Nro 6 - Año 2017

ISSN 2525-1597

IDITeC

Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial

REVISTA CIENTÍFICA

UNIVERSIDAD
DE SAN PABLO-T
Tucumán | Argentina

UNIVERSIDAD DE SAN PABLO-T
Tucumán | Argentina

IDITeC

Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial

Revista Científica

Universidad de San Pablo-Tucumán

Tucumán, República Argentina

IDITeC. Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial. Revista Científica.

N°6 – Año 2017

Tucumán, República Argentina.

ISSN 2525-1597

Revista de Investigación Científica

Editorial:
EDUSPT. 24 de Septiembre 476.
4000. San Miguel de Tucumán. Tucumán, Argentina.
Contacto: Informes@uspt.edu.ar
www.uspt.edu.ar

Quedan expresamente prohibidas, sin la autorización correspondiente, la reproducción parcial o total de esta obra, por cualquier medio o procedimiento. El contenido de los trabajos, como así también los permisos para reproducción de figuras y tablas, es responsabilidad de los autores.

© Universidad de San Pablo-Tucumán

Queda hecho el depósito que previene la ley
Impreso en Argentina – Printed in Argentina

ISSN 2525-1597

Octubre de 2017

Autoridades de la Universidad

Presidente de la Fundación para el Desarrollo
Dra. Catalina Lonac

Rector
Dr. Horacio A. Deza

Vicerrector
Dr. Ramiro Albarracín

Secretaria Académica
Mag. Adriana del Valle Pastoriza

Director del Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial
Dr. Federico Pérez Zamora

Director del Instituto de Estudios Sociales, Política y Cultura
Dra. Inés Yamúss

Director del Instituto de Salud y Calidad de Vida
Dra. Marta Valverde

Director del Instituto de Diseño, Estrategia & Creatividad
Arq. Matías Rohmer-Liztmann

Secretaria de Posgrado
Mag. Silvia Martínez

Secretaria Administrativa y Financiera
CPN María Cristina Peralta

Secretario de Control de Gestión
Mag. Juan José Merlo

Secretaria de Extensión y Cultura
Abog. Carolina del Valle López Flores

Secretaria de Investigación, Desarrollo y Cultura
Mag. Carlos Jorge Budeguer

Comité Evaluador:
Mag. Ing. Zoot. Manuela Toranzos de Pérez (Universidad Nacional de Tucumán)
Mag. Ing. Agr. Estela Brandán (Universidad Nacional de Tucumán)
Prof. Esp. D.I. Mario Ivetta
Mag. Ing. Agr. Delicia Fernández de Aráoz (Universidad Nacional de Tucumán)
Dra. Luz Lastres Flores (Editora de la revista Eduacion en la Quimica, de ADEQRA)
Dra. Eugenia Giamminola (Instituto de Ecología y Ambiente Humano- Universidad Nacional de Salta)
Dr. Dariel Cabrera Mederos (Instituto de Patología Vegetal CIAP-INTA)

Comité Editorial:
Carlos Jorge Budeguer
José Molina
Margarita Jaramillo
Natalia Sanchez
Gaspar Contino

UNIVERSIDAD
DE SAN PABLO-T
Tucumán | Argentina

INDICE

PRESENTACIÓN…… 3

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A BILIS EN *LACTOBACILLUS REUTERI*, UNA BACTERIA PROBIÓTICA. Bustos A. Y.; Fadda S.; Font de Valdez G.; Raya R.; Taranto M. P…… 5

ESTUDIO FENOLÓGICO DE ESPECIES AUTÓCTONAS DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA UNIVERSIDAD DE SAN PABLO-TUCUMÁN. Colombo, M.; Ríos, A.; Danert, C…… 21

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA DE BACTERIAS GRADO ALIMENTARIO PARA LA SELECCIÓN DE CEPAS CON FINES PROBIÓTICOS/PREBIÓTICOS. Cuño, G.; Saez, G. D.; Palacios, J. M.; Zárate, G…… 38

ELABORACIÓN DE BIOPLÁSTICO DE ALMIDÓN DE MAÍZ. Viollaz, C; González, K; Ponce, J; Rojas, M; Lisiak, I…….…… 55

UTILIZACIÓN DE ALBEDO DESHIDRATADO DE CITRUS PARA CLARIFICACIÓN DE EFLUENTES. González, K; Juárez C.; Federico, M.L.; Cabezas C..……. 61

PRESENTACIÓN

IDITeC es la Revista de Investigación Científica del *Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial*, de la Universidad de San Pablo-Tucumán (USP-T), cuyo objetivo primordial es promover la investigación entre los docentes de la universidad y difundir los conocimientos generados en el seno de la misma y en otros Centros de Investigación nacionales e internacionales. La temática de esta publicación abarca las áreas de Alimentos, Gestión de Empresas Agropecuarias, Finanzas, Diseño Industrial y Diseño Textil y de Indumentaria.

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A BILIS EN *LACTOBACILLUS REUTERI*, UNA BACTERIA PROBIÓTICA

MECHANISMS INVOLVED IN BILE RESISTANCE IN *LACTOBACILLUS REUTERI*, A PROBIOTIC BACTERIA

BUSTOS A. Y. [a (*)], FADDA S. [b], FONT DE VALDEZ G. [b,c], RAYA R. [b], TARANTO M. P. [b]
[a] Centro de Investigaciones y Transferencia de Santiago del Estero (CITSE-CONICET- UNSE). RN9, km 1125, 4206, Santiago del Estero, Argentina.
[b] Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), Chacabuco 145, T4000ILC San Miguel de Tucumán, Argentina
[c] Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 491, T4000ILC, San Miguel de Tucumán, Argentina
(*) Autor para correspondencia: E-mail: abustos@uspt.edu.ar

RESUMEN

Lactobacillus (L.) reuteri CRL 1098 es una bacteria probiótica de probado efecto hipocolesterolemiante estrechamente relacionado con su actividad hidrolasa de sales biliares (HSB). La capacidad de *L. reuteri* para sobrevivir el pasaje a través del tracto intestinal y resistir los efectos tóxicos de los ácidos biliares (AB) es un factor clave para su función probiótica. El objetivo de este trabajo es revisar los aspectos más relevantes relacionados con la tolerancia a AB en esta cepa probiótica modelo.
Utilizando técnicas fluorescentes se determinó que la acción deletérea de los AB en bacterias lácticas estaría estrechamente relacionada con la disipación de la fuerza protón motriz. La cepa CRL 1098 presentó elevada resistencia a AB siendo sólo sensible a altas concentraciones de ácido deoxicólico (ADC). Mediante estudios proteómicos se identificaron 25 proteínas diferencialmente expresadas cuando *L. reuteri* fue desafiado con ácido glicodeoxicólico (AGDC) y ADC. Se destaca la enzima citosina trifosfato (CTP) sintetasa, involucrada con la reparación del daño oxidativo del ADN y proteínas relacionadas con transcripción y traducción que fueron sobreexpresadas en presencia de AGDC y reprimidas en presencia de ADC, lo que explicaría la mayor toxicidad de este compuesto. Finalmente, se clonó y caracterizó el operón del gen *hsb* de CRL1098, lo que permitirá profundizar su influencia en la reducción de los niveles de colesterol sérico.
Los resultados presentados en este trabajo proponen que los AB inducen una respuesta fisiológica compleja en *L. reuteri* y proporcionan nuevos conocimientos sobre los mecanismos implicados en la tolerancia a bilis en cepas probióticas.

Palabras claves: Probióticos, Resistencia a bilis, Electroforesis bidimensional, Hidrolasa de sales biliares

ABSTRACT

Lactobacillus (L.) reuteri CRL 1098 is a probiotic bacterium with a proven hypocholesterolemic effect, closely related to its bile salt hydrolase activity (BSH). The ability of *L. reuteri* to survive the passage through the intestinal tract and resist the toxic effects of bile acids (BA) is a key factor related to its probiotic function. The aim of this work is to review the main factors related to BA tolerance in this model probiotic strain.
Using fluorescent techniques it was determined that the deleterious action of AB in lactic bacteria is closely related to the dissipation of proton motive force. The CRL 1098 strain shows high resistance to BA being only sensitive to high concentrations of deoxycholic acid (DCA). Using proteomic tools, 25 proteins differentially expressed in *L. reuteri* challenged with glyco-deoxycholic acid (GDCA) and DCA, were identified. The enzyme cytosine triphosphate (CTP) synthetase, involved in the repair of oxidative damage to DNA and three proteins related to the transcription and translation of proteins that were overexpressed in the presence of GDCA and repressed in the presence of DCA, are highlighted. These findings could explain the delayed growth of the cells challenged with DCA. Finally, the operon of the *bsh* gene of CRL1098 was cloned and characterized, which will allow deepening its influence in the reduction of serum cholesterol levels.
The results presented in this work propose that AB induce a complex physiological response in *L. reuteri* and provide new insights into the mechanisms involved in bile tolerance in probiotic strains.

Keywords: Probiotics, Bile resistance, Two-dimensional electrophoresis, Bile salt hydrolase

Introducción

En la actualidad los conceptos básicos de nutrición han experimentado un cambio significativo. Hoy se pone énfasis en la potencialidad de los alimentos en promover la salud, mejorar el bienestar general y reducir el riesgo de enfermedades. Esto conduce a una mayor demanda de los consumidores por alimentos más saludables en cuyo contexto surgieron los alimentos funcionales, es decir aquellos que además de sus propiedades nutricionales intrínsecas, ejercen un efecto benéfico en el huésped. Dentro de los alimentos funcionales se consideran los probióticos, prebióticos, simbióticos, así como los alimentos enriquecidos con vitaminas, minerales, péptidos bioactivos, entre otros. En el desarrollo de los alimentos funcionales, las bacterias lácticas (BL) ocupan un lugar destacado, debido al efecto benéfico que estos microorganismos ejercen en el hospedador al mejorar el estado general del organismo, característica denominada probiótica. Numerosos estudios han reportado la capacidad de ciertos microorganismos probióticos de estimular el sistema inmunitario, regular la microbiota intestinal, ejercer efecto barrera contra patógenos, efectos anticarcinogénicos, y reducir el colesterol sérico, entre otros (Perdigón et al., 2001; Sullivan y Nord, 2002; Malpeli et al. 2015).

Con el fin de ejercer su acción, los probióticos deben superar las dos principales barreras fisiológicas que regulan la entrada de la microbiota exógena en el tracto gastrointestinal (GIT), es decir, el pH bajo en el estómago y la presencia de bilis en el intestino, cuyos efectos antimicrobianos son conocidos.

La bilis es una solución acuosa verde-amarillenta compuesta principalmente por ácidos biliares (AB), colesterol, fosfolípidos y el pigmento biliverdina. Es sintetizada en los hepatocitos pericentrales del hígado, almacenada y concentrada en vesícula biliar en períodos interdigestivos y liberada a intestino delgado luego de la ingesta de alimentos (Devkota y Chang, 2015). Los AB son detergentes biológicos que facilitan la emulsificación, solubilización y digestión de lípidos dietarios y vitaminas liposolubles, favoreciendo su absorción por las células epiteliales intestinales. Los AB primarios, cólico y quenodeoxicólico, son sintetizados en hígado a partir de colesterol. La solubilidad de los núcleos esteroideos se incrementa gracias a la conjugación de los AB primarios con glicina (glicoconjugados) o taurina (tauroconjugados) mediante N-acil-amidación. Los AB conjugados se encuentran completamente ionizados y por lo tanto es correcto referirse a ellos como sales biliares. Las moléculas resultantes son por lo tanto anfipáticas y pueden solubilizar lípidos para formar micelas mixtas.

Entre las transformaciones bacterianas más importantes que sufren las secreciones biliares durante el tránsito intestinal se encuentra la hidrólisis del enlace amida de los AB, mediada por la enzima microbiana Hidrolasa de Sales Biliares (HSB). Esta actividad ha sido descripta en diferentes géneros de bacterias intestinales (Chae et al., 2013; Jayashree et al., 2014; Joyce et al., 2014). Algunos autores sugieren una posible relación entre la actividad HSB y la resistencia a bilis en ciertas cepas lácticas (Bustos et al., 2012; Joyce et al., 2014).

Los AB ejercen un efecto inhibitorio sobre la mayoría de los microorganismos Gram positivos y Gram negativos. La respuesta a este efecto depende tanto de la cepa en estudio como del tipo y la concentración del ácido utilizado. El efecto deletéreo se debe, parcialmente, a su carácter detersivo ya que presentan un patrón de toxicidad similar al del SDS (Begley et al., 2006; Fernández Murga et al., 2001; Noriega et al., 2006) que puede alterar la membrana plasmática con pérdida de material intracelular (Kurdi et al., 2006).

De hecho, altas concentraciones de bilis pueden disolver fosfolípidos y perturbar la estructura de la bicapa lipídica causando lisis. En simultáneo con los efectos sobre la membrana plasmática, la bilis afecta otras funciones celulares que incluyen, entre otros, disturbios en la estabilidad de macromoléculas: los AB pueden inducir la formación de estructuras secundarias en el ARN e inclusive provocar daño en el ADN activando enzimas involucradas en la reparación de ácidos nucleicos, tanto en células bacterianas como eucariotas (Begley et al., 2005) y contribuir en la desnaturalización de proteínas y como resultado inducir la sobreexpresión de moléculas chaperonas DnaK and GroESL (Flahaut et al., 1996a; Flahaut et al., 1996b; Gahan et al., 2001; Schmidt y Zink, 2000). A su vez, la disociación intracelular de la forma protonada de los AB provoca acidificación intracelular de manera similar al efecto provocado por ácidos orgánicos, lo que conduce al colapso de la fuerza protón motriz, que resulta en la inhibición del transporte de nutrientes (Bustos et al., 2012; Kurdi et al., 2003; Kurdi et al., 2006). Dada la complejidad del estrés generado por la bilis, la capacidad de un microorganismo para tolerar su presencia requiere de una multiplicidad de mecanismos de

defensa que aún no están totalmente esclarecidos.

Lactobacillus (L.) reuteri es la especie de *Lactobacillus* más ampliamente distribuida en mamíferos y se suele proponer para el diseño de alimentos funcionales. *L. reuteri* CRL 1098 es una bacteria probiótica de probado efecto hipocolesterolemiante y capacidad para producir corrinoides con actividad de cobalamina (Molina et al., 2012). Se demostró, por otra parte, una estrecha relación entre la actividad HSB de esta cepa y su capacidad para reducir el colesterol (Taranto et al., 1997), mecanismo que también se ha manifestado *in vivo* (Malpeli et al., 2015; Taranto et al., 2000). La capacidad de *L. reuteri* para sobrevivir el pasaje a través del tracto intestinal y por lo tanto resistir los efectos tóxicos de los AB es un factor clave relacionado con su función probiótica. El objetivo de este trabajo es revisar los aspectos más relevantes relacionados a la tolerancia a sales biliares en esta cepa probiótica modelo.

Tolerancia a bilis en bacterias lácticas

La tolerancia a sales biliares es considerada un importante criterio en la selección de cepas probióticas para su empleo como suplemento dietario. Aunque no se conoce el grado de tolerancia requerido para un óptimo crecimiento en intestino, es razonable seleccionar los microorganismos más resistentes, ya que esto permite su empleo en menores dosis, garantizando así la inocuidad del producto y el equilibrio de la microbiota endógena.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo (Bustos et al., 2011) indican que existe una estrecha relación entre la disminución de la viabilidad celular y el incremento del potencial de membrana ($\Delta\Psi$). Estos resultados sugieren que el mecanismo antimicrobiano de los AB está relacionado con la disipación de la fuerza protón motriz. En el estudio se evaluó el efecto de AB conjugados (glico- y taurocólico y glico- y taurodeoxicólico) y libres (cólico y deoxicólico) en concentraciones finales entre 0.5 y 2.5 mM en cepas pertenecientes a la colección de cultivos de CERELA. Se empleó la sonda $DiSC_3(5)$ que puede acumularse en la bicapa lipídica de células energizadas, resultando en el *self-quenching* de la misma, con atenuación de la fluorescencia. Ante una alteración de la membrana, la sonda se libera al medio provocando un incremento de la señal fluorescente de manera proporcional al daño producido.

El efecto observado sobre el potencial de membrana varió en función de la cepa, el AB y concentración ensayada (Fig. 1 y 2). La mayoría de las cepas fueron más sensibles a los AB libres (ácido cólico [AC] y ácido deoxicólico [ADC]), siendo el ADC la especie más tóxica. Dentro de los conjugados se observó un mayor efecto tóxico en presencia de los ácidos tauro y glicodeoxiconjugados. *L. reuteri* CRL 1098 mostró elevada resistencia a todos los AB ensayados, siendo sólo sensible a altas concentraciones de ADC, mientras que la cepa *L. delbrueckii* CRL 494 fue la cepa más sensible. Estos ensayos fueron corroborados mediante ensayos de viabilidad, observándose la misma tendencia (Fig. 3).

Las diferencias observadas entre las capacidades inhibitorias de los AB libres han sido previamente reportadas por Kurdi et al., (2006), quienes encuentran que la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del AC fue diez veces mayor que la CIM de ADC para diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sin embargo, Noriega et al., (2006) encontraron que ciertas especies de *Bifidobacterias* fueron más sensibles a los ácidos conjugados del ácido cólico (AGC y ATC) que a los conjugados del deoxicólico (AGDC y ATDC).

La mayor resistencia de *L. reuteri* CRL 1098 a AB puede explicarse, al menos en parte, teniendo en cuenta la composición intrínseca de su membrana celular. En efecto, el análisis del perfil de ácidos grasos de la cepa CRL 1098 en presencia de bilis revela modificaciones en su patrón de lípidos, mecanismo que le permitiría a la célula mantener la fluidez de su membrana en ambientes hostiles (Taranto et al., 2003). La presencia de 10-oxo- and 10-hydroxi-octadecanoico (C18:0,10-oxo y C18:0,10-OH, respectivamente) es probablemente una características de los microorganismos cultivados en presencia de bilis. Estas moléculas jugarían un rol en la permeabilidad de la membrana celular y en su resistencia de las células al congelamiento (Fernández Murga et al., 2001).

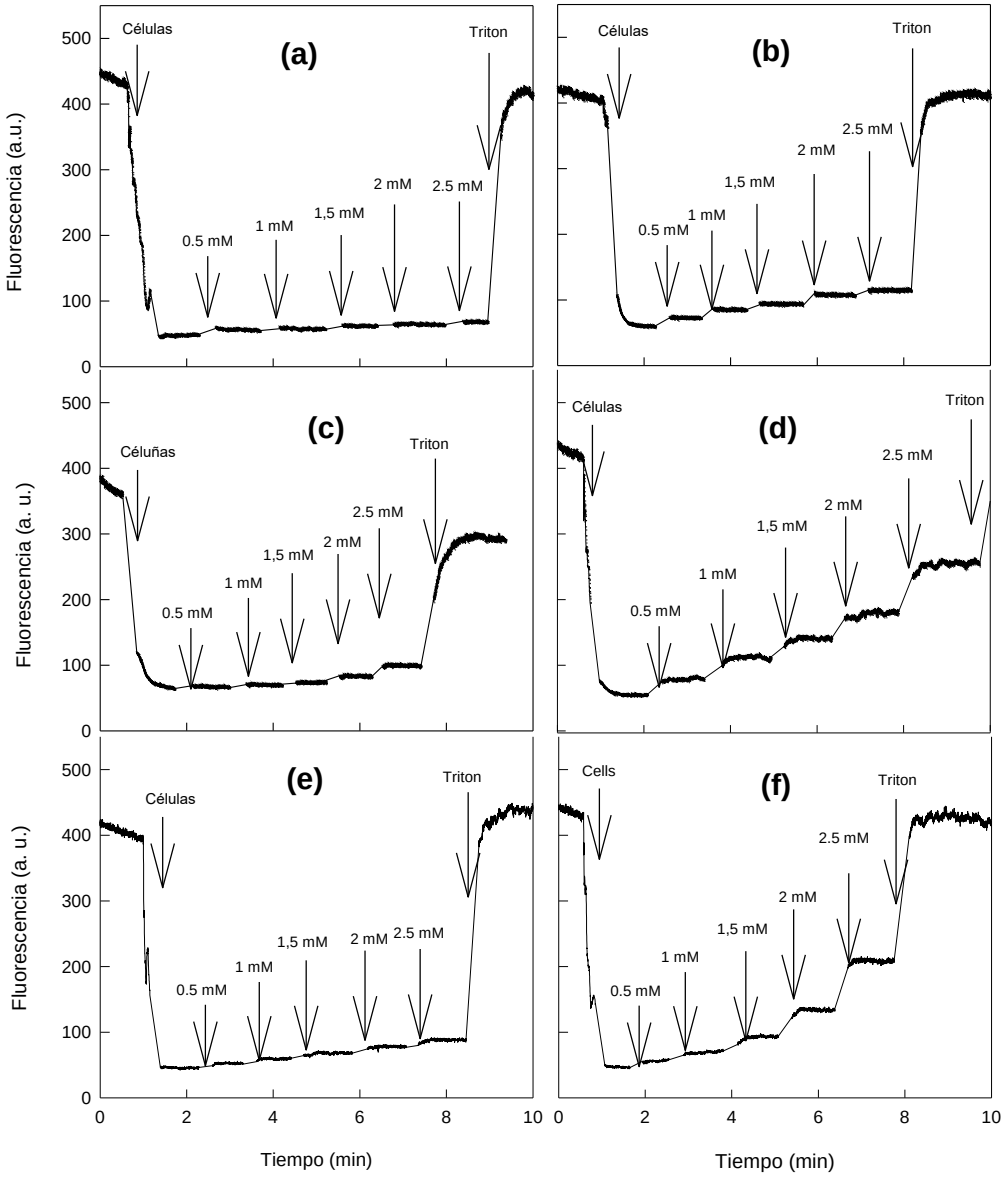

Figura 1. Efecto de AB conjugados sobre el potencial eléctrico transmembrana de *L. delbrueckii* CRL 494 (Der.) y *L. reuteri* CRL 1098 (Izq.), (a, b), ATC; (e, f), AGDC; (g, h), ATDC.

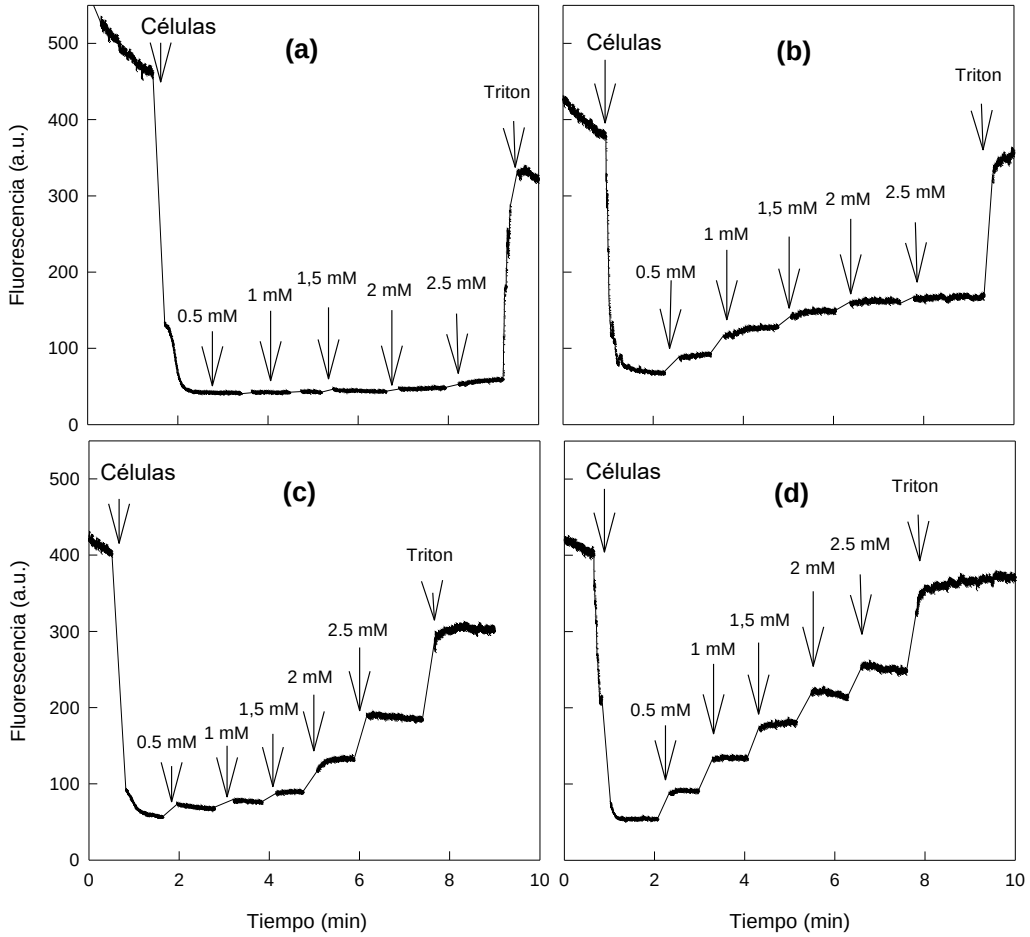

Figura 2. Efecto de AB libres sobre el potencial eléctrico transmembrana de *L. delbrueckii* CRL 494 (Der.) y *L. reuteri* CRL 1098 (Izq.) (a, b), AC; (c, d), ADC.

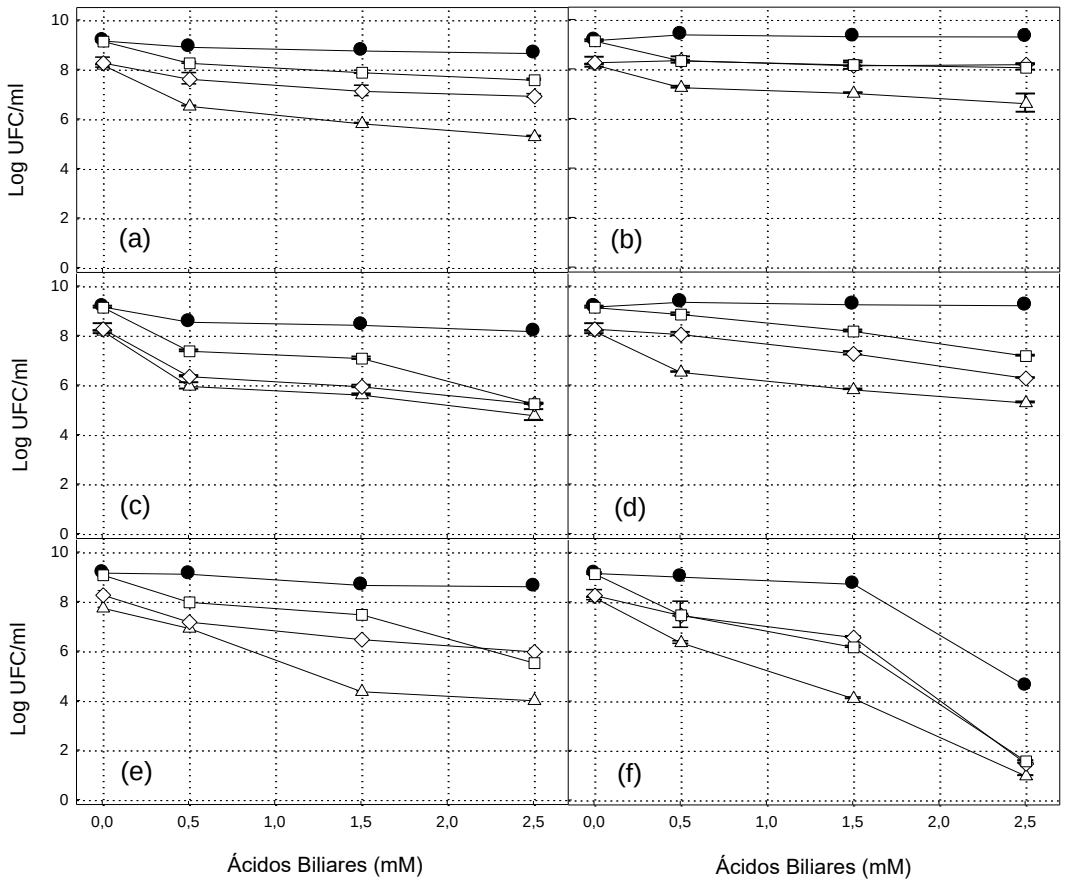

Figura 3. Efecto de AB sobre la viabilidad celular de cepas probióticas. (●) *L. reuteri* CRL 1098; (△) *L. delbrueckii* CRL 494; (◊) *L. acidophillus* CRL 1072; (□) *L. casei* CRL 203. (A) AGC; (B) ATC; (C) AGDC; (D) ATDC; (E) AC; (F) ADC.

Mecanismos de adaptación a estrés por sales biliares de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098. Enfoque proteómico

La habilidad de las bacterias para responder a diversas condiciones de estrés es esencial para su supervivencia. En los microorganismos operan distintos tipos de respuestas, que mediante la acción de uno o más reguladores principales e independientes del estímulo inicial, proveen protección frente a una variedad de agresiones ambientales relacionadas o no. Entre las proteínas claves en esta respuesta se encuentran chaperonas, proteasas y diversos factores reguladores (Yura et al., 1993), las cuales están altamente conservadas desde un punto de vista evolutivo. Estas proteínas están involucradas en la maduración de aquellas recientemente sintetizadas, en su correcto plegamiento o en la degradación de proteínas desnaturalizadas (Georgopoulos y Welch 1993). Como ya fuera señalado los AB, principales constituyentes de la bilis, son detergentes biológicos que alteran principalmente la estructura de bicapa lipídica de las membranas celulares. Aún no se conocen con precisión los complejos mecanismos de adaptación desarrollados por los microorganismos para tolerar la presencia de bilis. En particular, es escasa la información disponible respecto de la respuesta desarrollada por bacterias potencialmente probióticas frente al desafío producido por los AB.

A pesar de la información genómica disponible a partir de los diferentes proyectos de secuenciación de cepas de bacterias lácticas, aún resta revelar la función biológica de las

proteínas codificadas por los genes encontrados. En este sentido, la proteómica está enfocada en establecer la funcionalidad de estos genes contribuyendo a establecer la conexión entre las secuencias en el genoma y su rol biológico. Además, la proteómica demostró ser una herramienta útil para evaluar cambios en los niveles de expresión de numerosas proteínas expresadas bajo determinadas condiciones, permitiendo una visión global del proteoma de un organismo (Lilley y Friedman, 2004). La expresión de las diferentes proteínas es un reflejo del medioambiente en el que se encuentra el organismo y a diferencia del genoma, es altamente dinámico (Champomier-Vergès et al., 2002). Una de las principales herramientas proteómicas desarrolladas es la electroforesis bidimensional (2DE) que permite en un sólo experimento la separación de hasta cientos de proteínas, en función de la carga en una primera dimensión (isoelectroenfoque) y en la segunda en función de su masa (SDS-PAGE).

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta adaptativa de cepas lácticas a las condiciones del tracto intestinal se abordó un estudio proteómico. Se evaluó el efecto de AB sobre la expresión de proteínas citoplasmáticas totales de *L. reuteri* CRL 1098, cepa utilizada como modelo por su resistencia tanto a AB conjugados como libres (Bustos et al., 2015).

Comportamiento de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 en presencia de ácidos biliares

El efecto de AB conjugados y libres sobre la cinética de crecimiento de *L. reuteri* CRL 1098 fue evaluado comparando su desarrollo durante 24 h en presencia y ausencia de 1 mM AGDC y ADC. El ADC afectó significativamente los parámetros de crecimiento celular de la cepa en estudio mientras que la adición de AGDC a la misma concentración no afectó el desarrollo presentando una cinética de crecimiento similar al observado en las células que crecieron en ausencia de AB.

Perfil de proteínas expresadas en presencia de ácidos biliares

Se evaluó la expresión diferencial de proteínas de *L. reuteri* CRL 1098 mediante electroforesis bidimensional (2DE) en un gradiente de pH de 4-7, rango característico del proteoma de BL de acuerdo a la bibliografía (Savijoki et al., 2005). Una proteína fue considerada diferencialmente expresada si presentó un incremento o disminución $\geq$ 1.5 veces y si el cambio fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$), comparando cada condición respecto del control (sin el agregado de AB). El patrón de proteínas obtenido a partir de células crecidas en presencia de AGDC reveló que 22 proteínas fueron diferencialmente expresadas, de las cuales 14 fueron sobreexpresadas y 8 fueron reguladas negativamente. En presencia del ADC 28 proteínas cambiaron su perfil de expresión; 13 fueron reguladas positivamente y 15 disminuyeron su expresión (Figura 4).

A partir de los resultados obtenidos de la aplicación de la electroforesis bidimensional, se seleccionaron 32 proteínas que presentaron los cambios de mayor magnitud en su expresión en ambas condiciones. Las manchas correspondientes a dichas proteínas fueron extraídas del gel 2D y sometidas a digestión con tripsina y posterior análisis por espectrometría MALDI-TOF-TOF, resultando 25 proteínas exitosamente identificadas (Tabla 1).

Dentro de las 25 proteínas de respuesta a AB secuenciadas, aquellas involucradas en el metabolismo de nucleótidos y de glicerolípidos fueron las más abundantes con 7 y 6 proteínas identificadas en cada grupo funcional, respectivamente. Las restantes incluyen proteínas relacionadas al metabolismo de aminoácidos (2), transcripción y traducción (4), metabolismo energético (1), relacionadas a estrés y a homeostasis de pH (3) y dos proteínas de función desconocida.

Categoría funcional	Proteína identificada	Nº de acceso	PI	PM	Nº de mancha	Expresión relativa	Comentario
Metabolismo de glicerolípidos	alcohol dehidrogenasa que contiene hierro	Lreu_1840	4.70	40691.2	6	2.5	RP en GDCA
	alcohol dehidrogenasa que contiene hierro	Lreu_0030	5.63	42172.7	13	1.8	RN en GDCA
	alcohol dehidrogenasa que contiene hierro	Lreu_1840	4.70	40691.2	5	2.6	RP en DCA
	alcohol dehidrogenasa que contiene hierro	Lreu_1734	6.10	40353.1	1	5.1	RN en DCA
	alcohol dehidrogenasa que contiene hierro	Lreu_0030	5.63	42172.7	18	2.0	RN en DCA
	factor reactivador de la dehidratasa diol/glicerol	Lreu_1744	5.32	65682.8	2	3.2	RN en DCA
Transcripción y traducción	treonil-ARNt sintetasa	Lreu_1863	5.01	68754.2	25	1.5	RP en GDCA
	factor de elongación Ts	Lreu_0685	4.66	31956.2	26	1.5	RP en GDCA
	factor de elongación G	Lreu_1486	4.52	76756.9	18	1.6	RP en GDCA
	proteína ribosomal 50S L29P	Lreu_1735	5.18	51117.5	81	1.7	RN en DCA
Metabolismo de aminoácidos	cistationina gamma-liasa	Lreu_0293	4.87	41473.1	31	1.5	RP en GDCA
	aminotransferasa	Lreu_0744	4.84	43099.4	69	1.6	RP en DCA
Respuesta a estrés y a homeostasis de pH	proteína TypA ligadora de GTP	Lreu_0637	4.92	68815.7	3	1.8	RP en GDCA
	ornitina carbamoiltransferasa	Lreu_0425	5.20	37553.0	27	1.5	RP en GDCA

	chaperonina GroEL	Lreu_0354	4.46	57112.7	3	3.2	RP en DCA
Metabolismo de nucleótidos	CTP sintetasa	Lreu_023	5.07	59589.8	15	1.7	RP en GDCA
	CTP sintetasa	Lreu_023	5.07	59589.8	8	2.4	RN en DCA
	hidrolasa de nucleósido con preferencia por inosina/uridina	Lreu_0102	4.48	32567.0	10	2.3	RN en DCA
	hidrolasa de nucleósido con preferencia por inosina/uridina	Lreu_1658	4.54	34899.4	28	1.5	RP en GDCA
	hidrolasa de nucleósido con preferencia por inosina/uridina	Lreu_1658	4.54	34899.4	7	2.5	RP en DCA
	formato-tetrahidrofolato ligasa	Lreu_0131	5.5	60240.9	15	2.0	RN en DCA
	adenilsuccinato sintetasa	Lreu_0069	5.36	47716.5	27	1.7	RN en DCA
Metabolismo de carbohidratos (piruvato)	dehidrogenasa de 2-hidroxiácidos NAD-dependiente	Lreu_1631	4.55	36559.3	31	1.6	RN en DCA
Función desconocida	proteína de microcompartimentos	Lreu_1748	5.07	24940.6	22	1.6	RP en GDCA
	proteína hipotética	Lreu_1196	4.56	35190.9	12	2.2	RN en DCA

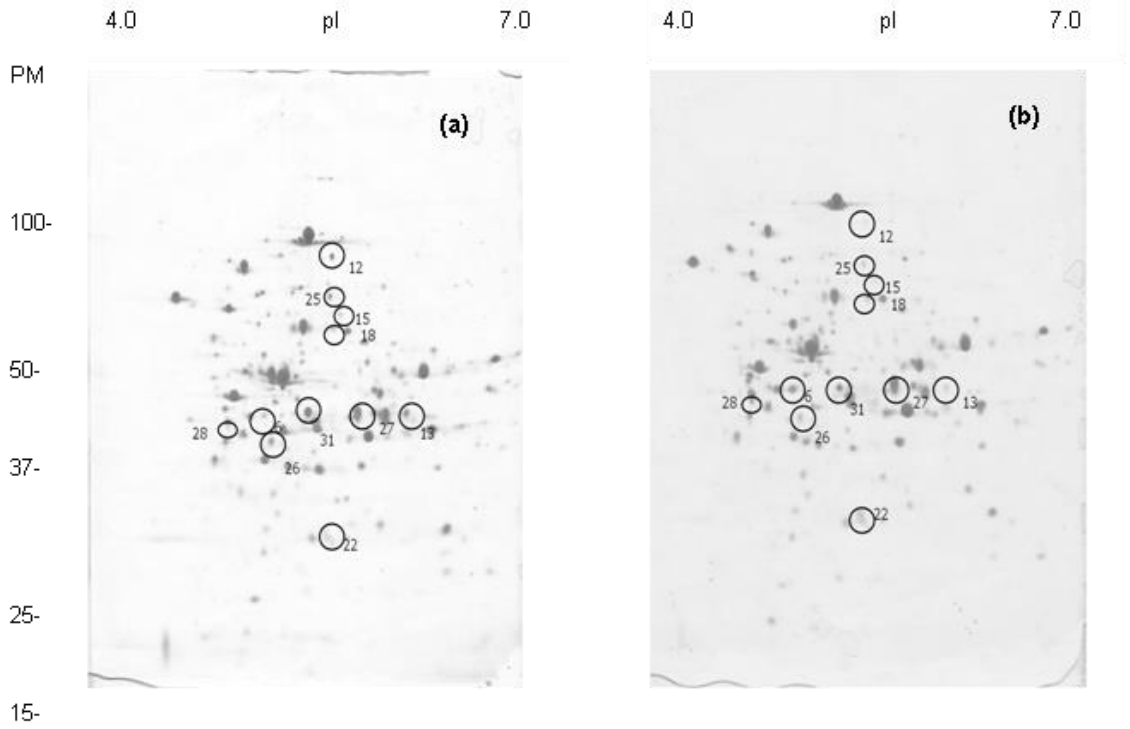

Figura 4. Geles 2-DE de proteínas citoplasmáticas de *L. reuteri* CRL 1098. Las manchas numeradas indican las proteínas expresadas en forma diferencial en presencia de AGDC (a) y ADC (c); (b) y (d) corresponden a los geles control en ausencia del ácido conjugado y libre, respectivamente. En rojo se indica una mancha que podría corresponder a la HSB de *L. reuteri* CRL1098 y que no fue identificada.

Proteínas involucradas en mecanismos de transcripción y traducción

Se identificaron cambios en los niveles de expresión de proteínas involucradas en la regulación de la transcripción y traducción, que sugieren una modulación de la síntesis de proteínas en respuesta a AB. Esto representa un fenómeno común en bacterias desafiadas por otros tipos de estrés (Budin Verneuil et al., 2007; Begley et al., 2003).

Durante la traducción, los factores de elongación son los responsables de la entrega de los aminoacil-ARNt al ribosoma (Stark et al., 1997). El factor de elongación Ts L29P y el factor de elongación G fueron sobreexpresados en *L. reuteri* CRL 1098 en presencia de AGDC. En tanto que la proteína ribosomal 50S y la sintetasa de treonil-ARNt fueron reguladas negativamente en presencia de ADC y AGDC, respectivamente. Lee et al., (2008) reportaron que la expresión del factor de elongación Ts fue inhibida en *L. reuteri* ATCC 23272 desafiado con 0,06% y 0,12% de bilis. Las diferencias observadas podrían explicarse parcialmente por la mayor sensibilidad de la cepa *L. reuteri* ATCC 23272, respecto de la cepa CRL 1098. En efecto, las concentraciones de bilis utilizadas en el estudio de Lee et al. (2008) afectaron la viabilidad celular de la cepa ATCC 23272 mientras que el AGDC a la concentración evaluada no resulta tóxico para *L. reuteri* CRL 1098. Por el contrario, dos proteínas identificadas como factores de elongación Tu y P fueron sobreexpresados en *Bifidobacterium (B.) longum* NCIMB 8809 (Sánchez et al., 2005) en presencia de 0.3% de bilis. Bøhle et al., (2010) informaron que la expresión del factor de elongación G se reprime transitoriamente a los 20 y 60 min y luego resulta estimulado a los 120 min cuando *Enterococcus (E.) faecalis* V583 fue desafiado con 1% de bilis. En relación a la proteína ribosomal 50S, los resultados concuerdan con lo informado previamente para *B. longum* NCIMB 8809 (Sánchez et al., 2005) donde esta proteína fue reprimida en presencia de 0,06% y 0,12% de bilis. Por el contrario, la proteína ribosomal 50S fue ligeramente sobreexpresada en *L. reuteri* ATCC 23272 en ambas concentraciones de bilis ensayadas (Lee et al., 2008). Es posible que el incremento en la expresión de proteínas relacionadas a la traducción le permita a los

microorganismos adaptarse a condiciones adversas y mantener su viabilidad.

Metabolismo de nucleótidos

Algunas proteínas involucradas con el metabolismo de purinas y pirimidinas modificaron su perfil de expresión en respuesta a AB en la cepa en estudio. Este grupo incluye la hidrolasa de nucleósido con preferencia por inosina/uridina, la CTP sintetasa, la formato-tetrahidrofolato ligasa y la adenilosuccinato sintetasa. Bajo condiciones de estrés la enzima formato-tetrahidrofolato ligasa es requerida para la síntesis de metabolitos, incluyendo purinas, pirimidinas y formil ARNt-met, que estimulan el crecimiento bacteriano (Bustos et al., 2015). Esta enzima fue regulada negativamente en respuesta a ADC, lo que sugeriría que este compuesto modifica el balance celular, impactando en el metabolismo de nucleótidos y reprimiendo, por lo tanto, el crecimiento de la cepa CRL 1098 en esta condición. Lee et al., (2008), encuentran que esta proteína se encuentra ligeramente sobreexpresada en *L. reuteri* ATCC 23272.

La enzima CTP sintetasa, involucrada en el metabolismo de citosina, presenta un comportamiento dual frente a los AB ensayados. En presencia de AGDC, esta enzima fue positivamente regulada y, por el contrario, fue significativamente reprimida en presencia de ADC (Tabla 1). La CTP sintetasa se encuentra asociada a la reparación del daño oxidativo causado por bilis al ADN, lo que explicaría la menor sobrevida de las células expuestas al AB libre. Esta enzima fue regulada positivamente en *B. longum* NCIMB 8809 (Sánchez et al., 2005) y en la derivada resistente a bilis de *B. animalis* subsp. *lactis* 4549dO mientras que en la cepa silvestre la enzima fue reprimida (Sánchez et al., 2007). Por otra parte, la represión de la proteína adenilosuccinato sintetasa involucrada en el metabolismo de nucleótidos y ácidos nucleicos en presencia ADC, indicaría una inhibición de la síntesis macromoléculas como ADN, ARN y ATP lo que se refleja en la menor adaptación y supervivencia de la cepa CRL1098 frente a este compuesto. Regulación negativa de los genes relacionados a la síntesis de nucleótidos fue informado previamente para *Latococcus (Lc.) lactis* en condiciones de estrés ácido (Xie et al., 2004). Por otra parte, en *L. plantarum* WCFS1 se observó represión de la transcripción del gen que codifica para la adenilosuccinato sintetasa, cuando fue sometido a estrés osmótico (Pieterse 2006).

La enzima hidrolasa de nucleósido con preferencia por inosina/uridina fue identificada a partir de las manchas 7 y 10 obtenidas en la cepa CRL1098 en presencia de ADC. Es posible que las diferentes manchas correspondan a isoformas de la misma proteína o sean producto de fragmentación proteolítica o resulten de una modificación post-traduccional. Esta proteína también se identificó a partir de la mancha 28 evidenciada por efecto del AGDC. Es importante resaltar que esta proteína resultó regulada positivamente en presencia de ambos AB (mancha 7 [Lreu_1658] y 28 [Lreu_1658]) mientras que una isoenzima (mancha 10 [Lreu_0102]) fue significativamente reprimida en presencia de ADC. Esta enzima hidroliza nucleósidos o nucleótidos, aunque con preferencia de sustrato por uridina e inosina, liberando D-ribosa.

Proteínas involucradas en respuesta a estrés

Los genes involucrados en respuesta general a estrés se encuentran altamente conservados en bacterias. Estos incluyen una larga lista de proteínas generalmente involucradas en la maduración de nuevas proteínas sintetizadas, en proteínas asociadas a membranas y en el replegamiento o degradación de proteínas desnaturalizadas y en la reparación del ADN (Georgopoulos et al., 1993; Gottesman 1984).

En presencia de AGDC, una proteína identificada como TypA ligadora de GTP fue regulada positivamente en *L. reuteri* CRL 1098. Esta proteína está involucrada en el mantenimiento de la funcionalidad de proteínas de membrana (Baev et al., 1999).

Una chaperona identificada como GroEL (mancha 3), frecuentemente involucrada en procesos de respuesta a estrés, fue significativamente sobreexpresada en células de *L. reuteri* CRL1098 desafiadas con ADC. Similares resultados fueron reportados para *B. longum* (Sánchez y col 2005) en presencia de 0.06% y 0.12% de bilis. El nivel de inducción fue mayor a la menor concentración ensayada, lo que sugiere que niveles basales de bilis son suficientes para gatillar la respuesta mediada por esta chaperona. La síntesis de chaperonas, que promuevan el plegamiento correcto de proteínas, es una respuesta común en diferentes géneros bacterianos hacia varios tipos de estrés ambientales, entre ellos estrés ácido, térmico y osmótico (Leverrier et al., 2003; Wilkins et al., 2001; Hecker y Völker 2001; Ventura et al., 2004).

Proteínas involucradas en la homeostasis de pH y en el metabolismo de aminoácidos y de carbohidratos

En presencia de bilis se encuentran afectadas todas las funciones celulares y por lo tanto la regulación de la homeostasis resulta esencial

bajo esta condición de estrés. Cuando las células de *L. reuteri* CRL 1098 fueron desafiadas con AGDC se detectó la sobreexpresión de una proteína involucrada en la homeostasis de pH que fue identificada como ornitina carbamoiltransferasa. Esta enzima, involucrada en la desaminación de argininina, contribuye a la generación de fuerza protón motriz y eleva el pH intracelular para compensar el estrés ácido (Rollan et al., 2003). Similar comportamiento mostraron *L. reuteri* ATCC 23272 en respuesta a bilis (Lee et al., 2008). En *E. faecalis* V583 se informó una inhibición transitoria de ornitina carbamoiltransferasa a los 60 min de crecimiento y, por el contrario, la proteína se encuentra sobreexpresada a los 20 y 120 min de exposición (Bøhle et al., 2010).
La proteína dehidrogenasa de 2-hidroxiácidos NAD-dependiente, involucrada en la conversión de D-lactato a piruvato, fue inhibida en presencia de ADC, lo que determinaría la disminución de NADH. Proteínas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos fueron sobreexpresadas en cultivos de la cepa CRL1098 expuestos a AB. Las proteínas cistationina γ-liasa y aminotransfera, involucradas en la biosíntesis de lisina, se sobrexpresaron en presencia de AGDC y ADC, respectivamente.

Proteínas involucradas en el metabolismo de glicerolípidos

La expresión de muchas proteínas implicadas en el metabolismo de los glicerolípidos se vio afectada en presencia de ambos AB. Entre estas proteínas, podemos destacar el factor de reactivación de diol/glicerol deshidratasa (mancha nº 2), que cataliza la reacción de 3HPA a glicerol en *L. reuteri* CRL1098, y tres isoenzimas de alcohol deshidrogenasa (IAD) que contienen hierro. De hecho, Lreu_1840 (puntos nº 5 y 6), Lreu_0030 (nº 13 y 18) y Lreu_1734 (punto nº 1), identificados como isoenzimas de IAD, se expresaron diferencialmente en la cepa CRL1098 en presencia de ambos BA. Estas enzimas están involucradas en diferentes etapas de la vía de los glicerolípidos. En presencia de AGDC y ADC se sobreexpresó la isoenzima Lreu_1840, responsable de la producción de glicerol. En contraste, las manchas identificadas como Lreu_0030 implicadas en la síntesis de 1-propanol tuvieron un nivel de expresión disminuido en presencia de AGDC y DCA. Curiosamente, la isoenzima Lreu_1734 implicada en la conversión de 1-propanol a propanal tenía una reducción negativa significativa (cinco veces respecto al control) en presencia de ADC. Esta reacción es muy necesaria para asegurar el suministro de NAD a la célula y podría explicar parcialmente la mayor toxicidad de la BA libre y la adaptación tardía de las células a la presencia de ADC.
Dos proteínas de función desconocida, una proteína de microcompartimentos y una proteína hipotética, fueron reguladas positiva y negativamente en presencia de AGDC y ADC, respectivamente.

Caracterización del gen hidrolasa de sales biliares de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098

La enzima Hidrolasa de Sales Biliares (HSB) ha sido descripta en una amplia variedad de especies de los géneros Bifidobacterium (Grill et al., 2000; Grill et al., 1995; Kim et al., 2004; Tanaka et al., 2000), Clostridium (Kishinaka et al., 1994), Listeria (Begley et al., 2002), Enterococcus (Knarreborg et al., 2002) y Lactobacillus (Bateup et al., 1995; Christiaens et al., 1992; Dashkevicz et al., 1989; De Boever et al., 1999; Elkins et al., 2001; Tannock et al., 1989; Taranto et al., 1999). Con la excepción de dos especies de Bacteroides (Kawamoto et al., 1989; Stellwag et al., 1976) todas las bacterias HSB (+) descriptas son Gram positivo. Las secuencias nucleotídicas de algunas enzimas HSB de bacterias potencialmente probióticas se encuentran disponibles en bases de datos públicas. Resulta interesante que ciertas especies poseen más de un gen *hsb* homólogo, aunque no idénticos entre ellos.
Considerando que la enzima HSB de *L. reuteri* CRL 1098 está estrechamente relacionada con su función probiótica se identificó y caracterizó el gen *hsb* de la cepa CRL1098.

Amplificación y análisis de la secuencia de nucleótidos del gen hsb de Lactobacillus reuteri CRL 1098

El gen *hsb* de *L. reuteri* CRL 1098 se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores (F1 - HSB: 5'GCCCAAAGTTCAAGGACAAGCAGA3' y R2 - HSB: 'CCACGCAATCGCAACTGAAGTAT3') diseñado basado en las secuencias que codifican el gen *hsb* de la cepa DSM 20016 (WP_003668136.1). El fragmento secuenciado contiene un único marco de lectura abierta de 978 nucleótidos limitado por un codón de iniciación de metionina ATG y un codón de terminación de la traducción TAA. Una estructura tipo promotor está situada de 22 a 72 nucleótidos "corriente arriba" (*upstream*) del codón ATG, así como una secuencia de ADN palindrómico capaz de formar una estructura tallo-bucle corriente abajo (*downstream*) de la estructura del gen. De hecho, un terminador

potencial de la transcripción tipo *rho*-independiente (AG = -14,1 kcal/mol) seguido de una secuencia rica en T se reconoció 20 nucleótidos corriente abajo del codón de terminación, indicando que el gen *hsb* de la cepa CRL 1098 se transcribe como una unidad monocistrónica. Si bien los transcriptos monocistrónicos de *hsb* constituyen el hallazgo más frecuente en muchos otros grupos de bacterias, en *L. johnsonii* (Elkins et al., 2001) y *B. longum* (Tanaka et al., 2000) se han reportado transcriptos policistrónicos. La secuencia nucleotídica deducida codifica un polipéptido de 325 aminoácidos, para el cual se ha calculado una peso molecular de 36098.1 Da y un pI de 4.81. El análisis de la secuencia de aminoácidos no presenta señales de secreción, lo que sugiere que la proteína resultante es intracelular.

La comparación de las secuencias de aminoácidos (BLAST, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) reveló que la HSB de la cepa CRL 1098 es idéntica a su homóloga en *L. reuteri* DSM 20016 (WP_003668136.1) y comparten alta identidad de secuencia (entre 97 y 98%) con las HSB de *L. reuteri* TD1 (WP_019254138.1), *L. reuteri* 100-23 (WP_003665850) y *L. reuteri* ATCC 53608 (WP_003674287) y en menor medida (55%) con las enzimas HSB de varias cepas de *Lactobacillus* y *Enterococcus*.

El análisis de secuencias nucleotídicas de enzimas HSB muestra identidad con las amidasas de penicilinas cuya función no ha sido claramente establecida. Este grupo de enzimas reconoce el mismo tipo de unión química aunque la estructura de los diferentes sustratos difiere significativamente unas de otras. Algunas de estas enzimas pueden escindir fenol y ácido fenoxiacético además de penicilina (Valle et al. 1991). Estos compuestos, abundantes en el ambiente, podrían ser sustrato de las HSB cuyos derivados podrían ser utilizados por la célula como fuentes de carbono alternativas en condiciones limitantes de nutrientes. Esta familia incluye, además a acilasas de homoserin-lactonas, que juegan un rol importante en la regulación de genes dependientes de "*quorum-sensing"* en bacterias Gram negativas. En particular, la proteína HSB de la cepa CRL 1098 comparte homología de secuencia con la acilasa de penicilina V (PVA) de *Listeria (List.) monocytogenes* EGDe. El análisis de múltiples secuencias de aminoácidos de diferentes HSBs y PVA alineadas revelan que cinco residuos de aminoácidos catalíticamente importantes (C, D, N, N y R) están altamente conservadas en la cepa CRL 1098 mientras que cuatro motivos (YFGRNXD, NEXGLXXAGLNF, VXVLTNNPXF y SXSRFVRXAF), localizados alrededor del sitio activo fueron parcialmente conservado (Bustos et al., 2016). El residuo Cys-2 se convierte en el centro catalítico después de la eliminación de la formil metionina inicial mediante un proceso autoproteolítico característico de la superfamilia de hidrolasas (Begley et al., 2006). El grupo tiol (SH) de Cys-2 ha demostrado ser esencial para la catálisis y se encuentra altamente conservado en un gran número de microorganismos (Begley et al., 2006; Taranto et al., 1999). Por otra parte, el análisis del árbol filogenético reveló que los genes *hsb* en cepas de *L. reuteri* están estrechamente relacionadas, pero difiere de las enzimas de otros géneros y de la PVA de cepas de *Bacillus* y *Listeria* (Bustos et al., 2016).

La regulación de HSB a nivel genómico, transcriptómico o proteómico fluctúa fuertemente según el microorganismo estudiado (Bustos et al., 2016). Aunque ninguna de las proteínas secuenciadas en la cepa CRL1098 correspondió con la enzima HSB, la mancha no. 29 que coincide en pI y masa con la HSB fue sobreexpresada 1,5 veces en presencia de AGDC (Figura 4). Sin embargo esta mancha no pudo ser identificada con éxito por Maldi Tof MS-MS.

Al respecto, no se observaron modificaciones en la expresión de HSB a nivel transcriptómico y proteómico cuando *L. reuteri* ATCC 23272 y *E. faecalis* V583 fueron desafiados con bilis (Bøhle et al., 2010; Lee et al., 2008). Por el contrario, en la cepa *L. plantarum* 299V resistente a bilis se observó sobreexpresión de la enzima HSB, mientras que no detectaron cambios en cepas sensibles, estrechamente relacionadas (Hamon et al., 2011). Por otra parte, en la cepa *B. animalis* 4549dOx, variante resistente a bilis, se detectaron importantes niveles de actividad HSB y significativa sobreexpresión de la enzima cuando la cepa fue expuesta a bilis. Estos resultados sugieren una posible relación entre la adquisición de resistencia a AB y la elevada actividad de deconjugación (Sánchez et al., 2007).

Conclusiones

L. reuteri CRL 1098 es una bacteria probiótica de probado efecto hipocolesterolemiante, estrechamente relacionado con su actividad HSB. La capacidad de *L. reuteri* para sobrevivir el pasaje a través del tracto intestinal y por lo tanto resistir los efectos tóxicos de los AB es un factor clave relacionado con su función probiótica.

Los resultados presentados en esta revisión muestran que los AB inducen una compleja respuesta fisiológica en *L. reuteri* CRL 1098.

Este trabajo permitirá avanzar y profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la tolerancia a bilis por parte de bacterias intestinales y potencialmente probióticas.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. La Dra. Bustos desea agradecer muy especialmente a la Universidad San Pablo T por los subsidios otorgados

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aachary AA, Prapulla SG (2011) Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 2-6.
- Al-Sheraji SH, Ismail A, Manap MY, Mustafa S, Yusof, RM, Hassan FL (2013) Prebiotics as functional foods: A review. *J Func Foods* 5: 1542-1553.
- Aureli P, Capurso L, Castellazzi AM, Clerici M, Giovannini M, Morelli L, y col. (2011) Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacol Res 63:* 366-376.
- Barayni, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology, 23, 277e294.
- Barreteau H., Delattre C. & Michaud P. (2006). Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technol Biotechnol*, 44, 323-333.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 72, 248-254.
- Cesca, B.; Manca De Nadra, M. C.; Strasser De Saad, A. M.; P. De Ruiz Holgado, A. and Oliver, G. (1984). β-D-galactosidase of *Lactobacillus* species. Folia Microbiol. , 29, 288-294
- de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. (2001). Probiotics--compensation for lactase insufficiency. Am J Clin Nutr. 73 (2 Suppl):421S-429S. Review
- FAO/WHO (2002) Probiotics in Foods. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf
- Gänzle M (2012) Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *Int Dairy J* 22: 116-122.
- Garman, J.; Coolbear, T.; Smart, J. (1996). The effects of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalyzed by *â*-galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Appl.Microbiol. Biotechnol*., *46*, 22-27.
- Gosling, A., Stevens, G.W., Barber, A.R., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121: 307–318.
- Huang, D. Q.; Prevost, H. and Divies, C. (1995). Principal characteristics of

β-galactosidase from *Leuconostoc* spp. Int. Dairy Journal, 5, 29-43.

- Hsu, C.A.; Lee, S.L and C. C. Chou (2007). Enzymatic Production of Galactooligosaccharides by *â*-Galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. J. Agric. Food Chem. 55, 2225-2230
- Iqbal S., Nguyen, T.; Nguyen, T.; Maischberger, T.; and D. Haltrich (2010). β-Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. Carbohydrate Research 345: 1408–1416.
- Itoh, T.; Ohhashi, M.; Toba, T. and Adachi, S. (1980). Purification and properties of β-galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus* . Milchwissenschaft 35, 593-597.
- Iwasaki, K., Nakajima, M., Nakao, S. Galacto-oligosaccharide Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using β-Galactosidase. Process Biochem.1996; 31 (1): 69 – 76.
- Juers, D. H.; Jacobson, R. H.; Wigley, D.; Zhang, X. J.; Huber, R. E.; Tronrud, D. E.; Matthews, B. W. (2000). High-resolution refinement of *β*-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides structural basis for α-complementation. *Protein Sci.*, *9*, 1685-1699
- Li, W., Xiang, X.; Tang, S. Hu, B.; Tian, L.; Sun, Y.; Ye, H. and X. Zeng (2009). Effective Enzymatic Synthesis of Lactosucrose and Its Analogues by β-D-Galactosidase from *Bacillus circulans* J. Agric. Food Chem. 57, 3927–3933.
- Marteau, P.; Vesa, T. and Rambaud, J. C. (1997). Lactose maldigestion p 65-88. In: R.Fuller (ed.), Probiotics 2: Applications and practical aspects. Chapman & Hall, London UK.
- Montes, R. G.; Bayles, T. M.; Saavedra, J. M. and Perman, J. A. (1995). Effect of milks Inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt starter culture in lactose Maldigesting children. J. Dairy Sci. 78, 1657-1664.
- Montalto M, Curigliano V, Santoro L, Vastola M, Cammarota G, Manna R, Gasbarrini A, Gasbarrini G. (2006). Management and treatment of lactose malabsorption. World J Gastroenterol. 4;12(2):187-91.
- Nguyen et al 2006 Nguyen, T.-H.; Splechtna, B.; Steinböck, M.; Kneifel, W.; Lettner, H. P.; Kulbe, K. D.; Haltrich, D. Purification and characterization of two novel β-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 4989−4998
- Nguyen, T., Nguyen, H.A., Arreola, S.L., Mlynek, G., Djinovic-Carugo, K., Mathiesen, G. Nguyen, T., Haltrich, D. (2012). Homodimeric β-Galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081: Expression in *Lactobacillus plantarum* and Biochemical Characterization. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 1713−1721
- O'Connell, S., Walsh, G. (2010). A novel acid-stable, acid-active *β*-galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance.

Applied of Microbiology and Biotechnology, 86: 517–524.

- Otieno D.O. (2010). Synthesis of b-galactooligosaccharides from lactose using microbial b-galactosidases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 471–482
- Rabiu, B., Jay, A., Gibson, G.R., Rastall, R.A. (2000). Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by β-galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Appl Environ Microbiol*. 67: 2526 – 2530.
- Rastall R, Maitin V (2002) Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr Op Biotechnol* 13, 490–496.
- Raibaud, P.; Caulet, M.; Galpin, J.V. and Mocquot, G. (1961) Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *Journal of Applied Bacteriology* 24, 285 – 291.
- Roberfroid M (2007) Prebiotics: The Concept Revisited. *J Nutr* 137: 830-837.
- Savaiano, D. A.; Levitt, M. D. (2000). Lactose Intolerance. In: Handbook of Dairy Foods and Nutrition. Second Edition, CRC Press LLC.: 311-354.
- Splechtna, B., Nguyen, TH., Haltrich, D. Production of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides from Lactose using β-Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. J.Agric. Food Chem 2006; 54: 4999-5006.
- Tymczyszyn E.E., Gerbino E., Illanes A. & Gómez-Zavaglia A. (2011). Galactooligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Cryobiology*, 62, 123-129.
- Yanahira S, Yabe Y, Nakakoshi M, Miura S, Matsubara N, Ishikawa H. (1998). Structures of novel acidic galactooligosaccharides synthesized by Bacillus circulans beta-galactosidase. Biosci Biotechnol Biochem. 62(9):1791-1794.
- Yeoman CJ, White BA (2014) Gastrointestinal Tract Microbiota and Probiotics in Production Animals. *Annu Rev Anim Biosci 2:* 469–486.
- Zárate y col., 2003; Zárate G, Perez Chaia A, Oliver G (2003) Some Characteristics Of Practical Relevance Of β-Galactosidase From Potential Probiotic Strains Of *P. acidipropionici*. *Anaerobe* 8: 259-267.
- Zárate, G., Saez, G., Pérez Chaia, A. (2013). Microbial transformation of lactose: potential of β-galactosidases for probiotic and prebiotic purposes. En: *L*actose: structure, food industry applications and role in disorders. (Eds: David Green and Emma Lee). ISBN: 978-1-62808-198-5 Nova Science Publishing, USA.
- Zhang, W., Wang, C., Huang, C., Yu, Q., Liu, H., Zhang, C., Pei, X., Xu, X., Wang, G. (2012). Analysis of b-galactosidase production and their genes of two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol Lett.* 34:1067–1071.

ESTUDIO FENOLÓGICO DE ESPECIES AUTÓCTONAS DEL JARDÍN BOTÁNICO DE LA UNIVERSIDAD DE SAN PABLO-TUCUMÁN

PHENOLOGICAL STUDY OF AUTOCHTHONOUS SPECIES IN THE BOTANICAL GARDEN OF THE UNIVERSITY OF SAN PABLO-TUCUMÁN

Colombo, M. [1 (*)]**; Ríos, A.** [1]**; Danert, C**[1]

[(1)] *Universidad de San Pablo-T. Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial*. (*) E- Mail: mcolombo@uspt.edu.ar

RESUMEN

El Jardín Botánico que se encuentran en la sede de la Universidad de San Pablo-T ubicada en la Comuna de San Pablo, perteneciente al Departamento Lules, a 13 Km. de la capital de Tucumán, en la región fitogeográfica de las yungas o pedemonte, al pie de las sierras de San Javier y Villa Nougués. Fitogeográficamente corresponde al límite entre la zona de Llanura tucumana (350 a 550 m.s.n.m) y el inicio de la Selva Subtropical basal (550 a 900 m.s.n.m). Diseñado cerca del año 1910 por el arquitecto francés, *Carlos Thays*, posee un trazado aparentemente aleatorio característico de "jardín inglés", que refleja las características de jardín paisajista del siglo XVIII.
El objetivo del presente trabajo de investigación de la Universidad de San Pablo- T, es identificar las especies autóctonas del Jardín Botánico de la Universidad de San Pablo-T. Se considera especie "autóctona" a aquella especie que se encuentra dentro de su área de distribución natural u original, con potencial de dispersión y sin la intervención del hombre (Lever, 1985). Se realizaron observaciones fenológicas a lo largo del año, en cada época de cosecha se recolectaron las semillas de las especies identificada, las que se acondicionaron para su estudio e intercambio con otras instituciones. Entre algunas de las especies autóctonas del Jardín Botánico se destacan: *Allophyllus edulis* (chalchal); *Anadenanthera colubrina* (cebil colorado); *Ceiba chodatii* (palo borracho o yuchán); *Cupania vernalis* (ramo); *Enterolobium contortisiliquum* (pacará); *Handroanthus impetiginosus* (lapacho rosado); *Jacaranda mimosifolia* (tarco, jacarandá); *Ruprechtia laxiflora* (virarú); *Tipuana tipu* (tipa blanca). La preservación de germoplasma de especies autóctonas busca promover la supervivencia y reproducción de esas especies locales. Con esa práctica además, se intenta difundir la importancia cultural que poseen las mismas en la comunidad y propender a un mayor reconocimiento de los beneficios ecosistémicos que brindan.

PALABRAS CLAVES: jardín botánico; árboles; autóctonos, ambiente.

SUMMARY

The Botanic Garden of the University of San Pablo-T, are located in the headquarters located in the Commune of San Pablo, belonging to the Lules Department, 13 km from the capital of Tucumán, in the phytogeographic region of Yungas or Pedemonte, At the foot of the sierras of San Javier and Villa Nougués. Phytogeographically corresponds to the boundary between the area of Tucumana Plain (350 to 550 m.s.n.m) and the beginning of the Basal Subtropical Forest (550 to 900 m.s.n.m).
Apart from its beauty and exuberance, it has between its design and exemplars a huge historical capital, believed to have been designed around 1910, by the French Architect, Carlos Thays.
The objective of the present research work of the University of San Pablo-T is to identify the native species of the Botanic Garden of the University of San Pablo-T. It is considered "native" species to that species that is within its natural or original range, with potential for dispersion and without the intervention of man (Lever, 1985).
Phenological observations were made throughout the year, harvesting and harvesting of seeds of the species identified for study and exchange with other institutions
It tries to preserve the germplasm of species that are at risk of disappearing or threatened their reproduction or survival. Promote greater recognition of the ecosystem benefits they provide to the community and its cultural importance.
Among some of the native species of the Botanical Garden are: *Allophyllus edulis* (chalchal);

Anadenanthera colubrina (cebil colorado); *Ceiba chodatii* (palo borracho o yuchán); *Cupania vernalis* (ramo); *Enterolobium contortisiliquum* (pacará); *Handroanthus impetiginosus* (lapacho rosado); *Jacaranda mimosifolia* (tarco, jacarandá); *Ruprechtia laxiflora* (virarú); *Tipuana tipu* (tipa blanca).

KEYWORDS: botanical garden; trees; autochthonous, environment.

INTRODUCCIÓN

La preservación de las especies vegetales autóctonas es de interés para resguardar el germoplasma de las mismas, preservando de esa manera especies que se encuentren en riesgo de desaparición o amenazada su reproducción o supervivencia. Por otra parte conocer esas especies, es también reconocer el medio ambiente propio de la región y del país en general, permitiendo tomar conciencia de su importancia, de los beneficios que ofrecen para la sustentación del los distintos ambientes naturales, especialmente la conservación de la biodiversidad, en función de ofrecer los servicios ambientales relacionados con la infiltración de agua, el llenado de los acuíferos subterráneos, la preservación del suelo y su fertilidad, entre otros beneficios.

El Jardín Botánico de la Universidad de San Pablo-T, se encuentran en la sede ubicada en la Comuna de San Pablo, perteneciente al Departamento Lules, a 13 Km. de la capital de Tucumán, en la región fitogeográfica de las yungas o pedemonte, al pie de las sierras de San Javier y Villa Nougués.

Fitogeográficamente corresponde al límite entre la zona de Llanura tucumana (350 a 550 m.s.n.m) y el inicio de la Selva Subtropical Basal (550 a 900 m.s.n.m).

El jardín posee un trazado aparentemente aleatorio característico de "jardín inglés", que refleja las características de jardín paisajista del siglo XVIII.

Entre las especies del jardín se encuentran plantas autóctonas y exóticas, se destacan cedros, robles, casuarinas, palos borrachos, alcanforeros, lapachos, tarcos, cebiles, tipas, ceibos, palmeras y nogales.

Este proyecto hace hincapié en las especies autóctonas de las Yungas que se encuentran dispersas en el Jardín Botánico de la Universidad de San Pablo-T.

Se considera especie "autóctona" a aquella especie que se encuentra dentro de su área de distribución natural u original, con potencial de dispersión y sin la intervención del hombre (Lever, 1985).

Mediante esta investigación se trata de identificar el comportamiento de las especies autóctonas presentes en el Jardín Botánico de la USP-T, buscando la preservación de las mismas, para resguardar el germoplasma y propiciar el intercambio, con otras instituciones relacionadas en el marco de la Red Argentina de Jardines Botánicos, de la que la USP-T es miembro. De esa manera se logrará obtener información que luego también podrá ser puesta a consideración de estudiantes y público en general, sobre el medio ambiente propio de la región, y las características de las especies presentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se identificaron especies vegetales autóctonas y se realizó la descripción fenotípica con ayuda de bibliografía secundaria. Se registraron datos fenológicos de cada una determinando época del estadio vegetativo y reproductivo, marcando la estación climática y temporal del desarrollo vegetal. Con dichos resultados se confeccionaron tablas de registro fenológico comparativo entre especies. Se recolectaron frutos y semillas, de los especímenes autóctonos, los cuales se procesaron y acondicionaron para su posterior almacenamiento y/o intercambio con otras instituciones.

RESULTADOS

Allophyllus edulis (chalchal)

Descripción:

Es un arbusto o árbol bajo de 4 a 7 metros de altura (excepcionalmente 15 m).Perteneciente a la Familia de las Sapindaceas. Plantas polígamo dioicas. El follaje va de persistente a semipersistente. Las hojas, puntiagudas de un brillante color esmeralda, son compuestas, trifoliadas, alternas. Las flores son pequeñas, blancas, de 2 mm de diámetro, dispuestas en racimillos. Las flores masculinas presentan los filamentos de los estambres vellosos. Las flores femeninas presentan el estigma trífido. El fruto es una drupa globosa de 7 a 11 mm de diámetro, amarilla y cuando madura es roja.

Observaciones:

El chalchalero (*Turdus rufiventris*) es una especie de ave que come los frutos del chal-

chal, también son comestibles para el hombre. Se utiliza como planta ornamental, para el arbolado de calles y plazas.

Fenología:
Florece de agosto a noviembre y fructifica de octubre a enero.

Valorando las condiciones ambientales que presenta la zona donde está ubicado el Jardín Botánico, concuerda con las etapas fenológicas teóricas.

Tabla Nº 1: Estadios Fenológicos de ***Allophyllus*** ***edulis*** **(chalchal).**

MESES AÑO	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
FLORACIÓN												
FRUCTIFICACIÓN												

Figura Nº 1: ***Allophyllus*** ***edulis*** **(chalchal)**

Figura Nº 2: Hojas y frutos de ***Allophyllus*** ***edulis*** **(chalchal)**

Anadenanthera ***colubrina*** **(cebil colorado)**

Descripción:
Árbol de la Familia de las Fabaceae (ex Leguminosae), 15-30 m, de fuste recto y tronco con corteza poco o notablemente rugosa. Madera rojiza muy resistente. Follaje caduco, hojas bipinadas, de 15-25 cm. Flores en cabezuelas blanquecinas, de 2 cm. de diámetro. Fruto legumbre rojiza, con estrangulaciones.

Observaciones:
Especie originaria de las yungas del NOA y de las selvas de transición. Es una especie exigente en luz, por ello se la observa en bosques secundario o colonizando claros de bosque. Es muy rústica, de crecimiento relativamente rápido. Su madera es utilizada por su dureza para hacer postes y marcos de puertas y durmientes. La corteza y las hojas es rica en taninos, lo que evita que sea comida por animales. Los taninos se pueden usar para curtir cueros. También se conocen efectos alucinógenos de las semillas. Es un recurso arbóreo con cualidades melíferas.

Fenología:
Florece de septiembre a diciembre. Comienza a fructificar en diciembre y las vainas se mantienen en las ramas hasta la nueva floración, pero paulatinamente dejan caer las semillas, las que rápidamente germinan.

Valorando las condiciones ambientales que presenta la zona donde está ubicado el Jardín Botánico, concuerda con el estadio fenológico de floración y minimizándose el tiempo de permanencia del fruto en árbol, mostrando en el mes de junio ausencia de fruto en copa.

Tabla Nº 2: Estadios Fenológicos de ***Anadenanthera*** ***colubrina*** **(cebil colorado)**

MESES AÑO	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
FLORACIÓN												
FRUCTIFICACIÓN												

Figura Nº 3: ***Anadenanthera colubrina*** **(cebil colorado)**

Figura Nº 4: Detalle del tronco de ***Anadenanthera colubrina*** **(cebil colorado)**

Figura Nº 5: Frutos y semilla de ***Anadenanthera colubrina*** **(cebil colorado)**
Ceiba chodatii **(palo borracho, yuchán)**

Descripción:
Árbol con follaje caduco y flores vistosas. Familia de las Bombacáceas. Porte: Árbol de 6-15 m, con tronco notablemente engrosado, frecuentemente de más de 1 m de diámetro, de color grisáceo-verdoso, con o sin aguijones, con copa globosa amplia. Follaje poco denso, caduco, hojas palmiticompuestas de 15-20 cm. de largo. Flores: Flores blancas, con manchas amarillentas. Frutos: Frutos cápsulas con 5 valvas, que en interior poseen fibra o pelos de color blanco donde se encuentran semillas esféricas, negras.

Fenología:
Florece de enero a julio y fructifica desde mayo. La diseminación se hace en primavera, cuando las semillas se desprenden de la cápsula abierta, envueltas en pelos blancos sedosos que lleva el viento y por medio del cual se diseminan.

Valorando las condiciones ambientales que presenta la zona donde está ubicado el Jardín Botánico, concuerda con las etapas fenológicas teóricas.

Tabla Nº 3: Estadios Fenológicos de ***Ceiba chodatii*** **(palo borracho, yuchán)**

MESES AÑO	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
FLORACIÓN												
FRUCTIFICACIÓN												

Figura Nº 6: ***Ceiba*** ***chodatii*** **(palo borracho, yuchán)**

Figura Nº 7: Hojas, flor y fruto de ***Ceiba*** ***chodatii*** **(palo borracho, yuchán)**

***Cupania vernalis* (ramo)**

Descripción:
Árbol de follaje persistente. Perteneciente a la Familia Sapindaceas. Las hojas son compuestas, pinnadas o imparipinadas, discolores. Porte: 6-15 m de altura y tronco de 40 cm. de diámetro. Con corteza lisa o muy poco rugosa de color pardo-oscuro. Flores: de color blanco amarillento, pequeñas, de hasta 4 mm de largo. Frutos: cápsulas loculicidas subglobosas-trígonas de hasta 1,5 cm. de diámetro, con tres lóculos dehiscentes, en cada uno tiene una semilla morado-negruzca en la madurez, con un arilo en forma de cúpula, anaranjado, carnoso.

Observaciones:
Es un árbol hermoso y produce mucha sombra en el verano. Proporciona madera dura, moderadamente pesada, que es utilizada en diferentes construcciones. Cultivado raramente en parques y plazas.

Fenología:
Florece de abril a agosto y fructifica de julio a diciembre.

Valorando las condiciones ambientales que presenta la zona donde está ubicado el Jardín Botánico, concuerda con las etapas fenológicas teóricas.

Tabla Nº 4: Estadios Fenológicos de ***Cupania vernalis* (ramo)**

MESES AÑO	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
FLORACIÓN												
FRUCTIFICACIÓN												

Figura Nº 8: ***Cupania vernalis*** **(ramo)**

Figura Nº 9: Hoja de ***Cupania vernalis*** **(ramo)**

***Enterolobium contortisiliquum* (pacará)**

Descripción:
Árbol de la Familia de las Fabaceae (ex Leguminosae), de copa extendida formando una amplia sombrilla, de hojas caducas, y corteza gris y lisa. Porte: 12-18 m de altura, tronco recto de 0,6-1,0 m de diámetro. Flores: no son muy vistosas, de color blanco-verdoso, reunidas entre 10-20 por cabezuela. Frutos: duros, en forma de riñón, de 4-7 cm. de diámetro, cuando maduran son de color casi negro. Las semillas son diseminadas por animales.

Observaciones:
El nombre de -oreja de negro- alude a la particular forma y coloración de los frutos maduros del pacará. Es de madera blanda, liviana y flexible, que se aprovecha para cajones de frutas, embalajes, ventanas, sillas. Por ser resistente a la intemperie, se usa para cubiertas de embarcaciones, se usaba por los pueblos originarios para la construcción de canoas. La corteza y los frutos son empleados en medicina popular.

Fenología:
Florece de octubre a diciembre. Con el inicio de la floración aparecen simultáneamente las hojas. Fructifica de enero a abril, pero los frutos permanecen en la planta hasta julio.

Valorando las condiciones ambientales que presenta la zona donde está ubicado el Jardín Botánico, concuerda con las etapas fenológicas teóricas.

Tabla Nº 5: Estadios Fenológicos de ***Enterolobium contortisiliquum* (pacará)**

MESES AÑO	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
FLORACIÓN												
FRUCTIFICACIÓN												

Figura Nº 10: ***Enterolobium contortisiliquum* (pacará)**

Figura Nº 11: Detalle de hojas, flores y frutos de ***Enterolobium contortisiliquum*** **(pacará)**

Handroanthus impetiginosus **(lapacho rosado)**

Descripción:
Árbol de la Familia Bignoniaceas, de follaje caduco. Porte: Árbol de 15-20 m de altura y tronco de 50 cm de diámetro (hasta 30 m de altura y 80 cm de diámetro en condiciones naturales), con fuste recto, corteza castaño oscura, con grietas longitudinales. Follaje caduco, hojas opuestas, palmaticompuestas, con foliolos grandes, de borde entero o parcialmente aserrado en el extremo. Flores: Flores rosadas, muy vistosas, reunidas en conjuntos terminales. Frutos: Los frutos son cápsulas alargadas. Semillas: achatadas color castañas, con ala membranosa que le permite dispersarse por el viento. Las semillas poseen corta viabilidad (duran algunos meses), después de colectadas germinan con facilidad, a los 3 a 5 días.

Observaciones:
Existe variabilidad en el color de sus flores, desde el blanco (un carácter recesivo, por lo que es de difícil transmisión a la descendencia) hasta el rosado intenso, pasando por tonos intermedios. La madera de lapacho es resistente a la podredumbre, por ello tolera bastante bien la poda de la copa y la remoción del suelo en la zona de raíces. La corteza y la madera es utilizada para el tratamiento de enfermedades del riñón y la vejiga.

Fenología:
La floración se produce antes de la nueva brotación, durante alrededor de un mes entre agosto y setiembre. Por ello la floración es muy vistosa en la primavera, ya que aparece en las ramas totalmente desfoliadas. Los frutos se desarrollan muy rápidamente después de la floración, hasta el mes de enero aproximadamente.

Valorando las condiciones ambientales que presenta la zona donde está ubicado el Jardín Botánico, concuerda con las etapas fenológicas teóricas.

Tabla Nº 6: Estadios Fenológicos de ***Handroanthus impetiginosus*** **(lapacho rosado)**

MESES AÑO	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
FLORACIÓN												
FRUCTIFICACIÓN												

Figura Nº 12: ***Handroanthus impetiginosus*** **(lapacho rosado)**

Jacaranda mimosifolia **(tarco, jacarandá)**

Descripción:
Árbol con denso follaje en el verano, luego caedizo en el invierno. Perteneciente a la Familia de las Bignoniaceas. Las ramas son poco pubescentes, en general lenticeladas. Porte: 10-15 m de altura y tronco de 70 cm. de diámetro. Flores: azul-violáceas, abundantes, de 4-5 cm. de largo, en panículas terminales de forma piramidal que aparecen antes que las hojas. Frutos: cápsulas leñosas de color castaño, grandes, de 5-7 cm. de diámetro, comprimidas lateralmente. Semillas numerosas, color castaño, rodeadas por un ala membranácea transparente, que le permite diseminarse por el viento. Las semillas germinan fácilmente, pero suelen perder del poder germinativo en pocos meses.

Observaciones:
Originario de la selva subtropical tucumano-boliviana, es uno de los árboles indígenas más hermosos del país. Se adapta bien a la contaminación atmosférica, por eso es muy requerido para el arbolado humano, aunque su sistema radicular no es lo suficientemente importante para sostener su gran porte. Esta particularidad lo hace inestable durante el periodo de fuertes lluvias. En el verano, la copa de ejemplares adultos puede proveer de una amplia sombra.

Fenología:
En Tucumán comienza a florecer en septiembre al tiempo que las ramas muestran los primeros brotes. Fructifica desde marzo y mantiene sus cápsulas durante todo el año, encontrándose en la planta frutos verdes nuevos y secos de la temporada anterior.

Valorando las condiciones ambientales que presenta la zona donde está ubicado el Jardín Botánico, concuerda con las etapas fenológicas teóricas, presentando frutos verdes inmaduros y maduros en la copa.

Tabla Nº 7: Estadios Fenológicos de ***Jacaranda mimosifolia*** **(tarco, jacarandá)**

MESES AÑO	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
FLORACIÓN												
FRUCTIFICACIÓN												

Figura Nº 13: ***Jacaranda mimosifolia*** **(tarco, jacarandá)**

Figura Nº 14: Hojas, flores y frutos de ***Jacaranda mimosifolia*** **(tarco, jacarandá)**

Figura Nº 15: Detalle flor de ***Jacaranda mimosifolia*** **(tarco, jacarandá)**

Ruprechtia laxiflora **(virarú)**

Descripción:
Árbol dioico de 8-15m, corteza delgada, gris oscura con grietas longitudinales. Follaje caduco. Perteneciente a la Familia de las Poligonaceas. Hojas simples, lanceoladas de 5-8 cm. Fruto sámara con tres alas. Originario de las yungas del NOA. Raramente cultivado en calles y parques. Aparece a lo largo de rutas y caminos rurales.

Árbol de hojas caducas, forestal y ornamental. La corteza delgada, ligeramente rugosa, de color pardo o café-grisáceo, presenta grietas longitudinales. Porte: 6-15 m de altura, y tronco de unos 50 cm. de diámetro. Flores: pequeñas, masculinas y femeninas. Las masculinas, de casi 4 mm de diámetro, son de color blanco verdoso, en racimos simples; las femeninas, de color rojizo amarillento, con tres sépalos, más grandes y conspicuos que los pétalos, de hasta 4 mm de largo. Frutos: aquenios elipsoideo-trígonos de casi 8 mm de largo y casi 4 mm de ancho de color rojizo, envueltos por los sépalos y pétalos persistentes a la madurez y que toman forma espatulada. Semilla oblongo- trígona, de 6 mm. de alto por 3mm de ancho. Las ramas fructíferas son péndulas y muy viscosas.

Observaciones:
Se reproduce por semillas.

Fenología:
Florece desde mediados de septiembre hasta mediados de noviembre y fructifica en noviembre y diciembre.

Valorando las condiciones ambientales que presenta la zona donde está ubicado el Jardín Botánico, concuerda con las etapas fenológicas teóricas.

Tabla Nº 8: Estadios Fenológicos de ***Ruprechtia laxiflora*** **(virarú)**

MESES AÑO	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
FLORACIÓN												
FRUCTIFICACIÓN												

Figura Nº 16: ***Ruprechtia laxiflora*** **(virarú)**

Figura Nº 17: Detalle de hojas e inflorescencias de ***Ruprechtia laxiflora*** **(virarú)**

Tipuana tipu **(tipa blanca)**

Descripción:
Es un árbol de rápido crecimiento, corpulento. Perteneciente a la Familia de las Fabaceae (Ex Leguminoseae). Tiene requerimientos de luz de heliófilo a mesófilo. De altura media 10 a 25 m. llegando a alcanzar hasta 30 metros, Hojas compuesta imparipinnadas, follaje semicaduco. Las flores amarillentas, agrupadas en inflorescencia. Fruto legumbre alada (tipo sámara), de 4-7 cm de longitud, indehiscente, con 1 sola semilla en su interior. Las semillas germinan a los 7 a 10 días de sembradas y suelen ser viables alrededor de un año.

Observaciones:
En las zonas urbanas es frecuente en calles anchas, avenidas, paseos y también en jardines por su magnífica floración amarilla y su muy buena sombra. Las hojas suelen ser empleadas en medicina popular por sus propiedades astringentes. La madera blanca – amarillenta se emplea para mueblería en general, machimbre, carpintería de obra; es una madera que se usa para artículos de alta resistencia como mangos de herramientas. Si en primavera, lo invade una chicharrita, que succiona sus hojas, se produce una "lluvia" desde su copa, que aparte de ocasionarle daño a la planta también puede ocasionar molestias si se usa como árbol en la vía pública.

Fenología:
Florece de octubre a diciembre y fructifica de enero a abril, pero las sámaras se mantienen aún hasta julio.

Valorando las condiciones ambientales que presenta la zona donde está ubicado el Jardín Botánico, concuerda con las etapas fenológicas teóricas, presentando en copa un bajo porcentaje de frutos.

Tabla Nº 9: Estadios Fenológicos de ***Tipuana tipu*** **(tipa blanca)**

MESES AÑO	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
FLORACIÓN												
FRUCTIFICACIÓN												

Figura Nº 18: ***Tipuana tipu*** **(tipa blanca)**

Figura Nº 19: Fruto de ***Tipuana tipu*** **(tipa blanca)**

DISCUSIÓN

El reconocimiento y compromiso de los jardines botánicos a nivel mundial es cada vez mayor ante su trascendente labor en la conservación *ex situ* e *in situ* de la diversidad genética de las especies y los ecosistemas en su conjunto. Nuestra colección de especies nativas nos permite realizar investigaciones y al mismo tiempo proporcionan un espacio seguro para mantener y preservar diferentes especies bajo una estructura y organización. Las observaciones realizadas nos permiten afirmar que las distintas etapas fenológicas de las plantas autóctonas estudiadas del Jardín Botánico de la USPT, coinciden en general con la bibliografía consultada.

De esa manera se intenta preservar el germoplasma de especies que se encuentren en riesgo de desaparición o amenazada su reproducción o supervivencia. Propender a un mayor reconocimiento de los beneficios ecosistémicos que brindan a la comunidad y su importancia cultural.

Así poder cumplir con uno de los objetivos de los jardines botánicos que es la conservación de la biodiversidad, en este caso propia de la región y lograr un mayor conocimiento mediante proyectos de investigación cuyos resultados se puedan volcar a la difusión destinada al público visitante del Jardín.

BIBLIOGRAFÍA

Brown, A y Grau, H. 1993. La Naturaleza y el hombre en las Selvas de Montaña. Colección Nuestros Ecosistemas. Edit. Proyecto GTZ, Salta.

Colombo, M y Ríos, A. 2014. Revalorización del parque del Campus USP-T y posibilidad de transformación en circuito educativo y turístico. 2014. IDITeC. Revista Científica. USP-T.

Colombo, M.; Ríos, A. 2015. Jardín para la inclusión. El caso del Jardín Botánico de la Universidad de San Pablo-T. IDITeC. Revista Científica. USP-T.

Grau, A. y Kortsarz (Editores). 2012. Guía del arbolado de Tucumán. Edit.Artes Gráficas Crivelli – Salta.

Lever, S.C. 1985. Naturalized mammals of the world. Longman, Harlow: UK

Digilio, A. y Legname, P. 1966. Los árboles indígenas de la provincia de Tucumán**.** Edit. Instituto Miguel Lillo, UNT, Tucumán.

Valdora, E. y Soria, M. 1999. Árboles de interés forestal y ornamental para el Noroeste Argentino. LIEY. UNT. Tucumán.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA DE BACTERIAS GRADO ALIMENTARIO PARA LA SELECCIÓN DE CEPAS CON FINES PROBIÓTICOS/PREBIÓTICOS

ASSESSEMENT OF β-GALACTOSIDASE ACTIVITY OF GRAS BACTERIA IN ORDER TO SELECT STRAINS FOR PROBIÓTIC/PREBIÓTIC PURPOSES

Cuño, G.[1]; Saez, G. D. [1,2]; Palacios, J.M. [2] y Zárate, G.[1,2*]

[1] Universidad de San Pablo-Tucumán, Av. Solano Vera y Camino a Villa Nougués, San Pablo.

[2] CERELA -CONICET, Chacabuco 145, San Miguel de Tucumán, Argentina.

*Autor de correspondencia: gzarate@cerela.org.ar

RESUMEN

El desarrollo de alimentos funcionales, en particular aquellos conteniendo microorganismos probióticos y/o compuestos prebióticos ha recibido particular atención de la industria alimentaria debido a la alta demanda de alimentos saludables por parte de los consumidores. Al respecto, la enzima β-galactosidasa reviste interés biotecnológico por cuanto confiere a los microorganismos que la poseen potencial probiótico para aliviar los síntomas de intolerancia a la lactosa o prebiótico como generadores de galactooligosacáridos (GOS) capaces de modular positivamente la microbiota intestinal. En este sentido, la selección de microorganismos para estos fines implica no solo la presencia excluyente de la enzima sino también la cuantificación de la actividad específica y el efecto de las condiciones ambientales en la misma. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad β-galactosidasa de un panel de bacterias lácticas grado alimentario (GRAS status) en cuanto a su capacidad de hidrólisis del sustrato en diferentes condiciones de pH y presencia de iones; como así también su actividad transglicosilasa sobre lactosa. Asimismo, se evaluó la capacidad de estos microorganismos de crecer a expensas de diferentes fuentes de carbono que involucran la actividad de la enzima β-galactosidasa. La actividad enzimática se determinó en extractos libres de células de los microorganismos mediante un método espectrofotométrico (DO_{420}) usando el sustrato cromogénico ONPG análogo a la lactosa. El crecimiento fue evaluado por determinación a intervalos de la absorbancia a 560 nm de la biomasa bacteriana. Todas las cepas evaluadas mostraron actividad β-galactosidasa observándose cepas con baja, media y alta velocidad de hidrólisis. Los iones Na+ y K+ actuaron como estimulantes de la actividad enzimática mientras que Ca^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+} y Mg^{2+} mostraron efectos inhibitorios en diferentes medidas. Con respecto al pH todos los microorganismos evaluados mostraron actividad óptima a pH 6,5-7,0, menor actividad a pH 8 y actividad nula a pH 5. En cuanto a su capacidad de emplear la enzima β-galactosidasa para crecer empleando diferentes sustratos, el crecimiento más elevado se observó a expensas de GOS y lactosa, un desarrollo intermedio cuando los sustratos fueron lactulosa y oligosacáridos derivados de la misma y escaso crecimiento en permeado de suero y suero adicionado de extracto de levadura. *L. bulgaricus* CRL 450, la cepa con mayor actividad hidrolítica fue capaz de sintetizar GOS a partir de 30% de lactosa. Estos resultados representan el paso inicial en el estudio y la selección de microorganismos con potencial

aplicación probiótica y/o prebiótica para ser aplicados en la producción de nuevos ingredientes funcionales relevantes para la industria alimentaria.

Palabras clave: Bacterias lácticas, β-galactosidasa, probióticos, prebióticos.

SUMMARY

The development of functional foods, particularly those containing probiotics and/or prebiotics have received great attention from food industry due to the high demand of healthy foods by consumers around the world. In this respect β-galactosidase enzyme possesses high biotechnological impact as it confers to microorganisms probiotic properties to alleviate lactose intolerance symptoms or prebiotic potential as galactooligosaccharides (GOS) producers which in turn can modulate intestinal microbiota in a positive manner. Then, selection of microorganisms for these issues requires not only the presence of the enzyme in cells but also the quantification of specific activity and the effect of environmental conditions on it. In consequence, the objective of this work was to assess the β-galactosidase activity of a set of lactic acid bacteria (GRAS status) regarding their hydrolytic activity under different pH conditions and presence of cations, as well as its transglycosilase activity on lactose. Besides, the capacity of these microorganisms to grow on different carbon sources that involve β-gal activity was assessed. Enzyme activity was determined on free cell extracts by a spectrophotometric (OD420) method with ONPG as substrate. Bacterial growth was followed by determination at intervals of biomass absorbance at 560 nm. All strains assayed showed β-galactosidase activity displaying low, medium or high hydrolysis rate. Cations like Na+ and K+ acted as stimulators of enzyme activity whereas Ca^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+} y Mg^{2+} exerted inhibitory effects to different extents. With respect to pH, all microorganisms showed maximal activity at pH 6.5-7.0, lower activity at pH 8 and null activity at pH 5. Regarding the ability of using β-galactosidase for growing on different substrates, the higher growth was reached when the carbon sources were GOS or lactose, intermediate development was observed when substrates were lactulose and their oligosaccharides and scarce growth was attained on whey permeate or whey supplemented with yeast extract. L. bulgaricus CRL 450, the strain with the highest enzyme activity was able to synthesize GOS from 30% lactose. These results represent the first step in the study and selection of microorganisms with potential probiotic and/or prebiotic application to the production of novel functional ingredients with relevance for food industry.

Key words: Lactic acid bacteria, β-galactosidase, probiotics, prebiotics.

INTRODUCCIÓN

Los *alimentos funcionales son aquellos que además de su rol nutricional básico ejercen algún beneficio en la salud del consumidor favoreciendo alguna función específica del organismo o contribuyendo a la prevención de alguna enfermedad* (ILSI, 1999). Si bien muchos alimentos son naturalmente funcionales por la presencia de algún componente beneficioso, otros son obtenidos por la eliminación o sustitución de compuestos no deseados o la adición de ingredientes bioactivos. Entre estos, los alimentos funcionales obtenidos mediante la adición de **probióticos** y **prebióticos** se encuentran entre los más populares y difundidos. De hecho, en las últimas décadas el desarrollo de estos alimentos beneficiosos para la fisiología del cuerpo ha recibido particular atención de la industria alimentaria debido a la alta demanda de productos saludables por parte de los consumidores.

Los **probióticos** son "*microorganismos vivos que ingeridos en dosis apropiadas confieren un beneficio de salud al consumidor* (FAO-WHO 2002)". Su modo de acción se basa en tres mecanismos: i) regulación de la composición de la microbiota endógena, ii) modulación de las actividades metabólicas del huésped y su microbiota e iii) inmunomodulación. Al respecto, el mayor énfasis ha sido puesto en el empleo de bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* por cuanto se consideran habitantes normales del tracto intestinal de los mamíferos, aunque también se consideran para tal fin otros géneros de bacterias lácticas, propionibacterias, bacilos y levaduras. Entre los efectos probióticos que se les adjudican puede mencionarse la protección contra infecciones virales y bacterianas, prevención de carcinogénesis, reversión de avitaminosis, hipercolesterolemia, e intolerancias alimentarias, promoción del crecimiento y el rendimiento productivo en animales, etc. (Aureli y col, 2011, Yeoman y White, 2014). Por su parte, los **prebióticos** son *ingredientes alimenticios no digeribles que afectan de forma beneficiosa a quien lo consume mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, mejorando así la salud del consumidor* (Roberfroid, 2007). Mientras que algunos péptidos, glicoproteínas y ciertos lípidos han sido considerados prebióticos potenciales, los carbohidratos no digeribles y en particular los oligosacáridos no digeribles (OND) han recibido particular atención por sus propiedades beneficiosas tales como su efecto bifidogénico, su papel en la regulación de los niveles de colesterol, la absorción de minerales, inhibición de la adhesión de patógenos al epitelio, y prevención del cáncer de colon (Barreteau y col., 2006; Al-Sheraji y col., 2013). Los oligosacáridos prebióticos presentan diferente composición química y grado de polimerización. En el mercado mundial se comercializan, como prebióticos, un gran número de carbohidratos tales como inulina, fructooligosacáridos (FOS), lactulosa, galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS) y otros compuestos emergentes como pectooligosacáridos (POS), oligosacáridos de soja, isomaltooligosacáridos (IMOS), gluco-oligosacáridos, lactosacarosa (LS), entre otros. Sin embargo solamente los fructanos (inulina y FOS), lactulosa, y los GOS han sido reconocidos a la fecha como seguros (GRAS) (Aachary y Prapulla, 2011, Gänzle, 2012, Al-Sheraji y col., 2013; Tymczyszyn y col., 2014).

La **β-galactosidasa (EC 3.2.1.23)** es una enzima aislada y caracterizada en diferentes tipos de organismos como bacterias, levaduras, plantas y hongos (Cesca y col., 1984, Huang y col., 1995, Zárate y col., 2003; O'Connell y Walsh, 2010; Iqbal y col., 2010; Zárate y col., 2013) que ha sido usada por largo tiempo como biocatalizador en la industria láctea y en síntesis glicoquímica. Esta enzima puede catalizar dos reacciones básicas: **hidrólisis de lactosa** y galactósidos estructuralmente relacionados; y **transgalactosilación**, en la que el grupo glucosilo de una o más unidades de galactosa es transferido al residuo de D-galactosa de la lactosa, resultando una mezcla de oligosacáridos con diferente grado de polimerización y configuración, que se conocen como **galactooligosaccharidos** o **GOS** (Otieno, 2010). Esta característica le confiere a la β-galactosidasa un elevado valor biotecnológico por cuanto permite a los microrganismos que la poseen contribuir al metabolismo intestinal de la lactosa en individuos intolerantes a este azúcar mediante la hidrólisis intraintestinal del disacárido y/o generar GOS prebióticos por reacciones de transglicosilación.

Como se mencionó previamente, los GOS modulan positivamente la microbiota colónica y pueden aplicarse como aditivos alimentarios. Sin embargo, dependiendo del origen de la enzima y las condiciones de reacción, pueden formarse diferentes cantidades de GOS y de enlaces entre las unidades de galactosa lo que a su vez puede incidir en sus propiedades y potencial prebiótico. Por este motivo, los estudios se han enfocado en la búsqueda, purificación y caracterización de nuevas β-galactosidasas microbianas que tengan alta eficiencia para hidrolizar pero también para transgalactosilar lactosa y en la determinación de las condiciones favorables (pH, temperatura, a_w, concentración de sustrato y tiempo de reacción) para cada proceso (Gosling y col., 2010; Otieno, 2010; Gänzle, 2012). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad β-galactosidasa de un panel de bacterias lácticas grado alimentario (GRAS status) en cuanto a su capacidad de hidrólisis del sustrato en diferentes condiciones de pH y presencia de iones; como así también su actividad transglicosilasa sobre lactosa. Asimismo, se evaluó la capacidad de estos microorganismos de crecer a expensas de diferentes fuentes de carbono que involucran la actividad de la enzima β-galactosidasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de crecimiento

En este trabajo se empleó un panel de cepas de bacterias lácticas pertenecientes a la colección de cultivos de CERELA (CRL: Centro de Referencia para Lactobacilos, CERELA, Tucumán, Argentina). Las cepas usadas fueron: *Lactobacillus acidophilus* CRL 43; *L. casei* CRL 72; *L. fermentum* CRL 141, CRL 250 y CRL 574; *L. paracasei* CRL 200 y CRL 232, *L. plantarum* CRL 231 y CRL 948; *L. bulgaricus* CRL 450.

Los microorganismos almacenados a -20°C en crioviales con LEL (leche al 10% conteniendo 0,5% de extracto de levadura) fueron reactivados en caldo LAPTg (1.5 % peptona, 1% triptona, 1% glucosa, 1% extracto de levadura y 0.1% Tween 80, pH 6.8) (Raibaud y col., 1961) a 37ºC y subcultivados al menos dos veces en este medio cada 24 horas.

Para su uso experimental los microorganismos fueron crecidos durante 16 horas en 5 mL de Laptg a 37°C en las condiciones mencionadas, cosechados por centrifugación (3000 x g, 10 min, 4°C), lavados con solución salina estéril (9 g/L NaCl) y suspendidos en la décima parte del volumen original en la misma solución. Esta suspensión fue empleada para determinar su actividad β-galactosidasa o inocular los medios de crecimiento.

Relevamiento de la actividad β-galactosidasa de bacterias con potencial probiótico

La capacidad de hidrolizar lactosa se determinó mediante la evaluación de su actividad β-galactosidasa en extractos libres de células (ELC) mediante método espectrofotométrico empleando el sustrato sintético o-nitrophenyl-β-galactopiranosido (ONPG). Los microorganismos fueron crecidos en Laptg caldo con reemplazo de su contenido de glucosa por lactosa 1% durante 16 horas a 37ºC y cosechados por centrifugación (10.000 rpm, 10 min, 4 ºC). Las células fueron lavadas dos veces con buffer KH_2PO_4-Na_2HPO_4, 50 mm, pH 6,8, resuspendidas en 0,5 mL de este buffer y agregadas a crioviales conteniendo 0,5 g de perlas de vidrio estériles de 0.25mm de diámetro. La disgregación mecánica se realizó en un bead beater con 10 ciclos de agitación y 10 de descanso en hielo de un minuto cada uno respectivamente obteniéndose luego el sobrenadante (ELC) por centrifugación (10.000 rpm, 10 min, 4 ºC). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando un kit comercial de la marca Bio-Rad (Bio-Rad, Munich, Germany) y seroalbumina bovina para la preparación de la curva estándar. La reacción enzimática se realizó agregando 20 µL del ELC a 200 µL de ONPG preparado en buffer fosfato 50 mM, pH 6, 8 en microplaca multipocillo e incubando durante 10 minutos a 40°C. La cantidad de o-nitrophenol liberada fue monitoreada continuamente midiendo la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro con control de temperatura (modelo Versamax, Molecular Devices, California, USA). La actividad enzimática se expresó en Uβ-gal/mg proteína.

Efecto del pH y de iones inorgánicos en la actividad

La influencia del pH en la actividad de la enzima fue determinada realizando la reacción a pH 5 (buffer acetato, 50 mM); pH 6,

6,5 y 7 (tampón fosfato 50 mM) y pH 8 (tampón Tris-HCl 50 mM)

La acción de diferentes cationes sobre la actividad específica fue determinada adicionando los mismos en forma de cloruros a la mezcla de reacción en concentración final 5,0 mM.

Crecimiento de los microorganismos a expensas de diferentes fuentes de carbono y energía

Suspensiones de los microorganismos en solución salina estéril (0.85%) fueron inoculados al 2 % en Lapt con el agregado de lactosa, galactooligosacáridos (Vivinal GOS), Lactulosa, oligosacáridos de lactulosa, permeado de suero y permeado de suero conteniendo 1,5% de extracto de levadura. Los medios inoculados con cada cepa fueron luego fraccionados en microplacas de 96 pocillos con tapa, colocando por triplicado 200 µL en cada pocillo. Los microorganismos fueron incubados a 37°C durante 16 horas y el crecimiento fue determinado por absorbancia a 560 nm a intervalos de 60 minutos en un lector de microplaca (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Parámetros de crecimientos como velocidad máxima (µ max) y latencia (lag) fueron calculados a partir del ajuste de las curvas a un modelo sigmoide usando Microsoft Excel add-in DMfit v. 2.1 (Barayni y Roberts, 1994) (available at http://www.ifr.ac.uk/safety/DMfit/default.html).

Síntesis de galactooligosacáridos (GOS) por bacterias lácticas

La capacidad de sintetizar galactooligosacaridos se evaluó en la cepa con la mayor actividad hidrolítica. Para ello, el ELC de *Lactobacillus bulgaricus* CRL 450 se mezcló con 30% de lactosa y se incubó a 40°C durante 24 horas tomándose a intervalos muestras para su análisis de los carbohidratos presentes por cromatografía liquida de alta resolución (HPLC) usando la columna KR100-5NH_2 (5µ 250 X 4,6 mm, marca KROMASIL) con detector por índice de refracción.

RESULTADOS

Relevamiento de la actividad β-galactosidasa de bacterias con potencial probiótico

Todas las cepas empleadas en este estudio fueron capaces de crecer a expensas de lactosa y por lo tanto presentaron actividad β-galactosidasa en los extractos libres de células (no se detectó actividad enzimática en los sobrenadantes de cultivo que indique presencia extracelular de la enzima). La velocidad de hidrólisis del sustrato sintético ONPG permitió identificar 3 grupos de microorganismos: las cepas con alta velocidad (*L. acidophilus* CRL 43, *L. casei* CRL 72 y *L. bulgaricus* CRL 450), velocidad media (*L. plantarum* CRL 231 y *L. fermentum* CRL 250) y baja velocidad (*L. paracasei* CRL 200; CRL 232, *L. fermentum* CRL 574 y *L. plantarum* CRL 948 (Figura 1). Los valores de actividad observados se encontraron entre 0,498 Uβgal/mg para L. *plantarum* CRL 948 la cepa con menor actividad y 9,467 Uβgal/mg para *L. bulgaricus* CRL 450 el microorganismo con mayor actividad específica.

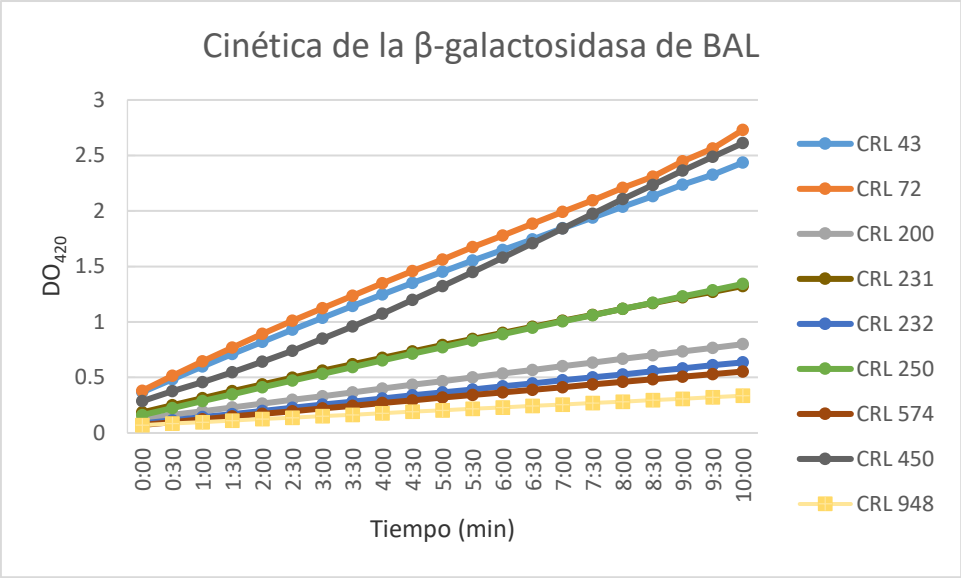

Figura 1: Cinética de la actividad β-galactosidasa de un panel de bacterias lácticas de diferentes especies.

Efecto de iones inorgánicos y del pH en la actividad específica

Los diferentes iones ensayados ejercieron efectos contrapuestos sobre las cepas actuando algunos como activadores y otros como inhibidores de la actividad enzimática (Figura 2). Los iones hierro (Fe), niquel (Ni), cobalto (Co), manganeso (Mn) y calcio (Ca) inhibieron significativamente la actividad enzimática de todas las cepas alcanzando inhibiciones del 100% de la actividad en el caso del níquel hasta 55% de inhibición cuando el manganeso estuvo presente en la mezcla de reacción. Por su parte el magnesio (Mg) inhibió la actividad entre 14 y 47 % mientras que los iones sodio (Na) y potasio (K) fueron los únicos capaces de estimular la actividad enzimática hasta un 34%.

Con respecto al pH, todas las cepas mostraron mayor actividad a pHs cercanos a la neutralidad con un óptimo para la mayoría de ellas a pH 6,5. De igual manera, la enzima de todos los microorganismos ensayados resultó más sensible a pH ácido que alcalino (Figura 3).

Crecimiento de los microorganismos a expensas de diferentes fuentes de carbono y energía

Con el fin de utilizar los microorganismos como probióticos o prebióticos es necesario evaluar la capacidad de los mismos de utilizar la lactosa u otros carbohidratos que impliquen actividad de la enzima β-galactosidasa para poder considerarlos como sustratos para estos fines. Por tal razón se evaluó el crecimiento de las cepas a expensas de lactosa, GOS, lactulosa, oligosacáridos derivados de lactulosa y permeado de suero como fuente de carbono y energía determinando si existen diferencias en el comportamiento entre cepas con alta, media y baja velocidad de hidrólisis (Figura 4 y Tabla 1).

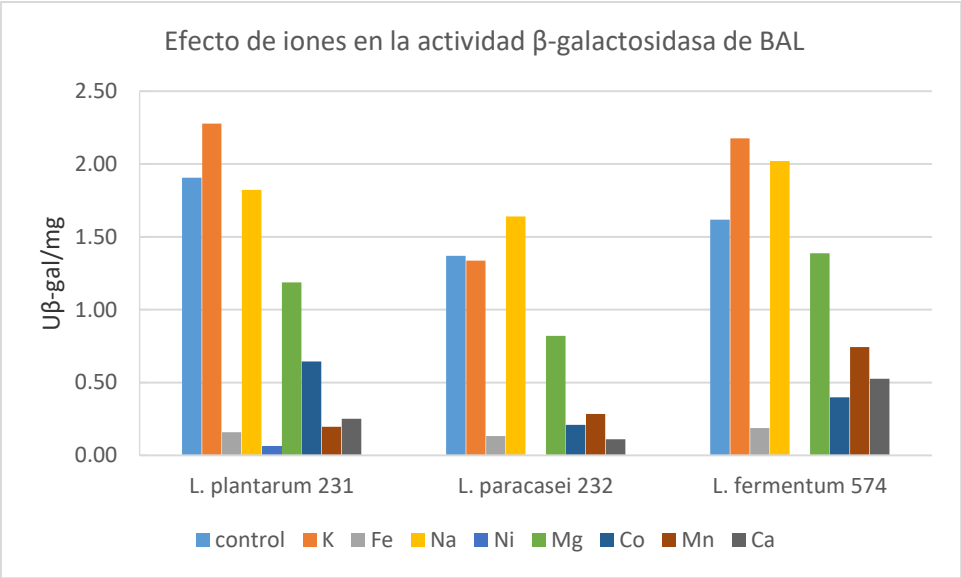

Figura 2: Efecto de iones inorgánicos en la actividad β-galactosidasa de bacterias lácticas

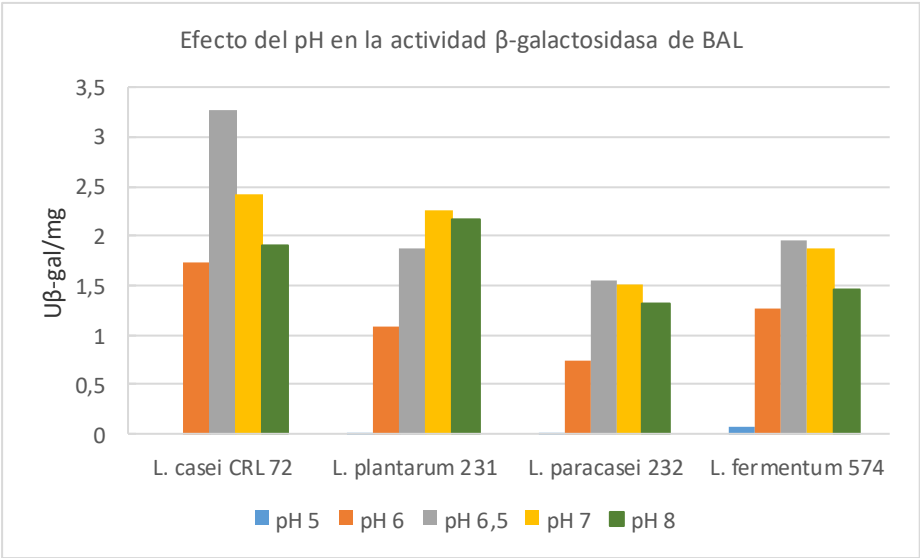

Figura 3: Efecto del pH en la actividad β-galactosidasa de bacterias lácticas.

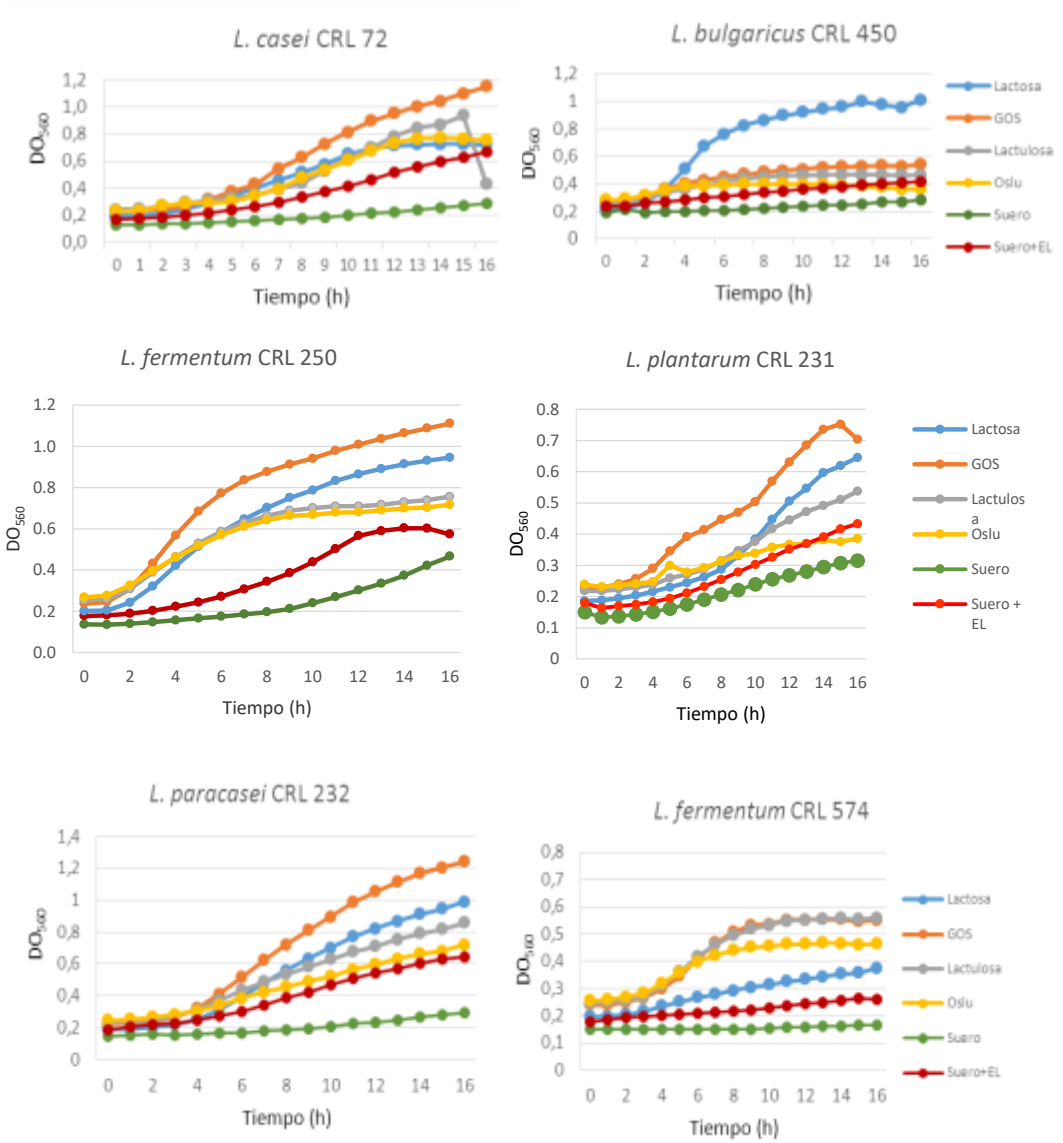

Figura 4: Crecimiento de bacterias lácticas a expensas de diferentes fuentes de carbono y energía que precisan la actividad de la enzima β-galactosidasa.

Tabla 1: Parámetros comparativos del crecimiento de BAL a expensas de diferentes fuentes de C que precisan actividad β-galactosidasa.

CEPA	***L. bulgaricus* CRL 450**			***L. plantarum* CRL231**			***L. paracasei* CRL 232**		
MEDIO	*μ (h^{-1})*	*Lag (h)**	*Estac.***	*μ (h^{-1})*	*Lag (h)*	*Estac .*	*μ (h^{-1})*	*Lag (h)*	*Estac*
Lactosa	0,119	1	13	0,048	2	16	0,077	3	+16
Lactulosa	0,028	1	9	0,025	2	+16	0,061	2	+16
GOS	0,024	1	11	0,042	2	15	0,089	2	15
Oslu	0,031	0,5	4	0,013	2	14	0,046	1	+16
Suero	0,006	6	16	0,015	2	+16	0,010	1	+16
Suero+EL	0,012	1,5	16	0,022	3	+16	0,035	2	15

*Tiempo en horas que permanece el microorganismo en fase de latencia.

** Tiempo en horas en el cual se alcanza la fase estacionaria del crecimiento.

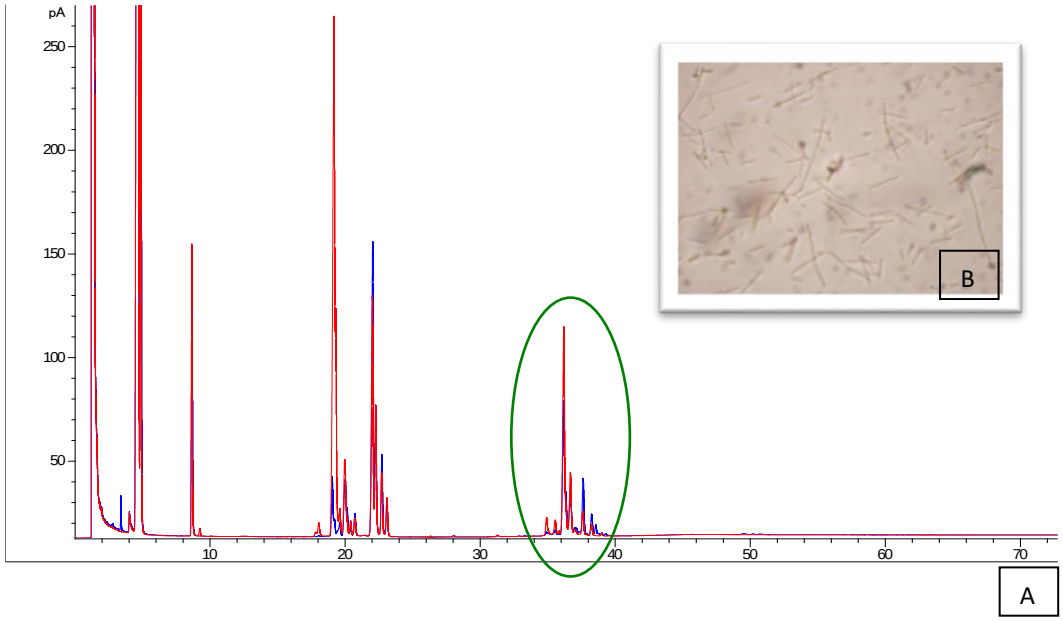

Figura 5: Panel A: Cromatograma de los carbohidratos presentes en la mezcla de reacción de L. bulgaricus CRL 450 con 30% de lactosa a 40°C, 24 horas. Panel B: Microfotografía óptica de L. bulgaricus CRL 450.

Como patrón general puede destacarse que la mayoría de las cepas presentó la mayor velocidad de crecimiento y biomasa final a expensas de GOS (μ: 0,024 a 0,089 h^{-1}). La única excepción fue *L. bulgaricus* CRL 450 que desarrolló significativamente mejor cuando lactosa fue el sustrato presente en el medio (μ: 0,119 h^{-1}). Por el contrario, el menor desarrollo se alcanzó como era de esperarse en permeado de suero, por cuanto se trata únicamente de una solución de lactosa y sales desprovista de fuentes de nitrógeno (μ: 0,012 a 0,035 h^{-1}). Este comportamiento mejoró al adicionar al mismo extracto de levadura en concentración de 5 g/L. Velocidades de crecimiento y biomasas intermedias se observó para todas las cepas cuando fueron inoculadas en medios con lactulosa y oligosacáridos derivados de la misma a excepción de *L. fermentum* CRL 574 que mostró este comportamiento a expensas de lactosa. No se observó relación entre la agrupación de las cepas por velocidad de hidrolisis y el crecimiento en los diferentes medios.

Síntesis de galactooligosacáridos (GOS) por bacterias lácticas

La capacidad de de sintetizar GOS a partir de lactosa fue evaluada por HPLC-RID en mezclas conteniendo 30% de lactosa en buffer fosfato pH 6,5 a 40°C y el ELC de *Lactobacillus bulgaricus* CRL 450 la cepa con mayor actividad hidrolítica β-galactosidasa. Como se observa en la figura 5, *L bulgaricus* CRL 450 fue capaz de sintetizar una concentración de 38% de GOS (di-, tri- y tetrasacáridos) en relación al total de azúcares presentes en la mezcla de reacción, mostrando mayor eficiencia que la β-D-galactosidasa presente en Lactozym (enzima comercial de *Kluyveromyces lactis*) usada como control. Estos resultados confirman la capacidad de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para producir galactooligosacaridos.

DISCUSIÓN

Las bacterias lácticas han sido utilizadas históricamente por la industria alimentaria como microorganismos fermentadores que transforman diferentes materias primas en alimentos con características organolépticas mejoradas y vida de estante prolongada por cuanto aportan diferentes metabolitos y actividades enzimáticas involucradas en la generación de compuestos de sabor, aroma, y biopreservantes. Sin embargo, en las últimas décadas, el interés en este grupo de microorganismos se ha ampliado a su posible aplicación como probióticos o generadores de prebióticos en nuevos alimentos funcionales. Existe a la fecha numerosa evidencia científica que avala sus efectos beneficiosos en la salud de los consumidores. Uno de los primeros efectos demostrados para los microorganismos probióticos es su capacidad para subsanar la intolerancia a la lactosa por cuanto pueden contribuir al metabolismo intestinal de este disacárido de la dieta mediante el aporte de su enzima β-galactosidasa al lumen intestinal para la hidrolisis *in situ* de la lactosa consumida (deVrese y col 2001; Montalto y col 2006). Al respecto, se ha difundido el empleo de leches fermentadas y no fermentadas con cepas de bacterias lácticas como *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus acidophilus* y cepas de bifidobacterias tanto de origen lácteo como intestinal ya que su enzima β-galactosidasa puede sobrevivir el pasaje por el tracto gastrointestinal para hidrolizar la lactosa *in vivo*

en el intestino delgado (Montes y col., 1995; Marteau y col., 1997; Savaiano y Levitt, 2000). Además algunos de estos microorganismos, como bifidobacterias y propionibacterias, pueden producir ácidos grasos de cadena corta en el colon que al ser absorbidos por la mucosa contribuyen a la recuperación de energía y la reabsorción de agua y sales; contrarrestando la diarrea osmótica que producen los azúcares no digeridos.

Sin embargo, más allá de su importancia en salud para subsanar la hipolactasia primaria, la principal aplicación de la β-galactosidasa es tecnológica ya que ha sido usada por largo tiempo como un importante biocatalizador en la industria láctea y en síntesis glicoquímica. Esta enzima puede catalizar dos reacciones básicas: **hidrólisis de lactosa** y galactósidos estructuralmente relacionados (propiedad en que se fundamentan los efectos antes mencionados); y **transgalactosilación**, en la que el grupo glucosilo de una o más unidades de galactosa es transferido al residuo de D-galactosa de la lactosa, resultando una mezcla de oligosacáridos con diferente grado de polimerización y configuración, conocida como **galactooligosaccharidos** o **GOS** (Otieno, 2010). Por definición los GOS son oligosacáridos formados por 1 molécula de glucosa y un número variable de unidades de galactosa (usualmente 2 a 10 moléculas) unidas generalmente por enlaces glucosídicos β(1–4) y β(1–6) y han sido reconocidos como **prebióticos,** es decir compuestos no digeribles que estimulan selectivamente el desarrollo de microorganismos benéficos en el colon**.**

En los últimos años, los estudios se han orientado a la búsqueda, purificación y caracterización de nuevas β-galactosidasas microbianas con alta eficiencia para hidrolizar pero también para transgalactosilar lactosa a los fines de obtener galactooligosacaridos para fines industriales y prebióticos. En este sentido se han descripto las condiciones óptimas de producción y la composición de las mezclas de oligosacaridos generados por *Apergillus oryzae* (Iwasaki y col 1996); *Bacillus circulans* (Yanahira y col., 1998; Li y col., 2009); *Bifidobacterium* (Rabiu y col., 2000; Hsu y col., 2007), *Lactobacillus reuteri* (Splechtna y col., 2006) y *L. plantarum* (Iqbal y col., 2010).

En el presente trabajo, se evaluó la actividad hidrolítica de un panel de bacterias lácticas pertenecientes a diferentes especies del genero *Lactobacillus* a los fines de seleccionar cepas que puedan ser usadas alternativamente para fines probióticos o prebióticos. Todas las cepas ensayadas mostraron actividad enzimática con diferente velocidad de hidrólisis, característica asociada a la cepa y no a su especie.

Dado que las condiciones del entorno pueden ser relevantes para la actividad enzimática, se evaluó el efecto del pH y la presencia de diferentes iones en las mezclas de reacción. En concordancia con lo informado para otras bacterias lácticas y microorganismos asociados como bifidobacterias y propionibacterias (Zárate y col., 2002; Nguyen y col., 2006), la máxima actividad se detectó en el rango de pH 6-8 con óptimo a pH 6,5 en la mayoría de las cepas. Los iones monovalentes Na^+ y K^+ actuaron como activadores enzimáticos al igual que lo observado para la β-gal de *L. reuteri, P. acidipropionici* y *E. coli*, mientras que Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, Ni^{2+}, Co^{2+} y Ca^{2+} inhibieron la actividad de todas las cepas en diferentes medidas. En este sentido se conoce que diferentes β-galactosidasas requieren iones

metálicos mono y divalentes para su estabilidad y actividad óptima aunque el papel exacto que cumplen en la catálisis no está del todo claro. Al respecto, un estudio estructural ha determinado sitios de unión para el Na^+ y Mg^{2+} en la proximidad del sitio activo de lacZ que serían consistentes con estabilización y actividad (Juers y col. 2000). Aunque se ha observado también en otros microorganismos la inhibición por Ca2+ (Garman y col 1996, Zárate y col. 2003) la funcionalidad de la β-gal en lácteos no se vería afectada por cuanto este ion se encuentra ligado a la caseína.

La evaluación de los sustratos apropiados que induzcan la actividad de la enzima β-galactosidasa y la generación de biomasa asociada a la misma también resulta un aspecto importante a considerar. En este sentido, el empleo de permeado de suero puede resultar una alternativa interesante por cuanto se trata de un efluente de la industria láctea con alta DBO que exige un urgente reaprovechamiento para evitar la contaminación del medioambiente. Todas las cepas mostraron escaso desarrollo en este medio, (lo cual es esperable considerando que se trata de una solución de lactosa y algunas sales pero desprovista de proteínas) el cual puede mejorarse mediante el agregado de alguna fuente nitrogenada como extracto de levadura o carne. Por el contrario, la mayoría de los microorganismos mostraron un alto desarrollo a expensas de GOS, lo cual puede ser relevante para la formulación de simbióticos (probióticos+prebióticos). Aun cuando en el mercado mundial se están comercializando como prebióticos un gran número de carbohidratos tales como inulina, fructooligosacáridos (FOS), lactulosa, galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS) y otros compuestos emergentes como pectooligosacáridos (POS), oligosacáridos de soja, isomaltooligosacáridos (IMOS), gluco-oligosacáridos, lactosacarosa (LS), entre otros, la evidencia científica en humanos solo ha permitido reconocer como seguros (GRAS status) a los fructanos (inulina y FOS), lactulosa y GOS (Aachary y Prapulla, 2011, Gänzle, 2012, Al-Sheraji y col., 2013; Tymczyszyn y col., 2014). Existe además el interés en desarrollar nuevos prebióticos con atributos deseables y mejorados que no están presentes en los prebióticos actualmente disponibles. En este contexto, la producción de compuestos prebióticos por bacterias con potencial probiótico resulta particularmente interesante por cuanto se ha observado que los oligosacáridos generados por estos microorganismos tienen selectividad específica. Estudios previos han demostrado que bifidobacterias y lactobacilos degradan con mayor eficiencia oligosacáridos con enlaces β(1-6) o β(1-3) y que de igual manera su **β-galactosidasa** sintetiza GOS con estos enlaces, lo que ejercería un efecto prebiótico dirigido sobre sus mismos géneros (Rastall y Maitin, 2002). A la fecha la posibilidad de dirigir intencionalmente los prebióticos a un grupo específico de bacterias como aquellas con reconocido potencial probiótico no ha sido estudiada en detalle y podría representar una alternativa futura promisoria. Al respecto, la capacidad de crecer bien usando GOS como fuente de carbono y la alta actividad β-galactosidasa fueron tomadas como criterio de selección para evaluar la actividad transglicosilasa. Entre las tres cepas evaluadas, solo *L. bulgaricus* CRL 450 fue capaz de sintetizar GOS a partir de 30% lactosa a pH 6.5 y 40°C, no detectándose esta propiedad en *L.*

acidophilus CRL 43 ni *L. casei* CRL 72. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*), es una bacteria termófila representativa del grupo de las bacterias lácticas de gran relevancia económica por aplicación mundial en la fabricación de yogurt y otros productos lácteos fermentados. Estudios previos han caracterizado la síntesis y actividad β-galactosidasa de otras cepas de *Lactobacillus delbruecki subsp. bulgaricus* (Itoh y col., 1980; Zhang y col., 2012, Nguyen y col. 2012), y determinaron el potencial de esta especie para la construcción de un sistema de suministro de β-galactosidasa grado alimentario al consumidor. Estos autores reportaron también, la elevada actividad transglicosilaasa de la β-galactosidasa de *L. bulgaricus* DSM 20081 con un máximo rendimiento de 50% de GOS aproximadamente a partir de una concentración inicial de lactosa 600 mM, resaltando el potencial de esta enzima para la producción de GOS.

En conclusión, se evaluó el comportamiento de un panel de bacterias lácticas para la selección de aquellas con potencial para ser empleadas con fines probióticos y/o prebióticos. Una cepa de *L. bulgaricus* mostró potencial para estas aplicaciones y amerita estudios tecnológicos más profundos que permitan determinar las condiciones óptimas para la sintésis de la enzima y oligosácaridos de interés como así también la relevancia biológica de los mismos.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el marco del Proyecto IC504, convocatoria 2014 del Instituto de Competitividad de la Universidad de San Pablo Tucumán.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aachary AA, Prapulla SG (2011) Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 2-6.
- Al-Sheraji SH, Ismail A, Manap MY, Mustafa S, Yusof, RM, Hassan FL (2013) Prebiotics as functional foods: A review. *J Func Foods* 5: 1542-1553.
- Aureli P, Capurso L, Castellazzi AM, Clerici M, Giovannini M, Morelli L, y col. (2011) Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacol Res 63:* 366-376.
- Barayni, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology, 23, 277e294.
- Barreteau H., Delattre C. & Michaud P. (2006). Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technol Biotechnol*, 44, 323-333.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 72, 248-254.
- Cesca, B.; Manca De Nadra, M. C.; Strasser De Saad, A. M.; P. De Ruiz Holgado, A. and Oliver, G. (1984). β-D-galactosidase of *Lactobacillus* species. Folia Microbiol. , 29, 288-294

- de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. (2001). Probiotics--compensation for lactase insufficiency. Am J Clin Nutr. 73 (2 Suppl):421S-429S. Review
- FAO/WHO (2002) Probiotics in Foods. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf
- Gänzle M (2012) Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *Int Dairy J* 22: 116-122.
- Garman, J.; Coolbear, T.; Smart, J. (1996). The effects of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalyzed by *â*-galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Appl.Microbiol. Biotechnol*., *46*, 22-27.
- Gosling, A., Stevens, G.W., Barber, A.R., Kentish, S.E., Gras, S.L. (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121: 307–318.
- Huang, D. Q.; Prevost, H. and Divies, C. (1995). Principal characteristics of β-galactosidase from *Leuconostoc* spp. Int. Dairy Journal, 5, 29-43.
- Hsu, C.A.; Lee, S.L and C. C. Chou (2007). Enzymatic Production of Galactooligosaccharides by *â*-Galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. J. Agric. Food Chem. 55, 2225-2230
- Iqbal S., Nguyen, T.; Nguyen, T.; Maischberger, T.; and D. Haltrich (2010). β-Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. Carbohydrate Research 345: 1408–1416.
- Itoh, T.; Ohhashi, M.; Toba, T. and Adachi, S. (1980). Purification and properties of β-galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus* . Milchwissenschaft 35, 593-597.
- Iwasaki, K., Nakajima, M., Nakao, S. Galacto-oligosaccharide Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using β-Galactosidase. Process Biochem.1996; 31 (1): 69 – 76.
- Juers, D. H.; Jacobson, R. H.; Wigley, D.; Zhang, X. J.; Huber, R. E.; Tronrud, D. E.; Matthews, B. W. (2000). High-resolution refinement of *β*-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides structural basis for α-complementation. *Protein Sci.*, *9*, 1685-1699
- Li, W., Xiang, X.; Tang, S. Hu, B.; Tian, L.; Sun, Y.; Ye, H. and X. Zeng (2009). Effective Enzymatic Synthesis of Lactosucrose and Its Analogues by β-D-Galactosidase from *Bacillus circulans* J. Agric. Food Chem. 57, 3927–3933.
- Marteau, P.; Vesa, T. and Rambaud, J. C. (1997). Lactose maldigestion p 65-88. In: R.Fuller (ed.), Probiotics 2: Applications and practical aspects. Chapman & Hall, London UK.
- Montes, R. G.; Bayles, T. M.; Saavedra, J. M. and Perman, J. A. (1995). Effect of milks Inoculated with *Lactobacillus acidophilus* or a yogurt

starter culture in lactose Maldigesting children. J. Dairy Sci. 78, 1657-1664.

- Montalto M, Curigliano V, Santoro L, Vastola M, Cammarota G, Manna R, Gasbarrini A, Gasbarrini G. (2006). Management and treatment of lactose malabsorption. World J Gastroenterol. 4;12(2):187-91.
- Nguyen et al 2006 Nguyen, T.-H.; Splechtna, B.; Steinböck, M.; Kneifel, W.; Lettner, H. P.; Kulbe, K. D.; Haltrich, D. Purification and characterization of two novel β-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 4989−4998
- Nguyen, T., Nguyen, H.A., Arreola, S.L., Mlynek, G., Djinovic-Carugo, K., Mathiesen, G. Nguyen, T., Haltrich, D. (2012). Homodimeric β-Galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081: Expression in *Lactobacillus plantarum* and Biochemical Characterization. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 1713−1721
- O'Connell, S., Walsh, G. (2010). A novel acid-stable, acid-active *β*-galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 86: 517–524.
- Otieno D.O. (2010). Synthesis of b-galactooligosaccharides from lactose using microbial b-galactosidases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 471–482
- Rabiu, B., Jay, A., Gibson, G.R., Rastall, R.A. (2000). Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by β-galactosidases from *Bifidobacterium* species. *Appl Environ Microbiol*. 67: 2526 – 2530.
- Rastall R, Maitin V (2002) Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr Op Biotechnol* 13, 490–496.
- Raibaud, P.; Caulet, M.; Galpin, J.V. and Mocquot, G. (1961) Studies on the bacterial flora of the alimentary tract of pigs II. Streptococci: selective enumeration and differentiation of the dominant group. *Journal of Applied Bacteriology* 24, 285 – 291.
- Roberfroid M (2007) Prebiotics: The Concept Revisited. *J Nutr* 137: 830-837.
- Savaiano, D. A.; Levitt, M. D. (2000). Lactose Intolerance. In: Handbook of Dairy Foods and Nutrition. Second Edition, CRC Press LLC.: 311-354.
- Splechtna, B., Nguyen, TH., Haltrich, D. Production of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides from Lactose using β-Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. J.Agric. Food Chem 2006; 54: 4999-5006.
- Tymczyszyn E.E., Gerbino E., Illanes A. & Gómez-Zavaglia A. (2011). Galactooligosaccharides as protective molecules in the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Cryobiology*, 62, 123-129.
- Yanahira S, Yabe Y, Nakakoshi M, Miura S, Matsubara N, Ishikawa H. (1998). Structures of novel acidic galactooligosaccharides synthesized by Bacillus circulans beta-galactosidase. Biosci Biotechnol Biochem. 62(9):1791-1794.
- Yeoman CJ, White BA (2014) Gastrointestinal Tract Microbiota and

Probiotics in Production Animals. *Annu Rev Anim Biosci 2:* 469–486.

- Zárate y col., 2003; Zárate G, Perez Chaia A, Oliver G (2003) Some Characteristics Of Practical Relevance Of β-Galactosidase From Potential Probiotic Strains Of *P. acidipropionici*. *Anaerobe* 8: 259-267.
- Zárate, G., Saez, G., Pérez Chaia, A. (2013). Microbial transformation of lactose: potential of β-galactosidases for probiotic and prebiotic purposes. En: *L*actose: structure, food industry applications and role in disorders. (Eds: David Green and Emma Lee). ISBN: 978-1-62808-198-5 Nova Science Publishing, USA.
- Zhang, W., Wang, C., Huang, C., Yu, Q., Liu, H., Zhang, C., Pei, X., Xu, X., Wang, G. (2012). Analysis of b-galactosidase production and their genes of two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol Lett.* 34:1067–1071

Artículo breve

ELABORACIÓN DE BIOPLÁSTICO DE ALMIDÓN DE MAÍZ

ELABORATION OF CORN STARCH BIOPLASTIC

Viollaz, C[1]; González, K[1]; Ponce, J[1]; Rojas, M[1]; Lisiak, I[1].

[1] Universidad de San Pablo-Tucumán, Av. Solano Vera y Camino a Villa Nougués, San Pablo.

*Autor de correspondencia: arqviollaz@gmail.com

RESUMEN

El presente trabajo presenta los avances de experimentación del proyecto de investigación interdisciplinario "Elaboración y caracterización físico química de bioplástico y evaluación de sus posibilidades de aplicación a productos industriales". El mismo surgió como fruto de las inquietudes y experiencias académicas diversas pero con objetivos convergentes, realizadas dentro de dos Institutos de la Universidad de San Pablo-T: el Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial (IC) (carrera de Lic. en Ciencias y Tecnología de los Alimentos); y el Instituto de Diseño, Estrategia & Creatividad (DIS) (Lic en Diseño Industrial). El objetivo es experimentar en la generación de un material biodegradable con características físico químicas similares a los plásticos derivados del petróleo, que pudiera ser utilizado para la elaboración de productos industriales, con el fin de reducir el impacto ambiental de los residuos sólidos urbanos, ya que se disminuiría la proporción no degradable de los mismos. La riqueza y fortaleza de la esta investigación radica en la participación de profesionales de diversas disciplinas lo cual permite abordar la temática desde diferentes puntos de vista y buscar soluciones conjuntas a las problemáticas encontradas en las diferentes escalas de trabajo.

Palabras claves: biodegradable, producción sustentable, ecodiseño.

SUMMARY

The present work presents the experimental advances of the interdisciplinary research project "Elaboration and physical chemical characterization of bioplastics and evaluation of their possibilities of application to industrial products". The same emerged as a result of the different academic concerns and experiences, but with convergent objectives, carried out within two Institutes of the University of San Pablo-T: the Institute of Development and Technological Innovation for the Territorial Competitiveness (IC) (Lic. Science and Technology of Food); and the Institute of Design, Strategy & Creativity (DIS) (Lic in Industrial Design). The aim of this work is to experiment in the generation of a biodegradable material with physical chemical characteristics similar to petroleum-based plastics, which could be used for the production of industrial products, in order to reduce the environmental impact of urban solid waste, since the non-degradable proportion of them would be reduced. The richness and strength of this research lies in the participation of professionals from different disciplines which allows to approach the theme from different points of view and seek joint solutions to the problems encountered in the different scales of work.

Key words: biodegradable, sustainable production, ecodesign.

INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria no solo se dedica a la fabricación de alimentos. Desde hace algunos años surgió una necesidad de crear materiales biodegradables a partir de alimentos. Por otra parte, dentro de los procesos industriales se está trabajando en el ámbito del diseño sustentable con la totalidad del proceso productivo, en el cual, la obtención de la materia prima y el proceso de descarte de los productos una vez utilizados conforman un importante porcentaje del impacto ambiental de la producción; por ello, el uso de materiales biodegradables representa un avance muy importante en aras de lograr una producción sustentable y sostenible.

El bioplástico es un material polímero fabricado a partir de materias primas naturales (como azúcar, almidón, celulosa, patatas, cereales, melaza, aceite de soya, maíz, etc.), que son procesadas por organismos vivos (hongos, bacterias o algas), por lo que casi no produce contaminación en su producción. Su origen vegetal les otorga la característica de biodegradable por lo tanto disminuyen la contaminación. El bioplástico emite entre 0,8 y 3,2 toneladas menos de CO_2 por tonelada.

Plásticos derivados del petróleo y bioplásticos

Los plásticos tradicionales, producidos a partir del petróleo, son utilizados ampliamente debido a sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas. Sin embargo, el elevado costo del petróleo, su agotamiento futuro y la escasa degradabilidad de los petroplásticos ha hecho que se busquen alternativas a estos.

Los bioplásticos son polímeros que provienen de fuentes naturales y renovables. La mayoría presentan mejor biocompatibilidad, y todos son biodegradables por microorganismos como bacterias, hongos, algas.

Los primeros en popularizarse fueron los bioplásticos vegetales, fabricados a partir de almidón de patata, maíz o yuca. Sus polímeros de glucosa sirven para que, tras un proceso de extrusión y otros tratamientos acaben convirtiéndose en material para cubiertos, envases o bolsas.

Los ácidos polilácticos (PLA) son producidos a partir de ácido láctico polimerizado, el cual proviene de la fermentación de bacterias lácticas con almidón de maíz. Se utilizan como capas de sellado térmico, etiquetas y bolsas de transporte, como alternativa para películas tradicionales y para la producción de envases rígidos

Propiedades de los bioplásticos obtenidos a partir de almidón

Existen varias propiedades que posee el almidón y que determinan la forma en que debe tratarse, según el uso para el que se le requiera.

Gelatinización

Se define como la pérdida de la semicristalinidad de los gránulos de almidón en presencia de calor y altas cantidades de agua, con muy poca o ninguna ocurrencia de despolimerización. La gelatinización ocurre en un rango estrecho de temperaturas que varía dependiendo de la fuente del almidón.

La movilidad térmica de las moléculas y la disolución debida al hinchamiento generan una disminución de la cristalinidad por el desenrollado de las dobles hélices, hasta que la estructura granular se fragmenta casi por completo. La viscosidad de esta mezcla depende de la concentración y de la absorción de agua por parte del almidón. Cuando ocurre la gelatinización, los gránulos hinchados del almidón ocupan los espacios vacíos. La viscosidad aumenta con la temperatura hasta la fragmentación de los gránulos, que se desintegran y se disuelven generando un decrecimiento en la viscosidad.

Pero en condiciones de alta concentración de almidón, como suele suceder cuando se pretende obtener un almidón termoplástico, el comportamiento es diferente. Mientras más rigidez haya, se da una mayor resistencia debido al choque entre los gránulos hinchados, lo que genera una alta viscosidad. En estas condiciones, cuanto más calor se adiciona, el agua retenida desintegra la estructura ordenada de los gránulos, y la amilosa comienza a difundirse formando un gel que finalmente soporta los gránulos compuestos ante todo por amilopectina.

Retrogradación

Posterior a la gelatinización, en el momento en que deja de introducirse calor y comienza la etapa de enfriamiento, la viscosidad crece de nuevo y se presenta el fenómeno denominado retrogradación. La retrogradación se define como un incremento espontáneo del estado del orden, es decir, una reorganización de los puentes de hidrógeno y reorientación de las cadenas moleculares. Paralelamente se genera un decrecimiento de la solubilidad en el agua fría y un incremento de la turbiedad

Desestructuración

La desestructuración del almidón nativo consiste en la transformación de los gránulos de almidón cristalino en una matriz homogénea de

polímero amorfo, acompañada por un rompimiento de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de almidón, de un lado, y la despolimerización parcial de las moléculas, del otro. El proceso de desestructuración puede generarse por la aplicación de energía al almidón. Los factores químicos y físicos involucrados son temperatura, esfuerzo cortante, como el que genera una máquina tradicional para trabajar plásticos como las extrusoras e inyectoras, tasa de esfuerzo, tiempo de residencia, contenido de agua y cantidad de energía aplicada.

Biodegradabilidad

La biodegradabilidad como la capacidad de un material de descomponerse en dióxido de carbono, metano, agua y componentes orgánicos o biomasa, en el cual el mecanismo predominante es la acción enzimática de microorganismos. En general, un polímero es biodegradable si su degradación resulta de la acción natural de microorganismos como bacterias, hongos y algas. Existen varios factores requeridos para que pueda darse un proceso de biodegradación: presencia de microorganismos, presencia de aire (en caso de que se requiera), humedad y minerales necesarios, temperatura adecuada dependiendo del tipo de microorganismo (entre 20 °C y 60 °C) y un valor de pH adecuado (entre 5 y 8).

Descripción de la experiencia

Este estudio se encuadra dentro de lo que se considera un trabajo de desarrollo, es decir, una investigación dedicada a completar, desarrollar y perfeccionar nuevos materiales, productos o procedimientos.

El objetivo principal del mismo es desarrollar experimentalmente una fórmula de bioplástico que permita su utilización para la fabricación de productos industriales.

Para ello se realizaron fichas técnicas con diferentes combinaciones y proporciones de materiales aptos para la producción de bioplásticos, priorizando aquellos que se producen en la provincia; se documentó las propiedades físicas y químicas del bioplástico obtenido, así como su durabilidad y degradación en el tiempo. Actualmente se está evaluando las posibilidades de su ejecución a escala industrial, así como las alternativas de procesamiento y tratamiento como parte de un producto (soldado, pegado, cosido, etc). La experiencia se realiza en su totalidad dentro de la Universidad de San Pablo T y está en proceso de ejecución, habiéndose cumplimentado los objetivos previstos hasta la fecha. Participan en la misma, docentes de la carrera de Diseño Industrial (Arquitecta, Diseñadora Industrial, estudiantes) y de la Lic en Cs y Tec. de los Alimentos (Bioquimica, Mg en Ing Ambiental, Lic en Cs y Tec de los Alimentos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo de investigación se organizó en las siguientes etapas:

1. *Observación y experimentación*

En base a una investigación de diferentes composiciones para la producción de Bioplásticos, se seleccionó el almidón de maíz como componente esencial para la producción. Se conformaron muestras en 3 diferentes morfologías: filar, laminar y volumétrica. Se comprobaron los métodos más apropiados de elaboración y se verificaron los tiempos de degradación de los distintos materiales de conformado y morfologías. Para reconocer las diferentes composiciones y poder realizar tareas de análisis y comprobación se utilizaron pigmentos colorantes en las muestras.

Producción de láminas y placas

La desestructuración se comienza en un molino abierto y se continúa ya sea en la inyectora o en la prensa de vulcanización. En la actualidad se produce en el molino se trabaja a 24 rpm con una relación de velocidad entre rodillos de 1,08 a 1 y los rodillos totalmente cerrados a una temperatura promedio de 100 °C. En el molino se obtienen láminas, gracias a que la mezcla polimérica hace banda, es decir, se adhiere a las paredes del rodillo y se convierte en películas.

A estas láminas se las sometió a diferentes esfuerzos (tracción, compresión, etc), tanto en la conformación laminar como en la filar y volumétrica, registrando las características en cada caso. Por otro lado, se colocó parte de la muestra en diferentes medios de degradación: una muestra sumergida en agua, otra en tierra y la tercera entre algodones húmedos (figura 2).

Se realizó registro de la evolución de estas muestras a lo largo de nueve meses y se constató la capacidad de biodegradación de este material. Se consignó el tipo de hongo desarrollado en cada caso (fig Nº3).

Figura 1 – Lámina de bioplástico

Figura 2 – Degradación del bioplástico en agua, en tierra y en un medio sometido a humedad y expuesto al aire.

Figura 3 – Cada muestra con el trascurso del tiempo desarrolló diferentes tipos de hongos y fue perdiendo cualidades físicas a medida que se iba degradando.

2. *Generalización: enunciación de definiciones, reglas, leyes y teorías.*

Se realizaron fichajes de los resultados, tanto de proporciones de materiales como de los resultados de secado y degradación, registrándose los parámetros de la muestra como ambientales (temperatura ambiente, humedad, etc.).
El protocolo de registro se completa con planillas que en las que se adjuntan imágenes y datos de los cambios en los parámetros a lo largo del tiempo, con el fin de lograr una caracterización físico-química del material obtenido tanto en cuanto a sus prestaciones como en cuanto a su capacidad de biodegradación.

3. *Caracterización de los pasos*

Se desagregó la secuencia de elaboración con las características de cada etapa con el fin de contar con una guía para la etapa de elaboración indutrializada del biopalstico.

Paso 1: Medición de los ingredientes.

La elaboración de un material homogéneo exige un riguroso control de las cantidades de cada componente en la mezcla con el fin de lograr idénticas características físicas en cada materia prima. La experimentación dejó constancia de que pequeñas variaciones en las cantidades de materiales generaban variaciones considerables en los resultados. Se debería en esta etapa contar con un proceso automatizado de precisión.

Paso 2: Cocción de los ingredientes.

Para integrar todos los ingredientes que conforman la materia prima los mismos se deben calentar y mezclar constantemente durante aproximadamente 5 a 7 minutos dependiendo de las características físicas que presente el ambiente donde se está trabajando, principalmente la humedad en el mismo. La temperatura de cocción ronda los 250 a 400 °C.

Las experiencias se realizaron en laboratorio utilizando un mechero con medidor de temperatura y un difusor en la base del recipiente para poder calentar toda la superficie de manera pareja.

Producción industrial: Para esta etapa se debería contar con un ambiente con humedad y temperatura controlada en el que se instalaría una fuente de calor constante a 300°C sobre la cual se colocaría un contenedor de material cuya superficie sea absolutamente lisa, sin porosidad alguna (aluminio, vidrio, cerámica). Dentro de la misma se deben mezclar los ingredientes de manera constante y continua de manera que el calor se distribuya de manera homogénea en toda la mezcla. El tiempo de mezclado será de 5 a 7 minutos.

Paso 3: Colocación de la mezcla resultante en placas

En esta etapa se coloca la mezcla resultante de la cocción en placas de un material sin porosidades y que no tenga un contraste térmico importante con la masa para evitar que la superficie se fragmente. Debe definirse un sistema de división que garantice que las cantidades de material sean siempre las mismas.

Paso 4: Amasado o prensado de la masa

La generación de láminas se podrá lograr por amasado con una superficie lisa engrasada o por prensado.

En la experiencia de laboratorio se empleó tanto un cilindro de madera como una varilla de vidrio templado. Con esta última se obtuvo un mejor resultado.

Pensando en una etapa industrial de la producción, hay dos métodos que resultarían óptimos para esta etapa del proceso, podría realizarse mediante rodillos enfrentados, similares a los utilizados en la producción de pastas. Los materiales apropiados serían aluminio, acero o en lo posible vidrio. Y un segundo método seria mediante la compresión de la masa utilizando una prensa hidráulica en la cual se pueda regular la presión con la que se comprimiría hasta un mismo espesor.

Paso 5: Secado de la lamina

Es importante que las láminas se sequen sobre una superficie no porosa, y en un ambiente libre de polución, con humedad y temperatura controlada, ya que un pequeño cambio ya sea en la temperatura o en la humedad cambiaría la porosidad y las características físicas y químicas del material.

En la etapa de laboratorio se utilizó tanto una estufa como un horno especial en el cual se puede regular de manera precisa la temperatura y la humedad dentro del mismo, de esta manera se obtuvieron muy buenos resultados, a una temperatura constante de 30°C por aproximadamente 12 horas.

Pensando en una etapa industrial, seria optimo tener una habitación en la cual se puedan regular la temperatura y la humedad para dejar las láminas en la misma y así darle las condiciones perfectas para que el material se seque correctamente y así obtener siempre un material óptimo para su utilización. Es

importante tener en cuenta que es un material que en presencia de humedad el mismo comienza a descomponerse es por esto que el ambiente debe estar necesariamente con la humedad controlada constantemente.

CONCLUSIONES

La difusión de los resultados obtenidos y el análisis de las posibles aplicaciones del plástico biodegradable en productos de diseño industrial forman parte de los nuevos conocimientos que se busca difundir mediante este trabajo. La experiencia realizada ha sido muy rica no sólo por los resultados obtenidos hasta el momento sino también por el intercambio de inquietudes e ideas entre los participantes de la misma. Resulta destacable la importancia de continuar en esta línea de investigación en vista de las enormes posibilidades que ofrece en el ámbito de la producción la elaboración de productos con materiales biodegradables, no sólo desde el punto de vista del agregado de valor a materias primas como el almidón de maíz sino fundamentalmente en cuanto a sus posibilidades de comercialización en el ámbito mundial en el marco de un planeta que cada vez precisa nuevas soluciones a los problemas de la contaminación y el procesado de Residuos Sólidos Urbanos.

Bibliografía

González, G. 2010. Residuos sólidos urbanos: Tratamiento y disposición final. Situación actual y estrategias. Cámara Argentina de la Construcción. Informe oficial.

Boletín Técnico Informativo Nº13. *Gestión de los residuos plásticos domiciliarios en la Argentina, Estados Unidos y Europa.* Plastivida, Argentina.

Bioplastics. worldcentric. http://worldcentric.org/biocompostables/bioplastics

ConAgra Switches to Bioplastic Film for Butter, Whipped Cream. Greener Design. March 23, 2009. http://www.greenerdesign.com/news/2009/03/23/conagra-switches-bioplastic-film-butter-whipped-cream

Eco-plastic. ACF News Source. Nov. 19, 2002. http://www.acfnewsource.org/environment/eco-plastic.html

LaMonica, Martin. “Start-up Novomer uses CO2 to make biodegradable plastics. CNET News Green Tech. Nov. 7, 2007. http://news.cnet.com/8301-11128_3-9811962-54.html

New Bioplastic Manufacturing Process Lowers Emissions, Energy. Greener Design. Feb. 12, 2009. http://www.greenbiz.com/news/2009/02/12/bioplastic-manufacturing-lowers-emissions

Teschler, Leland E. ¿How “green” are green plastics? Machine Design. May 24, 2007. http://machinedesign.com/article/how-green-are-green-plastics-0524

Artículo breve

UTILIZACIÓN DE ALBEDO DESHIDRATADO DE CITRUS PARA CLARIFICACIÓN DE EFLUENTES

USE OF CITRUS DEHYDRATED ALBUM FOR EFFLUENT CLARIFICATION

González K.[1*], Juárez C.[1], Federico M.L.[1], Cabezas C.[1]

[1] Universidad de San Pablo-Tucumán, Av. Solano Vera y Camino a Villa Nougués, San Pablo.

*Autor de correspondencia: kgonzalez@uspt.edu.ar

RESUMEN

De la industrialización del limón se obtienen muchos subproductos como el jugo concentrado, aceite esencial, cáscara deshidratada y cáscara húmeda. En este trabajo se utilizó el albedo deshidratado de limón para clarificar efluentes, aprovechando la capacidad de absorción de la pectina allí presente. Este residuo de la industria del limón se exporta como alimento para animales. Para su obtención se extrajo el jugo de limón dejando libre el albedo. Posteriormente se lo secó en una estufa a una temperatura de 60ºC durante 24 hs para luego triturarlo, obteniéndose diferentes granulometrías: 54 % 2 mm, 36% 1 mm y 10% 0,5 mm. El polvo de albedo de distintas granulometrías se colocó en 3 cubas de vidrio de 20 litros. Para evaluar su poder clarificante, se midió la densidad óptica (DO) a 350 nm de longitud de onda (λ) a las 24, 48 y 72 hs luego de poner en contacto con el efluentes; observándose un descenso abrupto de la DO a las 24 hs y permaneciendo casi constante a las 48 y 72 hs de tratado el efluente. El mayor poder clarificante se observó en la granulometría de 0,5 mm; efecto causado por parámetros relacionados con el tamaño y forma de las partículas, como por ejemplo la estabilidad, sabor, color, absorción, velocidad de disolución, uniformidad de contenido de la forma. La reactividad de estos polvos viene dada por la superficie específica, a menor tamaño de partícula mayor superficie, mayor velocidad de disolución, mayor absorción; por lo tanto, aumenta la reactividad del polvo y posee mayor poder clarificante que se observa luego de transcurridos 25 minutos. Las otras granulometrías también resultaron aclarantes de los efluentes pero después de transcurridas 24 hs, ninguna de las tres cubas presentó mal olor. Sin embargo, se observó crecimiento de hongos pasadas las 72 hs en las cubas conteniendo partículas de 1 y 2 mm, no así en las de granulometría de 0,5 mm.

Palabras clave: albedo de limón, efluentes, pectina.

SUMMARY

Many by-products are obtained from the industrialization of lemon, such as concentrated juice, essential oil, dehydrated peel and wet peel. In this work, dehydrated lemon peels was used to clarify effluents taking advantage of the absorption capacity of pectin present in this lemon fraction. This by-product of the lemon industry is exported as animal feed. To obtain the dehydrated lemon peels, juice was extracted from fresh lemons leaving the pells free. Subsequently, the peels were dried in a stove at 60 °C for 24 h and then grinded obtaining different granulometries: 54% 2 mm, 36% 1 mm and 10% 0.5 mm. The pells powder of different granulometries was placed in 3 glass buckets of 20 liters. To evaluate its clarifying power, the optical density (OD) at 350 nm wavelength (λ) was measured 24, 48 and 72 h after being put in contact with the effluents, observing an abrupt decrease of DO at 24 hours and remaining almost constant at 48 and 72 h after treatment of the effluent. The greater clarifying power was observed in the granulometry of 0.5 mm; effect caused by parameters related to the size and shape of the particles, such as stability, taste, color, absorption, dissolution rate, uniformity of content of the form. The reactivity of these powders is given by the specific surface area, the smaller the particle size, the higher the surface area, the higher the dissolution rate, the higher the absorption. Therefore, it increases the reactivity of the powder and has superior clarifying power that is observed after only 25 minutes. The other granulometries also clarified the effluents but after 24 hours. Even though none of the three buckets had bad smell, fungi growth was observed after 72 h in the buckets containing particles of 1 and 2 mm, but not in that with a particle size of 0.5 mm.

Key words: lemon peels, effluent, pectin.

INTRODUCCIÓN

Tucumán cuenta en la actualidad con seis plantas industrializadoras de limón que procesan aproximadamente 700.000 toneladas por año. Estas plantas operan como complejos integrados en la elaboración de jugo concentrado y aceite esencial cáscara deshidratada y jugos clarificados. En la actualidad, el albedo de limón es destinado a la alimentación animal y muchas industrias lo acumulan a cielo abierto para tratamientos de compost y lombricultura, lo que ocasiona contaminación del suelo y mantos freáticos, y se manifiesta con un fuerte olor en cursos de aguas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad de absorción del albedo de limón para clarificar efluentes, como un aporte a problemas ambientales de la industria citrícola.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de albedos fueron obtenidas por donación de la empresa de Citrusvil S.A. y otras de forma comercial. Ambos albedos fueron una mezcla de diferentes variedades de limón cosechados en la provincia de Tucumán. Se obtuvo una cantidad de 500 gr de albedos húmedos, los cuales fueron secados a 60ºC durante 12 hs. Esta temperatura es ideal para impedir la desnaturalización de la pectina. Posteriormente al secado se obtuvo 78,4 gr de albedo seco. Luego el albedo deshidratado fue triturado, tamizado en mallas de 2 mm, 1 mm y 0,5 mm .Para realizar el tratamiento de efluente se colocó en 3 cubas de retención 20 litros de efluente con los albedos de distintas granulometrías . Se midieron las Absorbancias a 350 nm de longitud de onda en tiempos de 24 hs, 48 hs y 72 hs de tratamiento.

RESULTADOS

Se realizaron determinaciones de absorbancia una longitud de onda de 350 nm a las 24, 48 y 72 hs luego del tratamiento del efluente con el albedo deshidratado de citrus. Como puede observarse (Graf. Nº 2) la mayor disminución se produjo dentro del período de 24 a 48 hs. El albedo deshidratado de 0,5 mm fue el que más clarifico el efluente. La granulometría de 2 mm y el de 1 mm del albedo deshidratado también se produjo en forma menos notable en comparación con la de 0,5 mm.

Figura 1 -Albedo Deshidratado con distintas granulometrías (de izquierda a derecha: 0.5, 1, 2 mm)

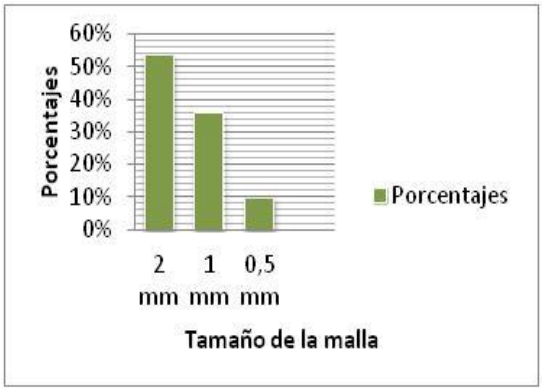

Figura 1. Resultados de granulometría

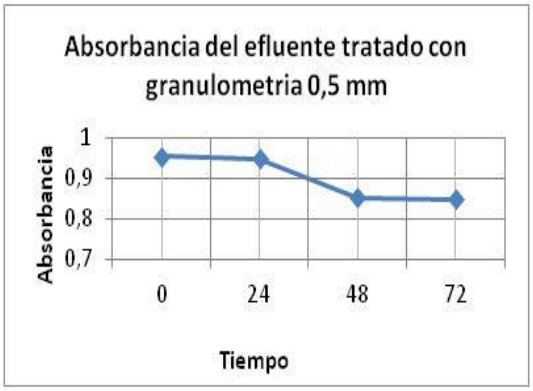

Figura 2. Absorbancias del efluente tratado con granulometría 0,5 mm

Tabla Nº1-Parámetros	Valores
Volumen (L)	20
Temperatura(°C)	18°C
pH	8,4
DQO(mgO_2/L)	585
DBO_5(mgO_2/L)	300
Sólidos Sedimentables(mm/L)	6,98

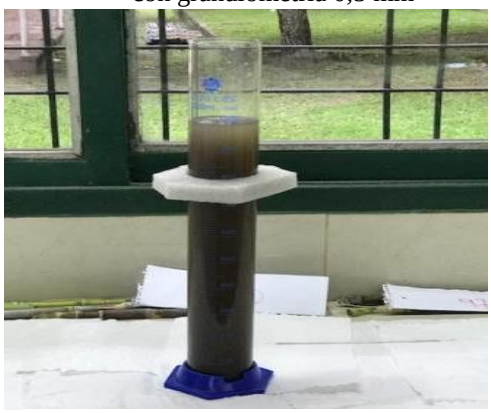

Figura 3. Efluente domestico a tratar

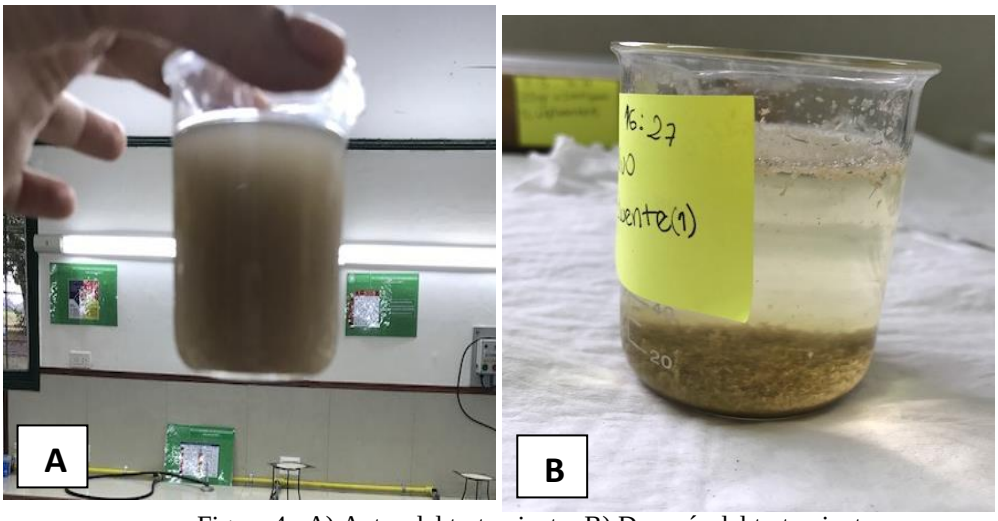

Figura 4. A) Antes del tratamiento, B) Después del tratamiento

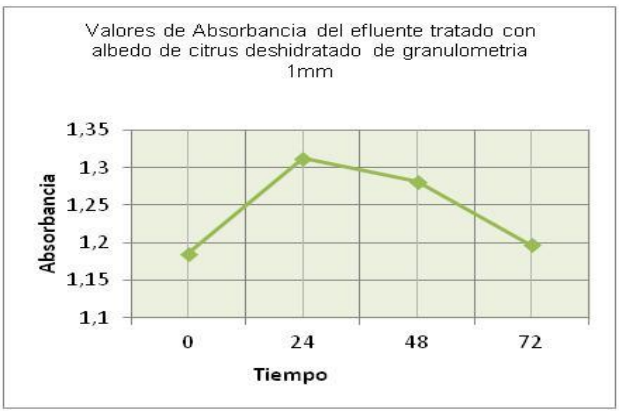

Figura 5. Absorbancias del efluente tratado con granulometría 1 mm

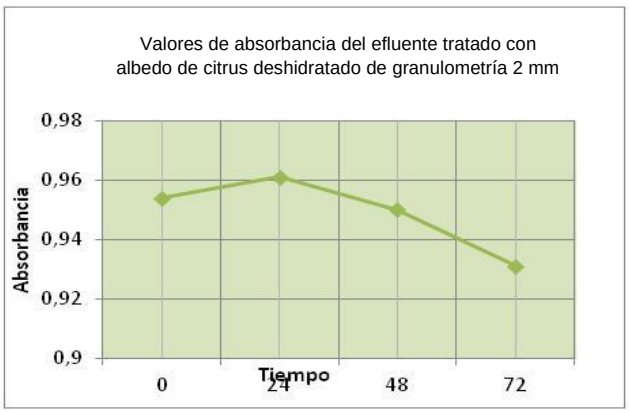

Figura 6. Absorbancias del efluente tratado con granulometría 2 mm

CONCLUSIONES

El efluente tratado con el albedo de citrus deshidratado (0,5 mm) se clarificó en un tiempo de 25 minutos disminuyendo considerablemente la turbidez, esto no se observó en las cubas cuya granulometría fue de 1 mm y 2 mm donde el tiempo de clarificado fue superior. Un color amarillento débil se tornó a medida que pasaron los días el efluente posiblemente por la xantofila presente en el albedo de limón. Se observó la formación de hongos excepto en la de 0,5 mm pasadas las 72 horas del tratamiento. Es muy probablemente que en el periodo de 72 hs la pectina del albedo este saturada por lo cual no clarifica más.

El fenómeno observado en esta granulometría (0,5 mm) hay parámetros relacionados con el tamaño y forma de las partículas por ejemplo la estabilidad, sabor, color, absorción, velocidad de disolución, uniformidad de contenido de la forma.

La reactividad de estos polvos viene dada por la superficie específica, a menor tamaño de partícula mayor superficie, mayor velocidad de disolución, mayor absorción ;es decir aumenta la reactividad del polvo, es por eso que el poder clarificante fue superior para esta granulometría.

De acuerdo a las Absorbancias tomadas (λ=350) cada 24, 48 y 72 horas el mayor poder clarificante se observa dentro de las 48 horas en las tres granulometrías de albedo deshidratado, manteniéndose constante a las 72 hs, por lo cual se podría utilizar en lagunas de tratamiento durante este periodo de tiempo, recordando que el tiempo de retención máximo para tratamientos de efluentes es de 3 meses. Es importante remarcar que todos los tratamientos no presentaron olores desagradables en este período de tiempo**.**

AGRADECIMIENTOS

Empresa Citrusvil S.A

BIBLIOGRAFÍA

-Garna, H.; Mabon, N.; Robert, C.; Cornet, C.; Nott, K.; Legros, H.; Wathelet, B.; Paquot, A. (2007). Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed by alcohol. Journal of Food Science, 72 (1), C1-C9

-Gholamreza, M.; Jalal, J.; Asgar, F. (2004). A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. Journal of Food Hydrocolloids, 19, 731–738.

© 2017. IDITeC

ISSN 2525-1597

Este ejemplar se terminó de imprimir en Octubre de 2017
Tucumán, Argentina