebióticos demuestran unas características comunes, que son:

1. No se digieren ni se absorben en los primeros tramos del intestino (3).
2. Son el sustrato para una variedad reducida y específica de microorganismos beneficiosos para el huésped (3).
3. Estimulan específicamente el crecimiento de las cepas favorables para la salud (3).

4. Son compuestos con actividad reguladora en la composición de la microbiota intestinal (3).

Los NDOs pueden ser obtenidos de diferentes orígenes naturales como microalgas marinas, algas y agro-alimentos convencionales, siendo estas fuentes sostenibles y de escaso coste (5).

#### 5. EVOLUCIÓN DEL TÉRMINO: “PREBIÓTICO”

Este conjunto de moléculas han generado gran interés por todas las propiedades beneficiosas que han demostrado poseer. Este interés viene de ámbitos tan variados como la nutrición, la medicina y la industria alimentaria. A lo largo de estos años, expertos en el tema han intentado definir este concepto, con el objetivo de atribuirle todas sus características. Debido a la no unanimidad en la definición, esta ha ido evolucionando con los años, existiendo a día de hoy, aún el debate (13).

En 1995, Gibson y Roberfroid propusieron la primera definición: *“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”* (13).

En 2004, Gibson y col. revisaron el concepto y lo modificaron a: *“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”*. En esta definición, se hace hincapié en tres características que debía contener un prebiótico. La primera, la capacidad de resistir la digestión del hospedador (acidez estomacal, hidrólisis enzimática y absorción intestinal); la segunda, ser fermentados selectivamente por microorganismos intestinales y la tercera, ser capaces de estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales que están correlacionadas con la salud y bienestar (13).

Posteriormente Roberfroid y col. ampliaron el concepto a: *“son ingredientes que producen una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad(es) de uno o de un limitado número de géneros/especies de microorganismos en la microbiota intestinal confiriendo beneficios para la salud del hospedador”* (13).

En 2008, la Food and Drug Organisation (FAO) definió los prebióticos como: *“ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo”* (13).

Por último, la World Gastroenterology Organisation (WGO) asumió que los prebióticos eran: *“sustancias de la dieta (fundamentalmente polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos no digeribles por enzimas humanas) que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas”* (13).

En definitiva, llegar a un consenso de una definición permite acotar el concepto y encuadrar a las moléculas de forma sencilla dentro de su grupo. Así tenemos que los principales grupos de prebióticos son: Fructooligosacáridos y galactooligosacáridos, a los cuales se añadirán los prebióticos de nueva generación o emergentes, que se comentará más adelante.

## 6. ENZIMAS ÚTILES EN LA SÍNTESIS DE PREBIÓTICOS

Existe gran variedad de enzimas que se encuentran implicadas en la síntesis de prebióticos, a destacar, glucosidasas, galactosidasas, fructofuranosidasas, quitinasas, entre otras. Todas ellas presentan una característica en común que las hace clave en la síntesis de prebióticos, la promiscuidad de acción; esto es, todas ellas son enzimas que de forma nativa tienen acción hidrolítica, pero bajo determinadas condiciones del medio, como son el pH, la temperatura, la inmovilización, la concentración de sustrato aceptor y donador, etc, la enzima es capaz de adquirir la acción opuesta a la hidrólisis, esta es, la síntesis.

La inmovilización es una de las principales estrategias para aumentar el rendimiento del proceso. A continuación, se hará hincapié en diferentes métodos de trabajo con enzimas libres e inmovilizadas, centrando las ventajas y desventajas de cada uno.

### 6.1. Células enteras

El principal motivo para usar células enteras en vez de enzimas purificadas es el bajo coste, evitando el proceso de purificación o síntesis de la enzima. Además, la propia célula confiere estabilidad a la enzima, regenerando coenzimas, cofactores, etc, en el caso de necesitarlos y otros posibles sustratos necesarios en la bioactividad de la enzima.

En contraposición, la membrana celular puede suponer un problema de permeabilidad tanto para la entrada de sustrato como para la salida de producto. Esto se solventa con procesos de permeabilización celular (7,8).

Un ejemplo es la síntesis de una mezcla de galactooligosacáridos partiendo de lactosa como sustrato, en el que células de *Bifidobacterium bifidum* a 39º y pH 6,8 produjeron, tras 1,5 horas fermentando, una cantidad de GOS de 99 mg/ml de los cuales: 25% fue disacárido, 35% trisacárido, 25% tetrasacárido y 15% pentasacárido (9).

### 6.2. Enzima purificada

Presentan desventajas frente a las células enteras como una menor estabilidad y un mayor coste. En cambio, no necesitan el proceso de permeabilización y el producto se obtiene directamente en el medio de reacción.

Ya que la principal desventaja de este método es la estabilidad, se subsana por medio del proceso denominado **inmovilización**, el cual se basa en la adhesión de la enzima por medios físicos o químicos a un soporte inerte (10).

#### 6.2.1. Métodos de inmovilización por retención física

Dentro de estos métodos encontramos la **adsorción** y el **atrapamiento** como sus principales representantes. Los métodos físicos son a menudo menos costosos y no producen un cambio químico en la enzima (10).

##### 6.2.1.1 Adsorción

Se establece entre un soporte inerte y la enzima mediante interacciones tales como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, iónicas e incluso de quelación. Hay factores que influyen directamente en este proceso como son:

- El pH del medio, ya que determinará las cargas tanto del soporte como de la enzima.
- La fuerza iónica, nos permitirá la desorción de la enzima al soporte. Esto es debido a que los iones se unen con una mayor fuerza al soporte que la enzima.

Entre los inconvenientes que muestra la adsorción se encuentran los siguientes: a menudo resulta complicado el control de las variables que permiten la optimización del proceso, además debido a que la unión del complejo soporte-enzima es reversible, los derivados obtenidos son poco estables (10).

#### 6.2.1.2 Atrapamiento

Este proceso consiste en la retención física de la enzima en el interior de liposomas/micelas (membranas semipermeables), matrices porosas o geles (como geles de poliacrilamida, resinas de poliuretano, alginato, quitosano, etc.) El proceso es diferente según si se quiere encapsular a la enzima o atraparla en una matriz (10).

El tamaño de las microcápsulas está comprendido entre 1 y 100  $\mu\text{m}$  y su membrana solo permite la transferencia de sustrato y producto, nunca de enzima (10).

El principal inconveniente es que se necesita una concentración alta de enzima en la disolución (10 mg/L aproximadamente), pero a su favor, se pueden encapsular simultáneamente varias enzimas para reacciones más complejas (10).

Para llevar a cabo el atrapamiento en la matriz se suspende la enzima en una solución en la que el monómero se encuentra disuelto. A continuación se procede a la polimerización que dependiendo del tipo de polímero puede ser por medio de un cambio de temperatura, pH o incluso la adición de un reactivo determinado. Es un proceso sencillo y reproducible, el único punto vital es comprobar que las condiciones del proceso no son incompatibles con la naturaleza enzimática y controlar el tamaño del poro, que debe ser al menos dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima (10).

#### 6.2.2. Métodos de inmovilización por unión química

Aquí los representantes son la unión covalente simple y el *cross-linking* o entrecruzamiento. Los métodos químicos son más costosos pero mucho más estables que los físicos (10).

##### 6.2.2.1 Unión covalente simple

Dentro de los métodos químicos es el más antiguo y más experimentado, por lo tanto está muy optimizado. Existen gran variedad de soportes, orgánicos, inorgánicos, cada uno con unas características de reacción específicas y al igual que en el atrapamiento, estas condiciones deben ser compatibles con la enzima en cuestión. Además en este método se necesita tener en cuenta la estructura de la enzima y es necesario conocer bien el centro de reacción, ya que puede ser inactivado en la unión al soporte. Para evitar esto, se puede añadir un sustrato que se una al centro activo, bloqueándolo (inhibidor competitivo).

La unión de la enzima al soporte se lleva a cabo mediante un ataque nucleofílico de determinados aminoácidos de la superficie de la enzima, principalmente lisina y cisteína aunque pueden ser otros, sobre grupos electrófilos, previamente activados, del soporte (10).

Este método tiene como ventajas:

- Sencillez (10)
- La enzima inmovilizada permanece constante a lo largo del tiempo (10)
- El complejo soporte-enzima puede usarse en reactores de todo tipo, en continuo, lechos fluidos, etc (10)
- Mayor resistencia general de la enzima, a la temperatura y al pH. Esto es debido a que su estructura terciaria se encuentra estabilizada por las uniones al soporte (10)

Pero como ya se ha explicado, es necesario un gran conocimiento de la estructura de la enzima, tanto a nivel del centro activo como a nivel de los aminoácidos superficiales que

formarán los enlaces con el soporte. Sin este conocimiento, la inactivación por distorsión de la estructura terciaria es probable (10).

#### 6.2.2.2 Cross-linking o entrecruzamiento

En este método, la enzima es el propio soporte, para que esto sea posible se utilizan reactivos bifuncionales que generan puentes intermoleculares (entre enzimas). El agente más utilizado, encargado de esta acción es el **glutaraldehído**, el cual hace de doble electrófilo para los aminoácidos nucleófilos superficiales de dos enzimas (10).

### 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los prebióticos se encuentran divididos en dos grandes grupos: aquellos que ya han demostrado su acción serían los que denominaremos **clásicos** y son: oligómeros de fructosa basados en la inulina, los galactooligosacáridos (GOSs) y la lactulosa, mientras que los fuco-, quito-, gentio-, xilo-, entre otros, forman parte de los prebióticos **emergentes**. Existen otros con grandes aplicaciones prebióticas como la maltodextrina, rafinosa, arabinosa, los arabinosilanos y alcoholes de azúcares (manitol y sorbitol) (4).

#### 7.1 PREBIÓTICOS CLÁSICOS

##### FRUCTOOLIGOSACARIDOS (FOS)

Conforma uno de los grupos prebióticos más explorados y, por lo tanto, con mejor conocimiento de sus beneficios para la salud. Entre otros, ayuda a reducir los niveles de colesterol y mejora la absorción de algunos minerales como  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$

La estructura de los FOS se compone de una serie de moléculas de fructosa (2-60) unidas por enlaces  $\beta$  (2-1) o  $\beta$  (2-6) seguidas siempre de una glucosa terminal, así tenemos moléculas relativamente simples como la 1-kestosa (2 fructosas + 1 glucosa), la nistosa (3 fructosas + 1 glucosa) y la fructosilnistosa (4 fructosas + 1 glucosa) (11).

Existen diferentes tipos de FOS, destacamos los inulin-FOS ( $^1F$ -FOS), los levan-FOS ( $^6F$ -FOS) y los neo-FOS ( $^6G$ -FOS). La diferencia entre las clases es el tipo de enlace que une las unidades monosacáridicas de fructosa. Si bien los enlaces  $\beta$  (2-1) dan lugar a los inulin-FOS y los  $\beta$  (2-6) a los levan-FOS, la estructura de los neo-FOS es más compleja, debido a que los enlaces que unen la glucosa y la fructosa no son lineales, esto da lugar a un número mayor de posibilidades para elongar la cadena lineal de fructosa en ambas direcciones:  $\beta$  (2-1) y  $\beta$  (2-6). Los neo-FOS tienen mayor efecto prebiótico y mayor estabilidad que los otros tipos, dentro de los neo-FOS encontramos neo-kestosa, neo-nistosa y neo-fructosilnistosa (11).

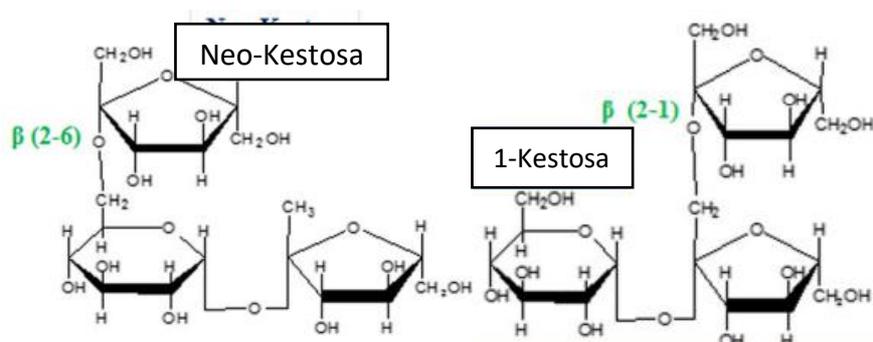


Figura 1. Estructura química de la neo-kestosa y la 1-kestosa

La síntesis de este grupo de compuestos mediante enzimas presenta beneficios en tiempo y coste, lo que las hace idóneas para esta tarea. Existen diferentes métodos para la síntesis y se comentarán más específicamente a continuación:

- Utilizando sacarosa como sustrato

La **sacarosa** o también conocida como sucrosa, es un disacárido compuesto por dos monosacáridos: glucosa y fructosa.

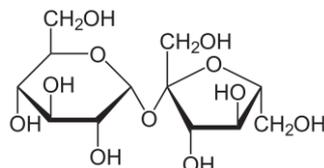


Figura 2. Estructura química de la sacarosa (22)

Las enzimas que se encargan de catalizar la reacción biosintética de FOSs utilizando sacarosa como sustrato se denominan **fructosil-transferasas** (FTasa) o **fructofuranosidasas** (11).

La reacción catalizada se basa en la transfructosilación de la sacarosa, para ello la sacarosa tiene que ser hidrolizada y una fructosa es transferida a un aceptor que puede ser la propia sacarosa u otro fructooligosacárido. La FTasa hidroliza en enlace  $\alpha$  (1-2) de la sucrosa y sintetiza enlaces  $\beta$  (2-1) o  $\beta$  (2-6) que dan lugar a los FOSs.

La naturaleza de los FOS, depende tanto de la enzima sintetizadora como de las condiciones de reacción: temperatura, pH, líquidos iónicos, etc (11).

Las fructosil-transferasas se pueden obtener de plantas, bacterias y hongos. Dependiendo de la fuente darán lugar a un tipo u otro de fructooligosacáridos (11).

Una enzima proveniente del Reino Plantae es la fructan:fructan 6-glucose-fructosil-transferasa (G6 -FFT) encargada de producir neo-fructanos. Para ello, transfiere una molécula de glucosa a una de fructosa a través de enlaces  $\beta$  (2-6) (12).

- Utilizando levano como sustrato

El **levano** es un polímero de la D-fructosa con enlaces  $\beta$  (2-6). Las enzimas que se encargan de sintetizar los FOS se denominan **levanasas** y son altamente específicas para el levano.

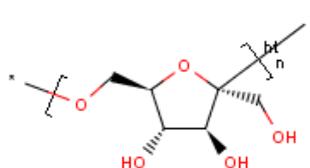


Figura 3. Estructura química del levano

Han sido aisladas multitud de levanasas del Reino Bacteria. Destacamos la endolevanasa proveniente de *B. subtilis* 168, la cual muestra un alto nivel de especificidad por los enlaces  $\beta$  (2-6) (11).

- Utilizando inulina como sustrato

La **inulina**, más que una molécula es un grupo heterogéneo de moléculas que comparten una estructura común.

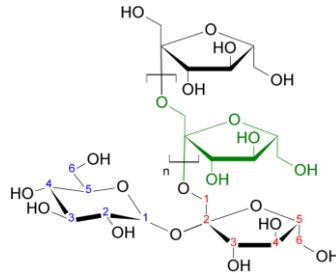


Figura 4. Estructura química de la inulina (23)

Químicamente, este grupo está formado por una sucesión de unidades monosacáridicas de fructosa unidas por enlace  $\beta$  (2-1) y acabadas en una molécula de glucosa unida por un enlace  $\alpha$  (1-2) (11).

Las enzimas encargadas de escindir los enlaces  $\beta$  (2-1) de la inulina, se denominan **inulinasas**. Dentro de estas, se reconocen dos tipos: las exoinulinasas y las endoinulinasas. Las primeras, se encargan de liberar la fructosa terminal y tienen uso en la industria alimentaria (más específicamente en la fabricación de sirope). Las segundas, son las que tienen interés en la síntesis de prebióticos, ya que hidrolizan los enlaces  $\beta$  (2-1) de las fructosas internas, dando lugar a una variedad amplia de moléculas como la inulotriosa (F3), inulotetrosa (F4), inulopentosa (F5), etc. Se han reportado multitud de organismos que contienen estas enzimas como bacterias, hongos y levaduras (11).

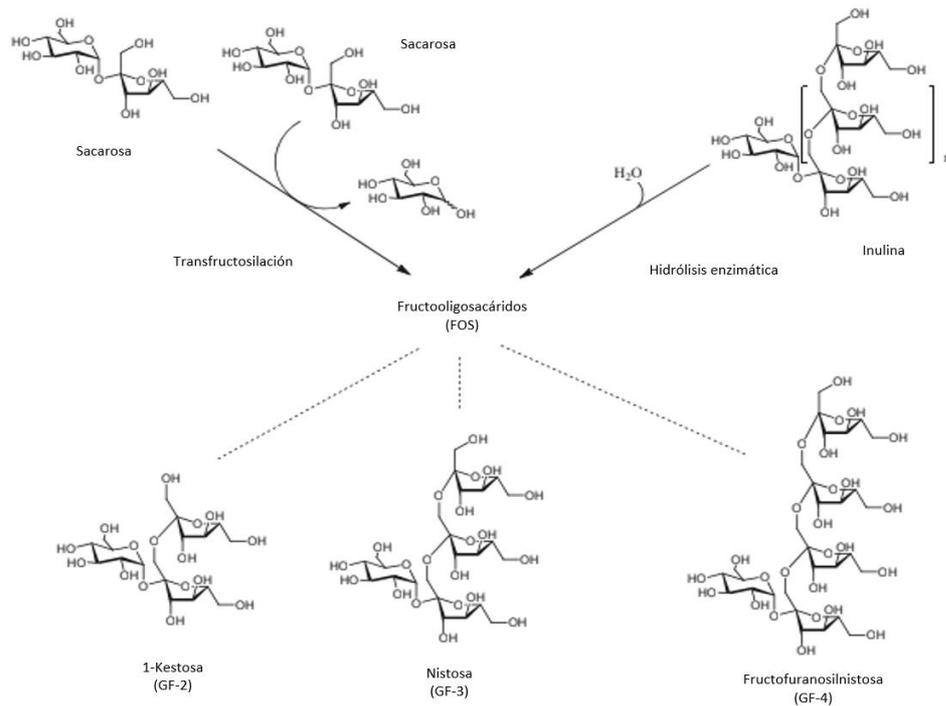


Figura 5. Proceso de transfructosilación a partir de sacarosa e inulina (19)

### Aplicaciones de los FOSs

Los fructooligosacáridos son conocidos como el sustrato preferente de los probióticos. Entre sus beneficios para la salud encontramos crecimiento selectivo de bacterias no patógenas, además han demostrado disminuir la colonización por *Clostridium difficile*, disminuyendo el riesgo de diarreas asociadas. En combinación con GOS se han investigado para controlar los síntomas de los infantes fenilcetonúricos.

El consumo regular de estas moléculas reduce la liberación de carcinógenos, debido a las  $\beta$ -glucuronidasas intestinales, reduciendo así la incidencia de cáncer de colon (11).

Actualmente, son usados en la industria alimentaria ya que presentan características similares a la sacarosa, con un 30% menos de dulzor y mayor capacidad de retención hídrica, por esto se usan en productos sin azúcares añadidos como helados, yogures y productos de panadería (11).

Por último, debido al aumento de producción de ácidos grasos de cadena corta se acidifica el lumen intestinal dando lugar a un aumento de la biodisponibilidad de ciertos minerales como el calcio, que favorece la densificación ósea y por otro lado disminuye la supervivencia de la flora patógena (11).

### GALACTOOLIGOSACÁRIDOS (GOS)

Los galactooligosacáridos (GOS) son carbohidratos sintetizados a partir de la lactosa y compuestos de 2 a 8 unidades monosacáridicas. Los enlaces  $\beta$  (1-3) y  $\beta$  (1-4) que unen los residuos hacen este grupo de moléculas no digeribles para el ser humano, ya que las enzimas propias del tracto digestivo son específicas hacia enlaces  $\alpha$ . Por esto, los GOS son aprovechados únicamente por las bacterias colónicas, fomentando un crecimiento selectivo de las especies beneficiosas (6).

Para llevar a cabo la síntesis enzimática de un GOS, fundamentalmente se pueden usar dos tipos de enzimas, las glicosil-transferasas y las glicosidasas (hidrolasas). Las ventajas de las glicosidasas es la experiencia de uso y el coste, mientras que las glicosil-transferasas son más específicas, ya que su acción fisiológica es la síntesis.

Para entender la reacción enzimática pondremos el ejemplo de una  $\beta$ -galactosidasa. En principio, la lactosa se une a la enzima y forma el complejo ENZIMA-LACTOSA reversible, este complejo evoluciona hacia el intermedio de reacción (irreversiblemente) liberando el residuo de glucosa. A partir de aquí, el intermedio ENZIMA-GALACTOSA puede seguir dos caminos: el primero y más fisiológico la disociación del complejo y formación de GALACTOSA (hidrólisis); y un segundo camino, la incorporación de una o más moléculas de lactosa formando los GOS (transglicosidación) (6).

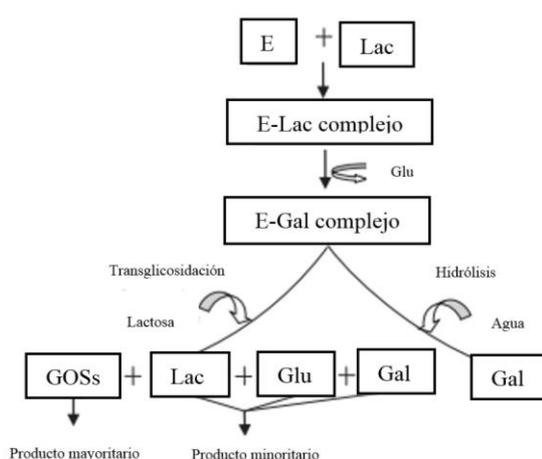


Figura 6. Reacción de hidrólisis y transglicosidación (21)

Se han llevado a cabo muchos estudios con enzimas termoestables para la síntesis de GOS, sin embargo, solo unos pocos estudios han arrojado éxito usando  $\beta$ -galactosidasas recombinantes. Por ejemplo, las obtenidas de *Geobacillus stearothermophilus*, *Pyrococcus*

*furiosus*, *T. maritima* y *Thermus spp.* presentan numerosas ventajas frente a las enzimas nativas, en cuanto a facilidad de purificación, producción a gran escala, incrementos de actividad, etc. (15).

Existe gran interés en la síntesis de estos prebióticos por la industria alimentaria, ya que se encuentran en la leche humana y por lo tanto, se convierten en un ingrediente esencial en las leches de fórmula (15).

La leche humana contiene aproximadamente un 1% de oligosacáridos de leche humana (HMO, *human milk oligosaccharides*) siendo el tercer componente más abundante después de la lactosa y la grasa. Se calcula que la proporción de GOS y FOS es de 9:1 en la leche humana, ayudando al infante a construir una microflora sana y evitando así infecciones gastrointestinales (15).

### Beneficios de los GOS

Debido a que los GOS, junto a los FOS, son los oligosacáridos no digeribles más estudiados, son los que agrupan mayores beneficios reconocidos. Estos beneficios son el resultado de dos posibles mecanismos de acción. El primero se basa en la promoción de la proliferación selectiva de los géneros *bifidobacterium* (bifidogénesis) y *lactobacillus*; este hecho tiene repercusiones positivas que hablaremos más específicamente. En el segundo mecanismo de acción está implicada la producción de SCFA (*short chain fatty acids*), los cuales muestra correlación con efectos beneficiosos que se mostrarán a continuación (15).

- Modulación de la microflora  
Como se ha mencionado anteriormente, la bifidogénesis es el proceso por el que se estimula el crecimiento selectivo del género *bifidobacterium*, el cual es considerado el género dominante en la microflora del infante alimentado con leche humana. Esto difiere de los neonatos alimentados con leche de vaca o de fórmula (sin prebióticos añadidos), en los cuales es habitual encontrar, entre la microbiota, *clostridium* y *enterococco* y otras moléculas perjudiciales como aminas, amonio y fenoles (15).
- Modulación del sistema inmune  
Una gran parte del sistema inmune se encuentra alojado en el tracto gastrointestinal, donde interacciona directamente con la microflora colónica. El butirato (SCFA) parece ser el principal protagonista en esta acción, ya que es capaz de servir como nutriente básico de los colonocitos e inducir la apoptosis en colonocitos malignizados, además inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ), incrementa la producción de IL-10 (citoquina antiinflamatoria) y mejora la actividad de las células NK (15).
- Alergia  
Se ha notificado un aumento de la incidencia de alergias en las últimas tres décadas existe, al parecer, una relación con la microbiota intestinal. La dermatitis atópica es un signo temprano de infantes propensos a padecer alergias alimentarias  
Un estudio en el que se proporcionó a infantes con riesgo de atopía una mezcla de GOS y FOS (9:1) además de 4 cepas de bacterias probióticas (*L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *Bif. breve* BB99, *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* JS) demostró una disminución de enfermedades relacionadas con la inmunoglobulina E, tales como alergias, eccemas y atopias (15).
- Actividad antipatógena

Algunos estudios han demostrado la acción antipatógena de los GOS, ya que inhiben la infección e inflamación del tracto gastrointestinal. Para ello, son capaces de impedir la adhesión de las bacterias patógenas o de sus toxinas al epitelio intestinal. Los GOS tienen estructuras similares a las que usan las bacterias para adherirse al epitelio GI, interfiriendo con estas y ejerciendo así su acción antipatógena.

Los  $\alpha$ -GOS de la leche humana, tienen propiedades antiadhesivas y además son capaces de neutralizar las toxinas. Los  $\beta$ -GOS han demostrado contener actividad antiadhesiva específica para *E. coli* enteropatógena y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (15).

### Ventajas funcionales de los GOS

Debido al incremento del uso de GOS como aditivos funcionales, se hace necesario resaltar sus ventajas competitivas con los otros prebióticos.

1. Los galactooligosacáridos son 100% solubles en agua y se disuelven bien en leche, sin aportar viscosidad a la mezcla (15).
2. El sabor de los galactooligosacáridos es neutro o ligeramente dulce y no interfiere con la textura (15).
3. La estabilidad a pHs bajos de los GOS es remarcable, siendo estable a pH 2 y 37°C varios meses (15).
4. Son estables también frente a temperaturas altas, esto es debido a sus enlaces  $\beta$
5. No son hidrolizados ni por el pH ácido estomacal, ni por enzimas pancreáticas. Por esto, tienen un índice glucémico y calórico muy bajo. Les hace adecuados en dietas hipocalóricas y bajas en glucosa (15).

## 7.2 PREBIÓTICOS EMERGENTES

### FUCOSILOLIGOSACÁRIDOS (FucOS)

La fucosilación es un tipo de glicosilación, donde la **fucosa** es añadida a *N*-glicanos, *O*-glicanos o glicolípidos. La fucosilación está implicada en procesos patológicos que incluyen el sistema inmune inducido por inflamación o cáncer. Estos prebióticos se encuentran principalmente en la leche materna y se incluyen dentro del grupo de oligosacáridos de la leche humana (HMO, *human milk oligosaccharides*) (14).

Efectos beneficiosos

- Prevención de la diarrea infantil, para ello actúan como receptor homólogo inhibiendo la adhesión de microorganismos enteropatógenos como *E. coli*, *V. cholerae* y *Salmonella fytis*, al epitelio intestinal (14).
- Se ha comprobado que FucOS, como la 2'-fucosil-lactosa y la 2'-fucosilgalactosa están relacionados con la modulación neuronal potenciando a largo plazo la memoria (14).

### Reacciones de síntesis de FucOS

La enzima que cataliza la síntesis de los fucosiloligosacáridos se denomina  $\alpha$ -1,2Fucosiltransferasa (FucT2) y se puede obtener de diversos microorganismos como *Helicobacter pylori*, *E. coli* BL21, entre otros. La reacción catalizada consta de la hidrólisis de la fucosa de la molécula donadora (GDP-L-fucose) y posterior transferencia a la molécula aceptora (galactosa, glucosa, lactosa, celobiosa y agarobiosa) (14).

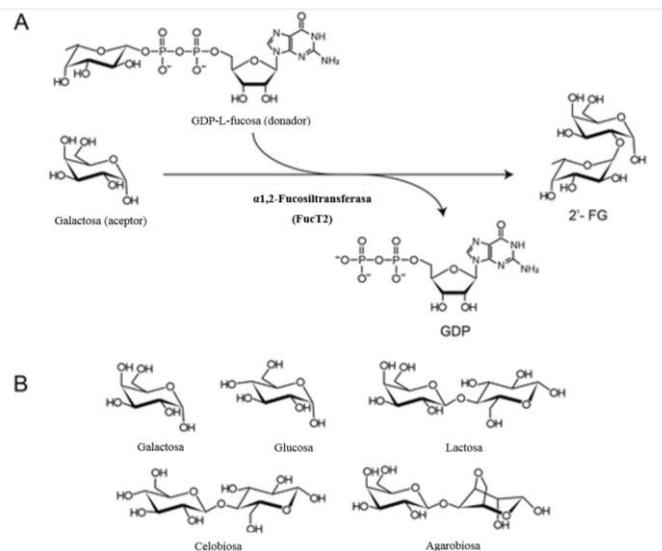


Figura 7. (A)Reacción enzimática de la síntesis de 2'-fucosilgalactosa mediante FucT2, usando galactosa como molécula aceptora y GDP-L-fucosa como molécula donadora. (B)Estructura química de algunas de las posibles moléculas aceptoras que son reconocidas por FucT2. (14)

### XILOOLIGOSACARIDOS (XOS)

El **xilano** es el polímero de tipo hemicelulosa (heteropolisacárido formado por cadenas polisacáridicas que están a su vez conformadas por un único tipo de monosacárido) más común en nuestro planeta. Representa un tercio del carbón orgánico renovable, convirtiéndole en un perfecto candidato para ser una fuente asequible de materia orgánica (16).

El xilano tiene un esqueleto constituido por  $\beta$ -D-xilopiranosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 dentro del Reino vegetal terrestre, aunque podemos encontrar enlaces  $\beta$ -1,3 en ecosistemas marinos (16). A menudo, aparecen sustituyentes de tipo muy variado: ácido glucurónico, arabinosas, rhamnosas, galactosas, etc. Estos sustituyentes hacen que exista una gran variedad de xilanos y el conocimiento de ellos nos permite un mayor control para su posterior uso. La fuente principal de los xilanos es la biomasa y actualmente, existe un interés especial para el uso de la mayor parte de sustancias obtenidas de esta, aumentando así su productividad y los xilanos como prebióticos pueden ser un ejemplo de esto (17).

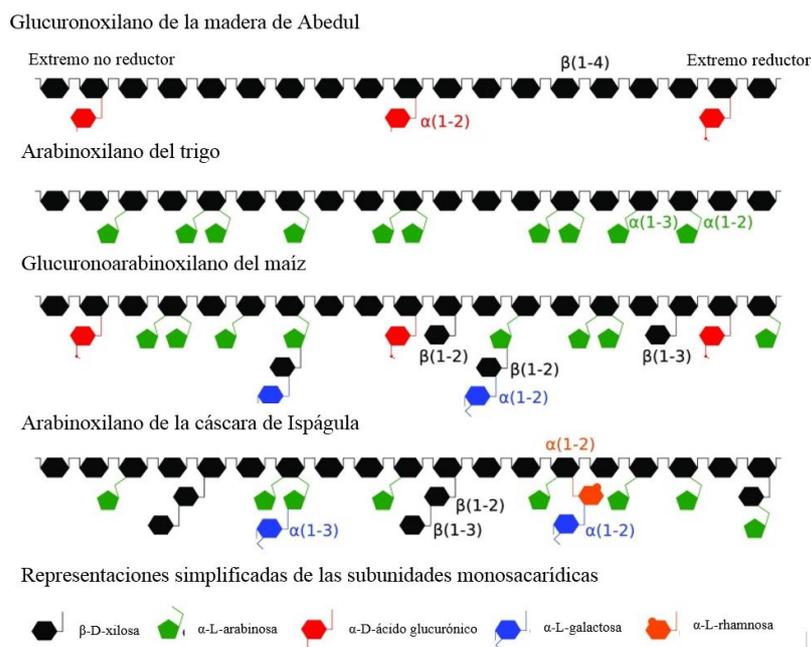


Figura 8. Representación de las estructuras de los principales xilanos con los sustituyentes más habituales. (17)

Las enzimas encargadas de hidrolizar el esqueleto carbonatado se denominan **xilanasas** y pueden tener tanto actividad endo (capaces de hidrolizar en el interior del polisacárido) como exo (hidrolizan en el exterior) (16).

#### Adaptación enzimática y estabilidad

Ya hemos comentado anteriormente que la estabilidad enzimática es un parámetro muy importante a tener en cuenta. Al tener estructura proteica, cabe la posibilidad de que la molécula se desnaturalice. Posibles estímulos desnaturalizantes son principalmente la temperatura y el pH, por lo tanto encontrar enzimas adaptadas a medios ácidos/alcalinos o que sean termoestables es un gran avance a nivel industrial por facilitar el proceso.

Los xilanos son moléculas poco solubles en agua y un aumento de la temperatura de reacción aumenta la solubilidad de estos y facilita la interacción enzima-sustrato. Para esto, muchas xilanasas termoestables han sido estudiadas y utilizadas, como por ejemplo, la rXynA recombinante de *Bacillus subtilis* cepa 168 o TfGH11 de *Thermobifida fusca*. Estas enzimas son ricas en residuos hidrofóbicos y se cree que su termoestabilidad está directamente relacionada con estas fuerzas hidrofóbicas. En otros ejemplos es debido a un gran número de puentes disulfuro que estabilizan la estructura incluso a altas temperaturas. Si bien, las explicaciones son muy variadas, tanto como la procedencia de las enzimas y su estructura química (16).

Por supuesto otra forma de estabilizar las enzimas tiene relación con la inmovilización de estas, como se comentó en la introducción. Por ejemplo, la inmovilización de la xilanasas de *Aspergillus versicolor* por medio de enlace covalente en un derivado de la agarosa (glioxil-agarosa) aumento su estabilidad (factor de estabilidad de 240 en comparación a la enzima soluble) y el rendimiento en un 18% (16).

## QUITOOLIGOSACARIDOS (COS)

La **quitina** es el polisacárido, después de la celulosa, más abundante en la naturaleza. Está compuesto por unidades de *N*-acetilglucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -1,4. Se encuentra principalmente en el exoesqueleto de crustáceos e insectos y en la pared celular de hongos. Existen tres polimorfos de la quitina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) que difieren en el grado de hidratación y en el tamaño (18).

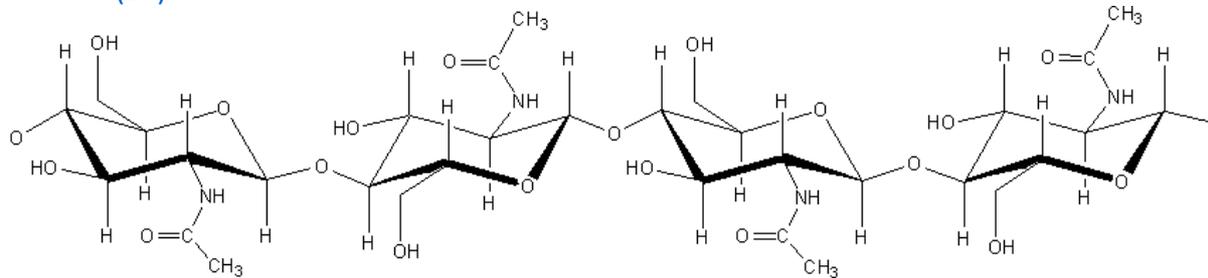


Figura 10. Estructura química de la quitina (20)

El interés en este grupo de moléculas surge de una idea similar a los XOS, la conversión de un producto de desecho (conchas y exoesqueletos de productos marinos) en un producto de valor que puede ser utilizado en numerosas industrias como industria alimentaria, ingeniería tisular (debido a que es un producto biocompatible), nanotecnología, etc. Además la quitina es utilizada como fuente de glucosamina, medicamento de uso humano para el tratamiento del dolor articular en dolencias como la osteoartritis.

El principal inconveniente de la quitina es su insolubilidad en agua. Este problema se subsana con sus derivados (18).

El tratamiento de la quitina con un medio básico, deriva en un subproducto parcialmente deacetilado denominado **quitosano**. Este derivado está constituido por unidades de *N*-acetilglucosamina y *N*-glucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 y mantiene la insolubilidad en agua, pero es soluble en disoluciones acuosas de ácidos orgánicos (vía formación de la sal soluble). Al contrario que la quitina, el quitosano es un producto infrecuentemente encontrado en la naturaleza, sólo puede ser hallado en la pared celular de algunos hongos como los de la clase *Zygomycetes* (18).

Los enlaces glicosídicos que se encuentran en el quitosano son bastante débiles y pueden ser degradados fácilmente, dando lugar a oligómeros de quitosano que denominamos **quitoligosacáridos (COS)**. Estos derivados del quitosano tienen la misma estructura que su predecesor pero con un grado de polimerización menor a 20 y un peso medio menor a 3,9 kDa, además son solubles en agua. Estos COS pueden ser aplicados en un gran abanico de campos: medicina, cosmética, agricultura y alimentación, entre otros (18).

Existen diferentes métodos de síntesis de COS, destacando los métodos físicos, como los ultrasonidos o los rayos gamma, los métodos químicos, como la hidrólisis ácida y los métodos enzimáticos, en los que nos centraremos en el siguiente apartado (18).

### Síntesis enzimática de COS

La síntesis enzimática puede ser mediada por diferentes tipos de enzimas, a saber, quitinasas y quitosanasas. La síntesis enzimática presenta unas cuantas ventajas que la hace sutilmente ventajosa como método de síntesis frente a la síntesis clásica. Entre estos, destacamos la especificidad de la hidrólisis y por lo tanto reproducibilidad del proceso, además los métodos enzimáticos son más suaves que los químicos/físicos, generando menos residuos, controlando el peso molecular obtenido y el grado de polimerización del producto (18).

### Efecto prebiótico

Los COS con un grado de polimerización de 2-8 y un peso molecular menor a 1,5 kDa reúnen todas las características de un prebiótico: no es hidrolizado por las enzimas humanas, es capaz de llegar hasta el colón donde se encuentra la mayor parte de la microbiota intestinal y es degradado por estas, fomentando el crecimiento selectivo de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (18).

## 8. CONCLUSIONES

Los prebióticos son ingredientes funcionales con múltiples **beneficios en la salud humana**: sistema inmune, sistema gastrointestinal, biodisponibilidad mineral, entre otros. La experiencia de uso ha evidenciado su seguridad y su utilidad en diferentes etapas vitales del ser humano, como en la lactancia artificial y en algunos procesos infecciosos, principalmente.

Además, llegar a una **definición unánime** ha resultado ser un punto de interés por parte de la comunidad científica y expertos en el tema, ya que, gracias a ella, se permite globalizar y unificar el conocimiento de este campo; siendo capaces así de clasificar correctamente moléculas dentro de esta categoría.

Los **métodos de inmovilización** de enzimas han demostrado ser prometedores en gran parte de procesos biocatalíticos, mostrando especial importancia la unión covalente a un soporte que nos permita recuperar y reutilizar la enzima, además de ser capaces de unir gran cantidad de enzimas a un mismo soporte.

Por último, destacar la importancia de la **sostenibilidad** que nuestro planeta exige, los prebióticos emergentes o de nueva generación arrojan numerosas ventajas relacionadas con este concepto. El hecho de ser capaces de convertir la biomasa en productos útiles y rentables y aplicarlos a numerosos campos, como la medicina, biomedicina, nutrición, cosmética, nos permite avanzar hacia ese concepto de sostenibilidad y química verde, que tan necesarios son en la actualidad.

Existe gran variedad de prebióticos y a medida que avanza el conocimiento de microorganismos, enzimas, diferentes sustratos potenciales, seremos capaces de sintetizar prebióticos de forma más rápida, barata y en consecuencia, más eficiente.

Este trabajo ha querido poner de manifiesto, las características básicas de los prebióticos, sus efectos beneficiosos en la salud humana y además hacer un repaso por los grupos de prebióticos con más experiencia de uso (clásicos) y algunos otros que, de cara al futuro, parecen ser prometedores (emergentes).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mussatto SI, Mancilha IM. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2007;68(3):587-597. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861706006151>. doi: 10.1016/j.carbpol.2006.12.011.
2. Talens-Perales, D., Polaina, J. and Marín-Navarro, J. (2016). Enzyme Engineering for Oligosaccharide Biosynthesis. *Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology*, pp.9-31.
3. Hutkins RW, Krumbeck JA, Bindels LB, Cani PD, Fahey G, Goh YJ, Hamaker B, Martens EC, Mills DA, Rastal RA, Vaughan E, Sanders ME (2016) Prebiotics: why definitions matter. *Curr Opin Biotechnol* 37:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.001>
4. Blatchford P, Ansell J, de Godoy MRC, Fahey G, Garcia-Mazcorro JF, Gibson GR, Goh YJ, Hotchkiss AT, Hutkins R, LaCroix C, Rastall RA, Reimer RA, Schoterman M, Van Sinderen D, Venema K, Whelan K (2013) Prebiotic mechanisms, functions and applications: a review. *Int J Probiotics Prebiotics* 8:109–132
5. Moreno FJ, Corzo N, Montilla A, Villamiel M, Olano A (2017) Current state and latest advances in the concept, production and functionality of prebiotic oligosaccharides. *Curr Opin Food Sci* 13:50–55. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.009>
6. G.R. Gibson, B. Rabiou, C.E. Rycroft, R.A. Rastall, Trans-galactooligosaccharides as prebiotics, in: C. Shortt, J. O'Brien (Eds.), *Handbook of Functional Dairy Products*, CRC Press, New York 2003, pp. 91–108.
7. S. Chockchaisawasdee, V.I. Athanasopoulos, K. Niranjana, R.A. Rastall, Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* 89 (2004) 434–443.
8. S. Kumari, P.S. Panesar, M.B. Bera, R. Panesar, Permeabilization of newly isolated *Kluyveromyces* sp. for the preparation of whole cell biocatalysts with  $\beta$ -galactosidase activity, *Int. J. Food Nutr. Sci.* 2 (1) (2013) 22–26.
9. G. Tzortzis, A.K. Goulas, G.R. Gibson, Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 (2005) 412–416.
10. Martín Brieva, H. (2018). *Fundamentos de biotecnología farmacéutica*. Madrid: Dextra Editorial, pp.307-312.
11. Singh, S., Jadaun, J., Narnoliya, L. and Pandey, A. (2017). Prebiotic Oligosaccharides: Special Focus on Fructooligosaccharides, Its Biosynthesis and Bioactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(2), pp.613-635.
12. Rastall, B. and Gibson, G. (2006). *Prebiotics*. New York, NY: John Wiley & Sons, pp.29-55.
13. Gibson, G., Hutkins, R., Sanders, M., Prescott, S., Reimer, R., & Salminen, S. et al. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75
14. Yun, E., Liu, J., Lee, J., Kwak, S., Yu, S., Kim, K., & Jin, Y. (2019). Biosynthetic Routes for Producing Various Fucosyl-Oligosaccharides. *ACS Synthetic Biology*, 8(2), 415-424. doi: 10.1021/acssynbio.8b00436
15. Sangwan, V., Tomar, S., Singh, R., Singh, A., & Ali, B. (2011). Galactooligosaccharides: Novel Components of Designer Foods. *Journal Of Food Science*, 76(4), R103-R111. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02131.x
16. Linares-Pasten, J., Aronsson, A. and Karlsson, E. (2017). Structural Considerations on the Use of Endo-Xylanases for the Production of prebiotic Xylooligosaccharides from Biomass. *Current Protein & Peptide Science*, 19(1).
17. Nordberg Karlsson, E., Schmitz, E., Linares-Pastén, J. and Adlercreutz, P. (2018). Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(21), pp.9081-9088.
18. Liaqat, F. and Eltem, R. (2018). Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*, 184, pp.243-259.
19. Mano, M., Neri-Numa, I., da Silva, J., Paulino, B., Pessoa, M. and Pastore, G. (2017). Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), pp.17-37.
20. Es.wikipedia.org. (2019). *Quitina*. [online] Available at: <https://es.wikipedia.org/wiki/Quitina>
21. Panesar, P., Kaur, R., Singh, R. and Kennedy, J. (2018). Biocatalytic strategies in the production of galacto-oligosaccharides and its global status. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, pp.667-679.
22. Es.wikipedia.org. (2019). *Sacarosa*. [online] Available at: <https://es.wikipedia.org/wiki/Sacarosa>
23. Es.wikipedia.org. (2019). *Inulina*. [online] Available at: <https://es.wikipedia.org/wiki/Inulina>

*Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia y el/la Tutor/a no se hacen responsables de la información contenida en el mismo.*