

Preparación y caracterización de fracciones de fibra en aceitunas (Variedad Hojiblanca).

Por R. Guillén, A. Heredia, B. Felizón, A. Jiménez y J. Fdez-Bolaños.

Instituto de la Grasa y sus Derivados (C.S.I.C.)
Avda. Padre García Tejero, 4. 41012 Sevilla (España)

(*) Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (Proyecto I+D, ALI 88-0151-C02-01).

RESUMEN

Preparación y caracterización de fracciones de fibra en aceitunas (Variedad Hojiblanca).

Se aísla fibra detergente ácido (ADF), detergente neutro (NDF), insoluble (FI) y soluble (FS), de pulpa de aceitunas verdes (variedad Hojiblanca) y se estudia la composición de cada una de estas fracciones, así como la recuperación de polisacáridos de las mismas (contenido en azúcares neutros).

PALABRAS-CLAVE: Aceituna – Fibra detergente ácido – Fibra detergente neutro – Fibra insoluble – Fibra soluble.

SUMMARY

Preparation and characterization of fibre fractions in olives (Hojiblanca, var.).

Acid detergent fibre (ADF), neutral detergent fibre (NDF), insoluble fibre (IF) and soluble fibre (SF) were isolated from the flesh of Hojiblanca variety fresh green olives.

Composition and recovery of polysaccharides, expressed as neutral sugars content, were studied for each one of these fractions.

KEY-WORDS: Acid detergent fibre – Insoluble fibre – Neutral detergent fibre – Olive – Soluble fibre.

1. INTRODUCCION

Es conocido el interés universal por la fibra de los alimentos, debido a su implicación en los procesos digestivos y a su influencia en la prevención de enfermedades de diferente etiología.

La metodología en relación con la fibra prolifera de día en día, pero sigue sin existir concordancia en la literatura científica acerca de cual sea el sistema más adecuado de aislamiento de la misma. De hecho, no se puede hablar de fibra sin especificar el método utilizado para su obtención.

Entre los alimentos que se pueden definir como equilibrados en fibra se encuentra la aceituna, especialmente las variedades destinadas a su consumo como fruto elaborado que, aparte de sus ex-

cepcionales características organolépticas, poseen un apreciable valor nutritivo (1).

En la aceituna se han empleado, desde los primitivos métodos de determinación de fibra bruta, pasando por los ya clásicos de detergentes (ácido y neutro), hasta desembocar en la actualidad en los sistemas enzimáticos que determinan fibra soluble e insoluble.

El objetivo de este trabajo ha sido realizar ensayos de digestibilidad in vitro, utilizando métodos químicos y enzimáticos que posteriormente puedan ser correlacionados con la digestibilidad in vivo.

Para ello, se ha considerado esencial conocer la composición de cada una de las fracciones de fibra, obtenidas según distintos tratamientos, y estudiar la recuperación de polisacáridos de las mismas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Muestras

Se han utilizado aceitunas de la variedad Hojiblanca, recogidas en la localidad de Osuna (Sevilla). Los frutos se almacenan a 4°C, durante un tiempo máximo de 24 horas.

2.2. Humedad y Grasa

Se determinan por los procedimientos usuales (2). La humedad en estufa de vacío, a 60°C hasta peso constante y la grasa por el sistema de extracción normalizado en Soxhlet.

2.3. Proteínas

Se determinan por el método de micro kjeldahl (0,1 mg/ml). El % de nitrógeno obtenido se convierte en proteínas multiplicando por el factor 6,25.

2.4. Azúcares libres

Se determinan por HPLC, en cromatógrafo Perkin Elmer, Series 4, con inyector manual Rheodyne 7125, detector de índice de refracción Perkin-Elmer LC-25, integrador Hewlett Packard y columna Aminex HPX-87Ca.

2.4.1. Procedimiento operatorio

A 50 gramos de pulpa triturada se le añaden 250 ml de etanol de 96% y se mantienen a reflujo durante 2 horas. Después de enfriar, se filtra a vacío y el filtrado se evapora a sequedad, se añade agua destilada para disolver los azúcares y se filtra. Se lleva a 500 ml en matraz aforado.

A 2 ml de la disolución anterior se le añade 1 ml de 2-deoxiglucosa (solución al 1%), que se utiliza como patrón interno, y se pasan por resinas intercambiadoras de iones (Amberlita IR 45 OH y Amberlita 120 H). Cada columna se lava con 30 ml de agua destilada y el eluyente se evapora a sequedad. Se añaden 2 ml de agua, se filtra a través de filtro Millipore y se eliminan los restos de pigmentos y polifenoles pasando por columna Sep-pak C 18.

Para la separación cromatográfica se emplea agua como fase móvil, siendo la velocidad de flujo 0,9 ml/min., en condiciones isoterma de 85°C.

2.5. Fibra

2.5.1. Fibra detergente ácido

Se determina mediante un método gravimétrico, con bromuro de cetiltrimetilamonio (Fluka) en medio ácido (3).

2.5.2. Fibra detergente neutro

Se utiliza un método gravimétrico, con lauril-sulfato sódico (Sigma) en medio neutro (4).

2.5.3. Fibra total

Es la suma de la fibra soluble e insoluble y su aislamiento consiste en un tratamiento secuencial con enzimas proteolíticas y amilolíticas que mantienen inalterada la fibra.

A 1 gramo de pulpa desengrasada se le añaden 25 ml de tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0 y 100 ml de termamyl (Tecator). Se incuba en baño de agua hirviendo durante 15 minutos, se deja enfriar y se adicionan 20 ml de agua, ajustando el pH a 1,5 con ClH 1 N. Seguidamente, se añaden 100 mg de pepsina (Sigma) y se realiza una nueva incu-

bación en baño de agua, con agitación, a 40°C, durante 60 minutos. Se diluye con 20 ml de agua y se eleva el pH a 6,8, con NaOH 1 N. Se adicionan 100 mg de pancreatina (Sigma) y se vuelve a incubar en baño de agua, con agitación, a 40°C, durante 60 minutos, ajustando al final el pH a 4,5 con ClH 1 N. Se filtra (crisol filtrante de porosidad 2) y se lava con agua destilada (2 x 10 ml).

El residuo, que constituye la fibra insoluble (FI) se lava con etanol del 96% (2 x 10 ml) y acetona (2 x 10 ml) y se seca (A₁). El filtrado, que contiene la fibra soluble (FS), se lleva a 100 ml con agua y se precipita con cuatro volúmenes de etanol de 95%, a 60°C, durante una hora. Se filtra y lava con etanol de 78% (2 x 10 ml), etanol de 95% (2 x 10 ml) y acetona (2 x 10 ml) y se seca (A₂).

Las cenizas se calculan incinerando ambas fracciones a 550°C, durante al menos 5 horas (C₁ y C₂).

Se preparan blancos siguiendo toda la metodología, pero sin muestra de aceituna (B₁ y B₂).

El porcentaje de fibra insoluble se calcula por:

$$\%FI = \frac{A_1 - C_1 - B_1}{P} \cdot 100$$

siendo P el peso de pulpa desengrasada.

El porcentaje de fibra soluble vendrá dado por:

$$\%FS = \frac{A_2 - C_2 - B_2}{P} \cdot 100$$

La fibra total viene dada por:

$$\%FT = \%FI + \%FS$$

2.5.4. Ácidos urónicos

La determinación se lleva a cabo con meta-hidroxidifenilo, siguiendo el método de Blumekrantz (6).

2.6. Hidrólisis ácida

Los polisacáridos de las distintas fracciones de fibra se someten a una hidrólisis secuencial con ácido sulfúrico concentrado, seguida de una posterior con este ácido más diluido.

A 250 mg de fibra se le añade 1 ml de SO₄H₂ del 72% y se calienta en baño termostático, con

agitación, a 40°C, durante dos horas, al cabo de las que se añaden 11 ml de agua (resultando una solución 1N) y se continúa el calentamiento otras dos horas. Se neutraliza con NH_4OH .

Los azúcares obtenidos se identifican y cuantifican por cromatografía gaseosa, previa su transformación en acetatos de alditol (5).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 queda reflejada la distribución de componentes fundamentales del fruto. Como

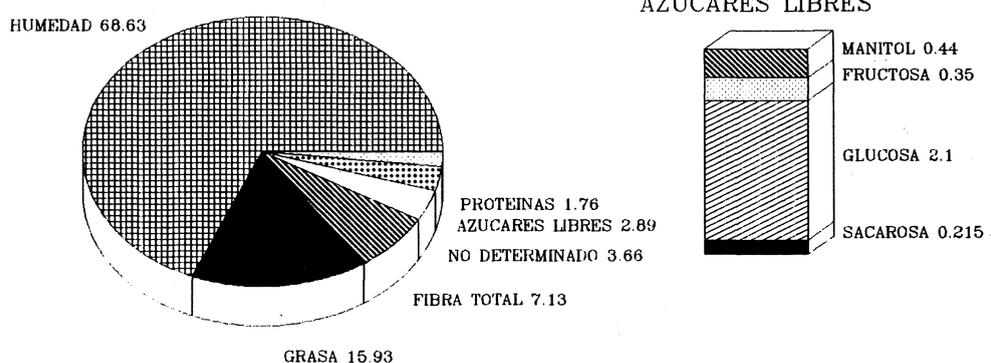


Figura 1
Componentes fundamentales del fruto.

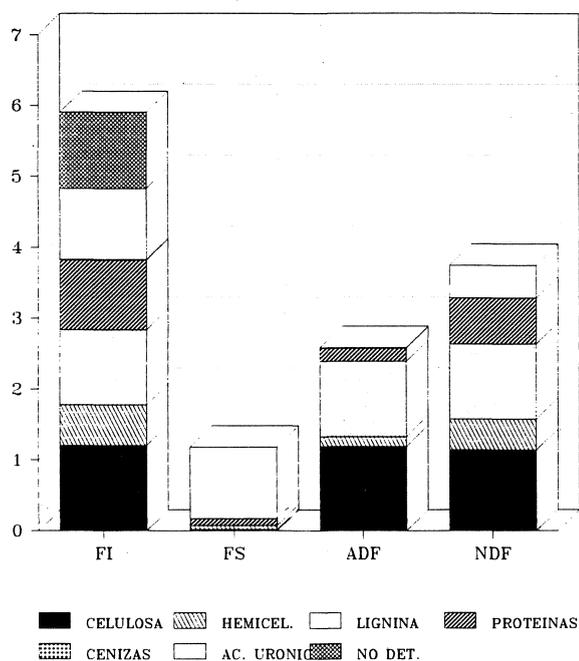


Figura 2

Porcentajes de cada fracción de fibra y de sus componentes (valores referidos a pulpa fresca).

azúcares libres, próximos a un 3%, se detecta glucosa como mayoritario, seguido de manitol y fructosa y, en menor proporción, sacarosa. Su determinación se ha llevado a cabo poniendo a punto una técnica por HPLC que, por su simplicidad, permitirá sustituir a los tradicionales métodos colorimétricos empleados hasta el momento (2).

Los porcentajes obtenidos para las distintas fracciones de fibra son los indicados en la figura 2, pudiéndose apreciar que existen diferencias altamente significativas entre ellas, siendo la mayo-

ritaria la FI. Respecto a la composición de estas fracciones, de los resultados del análisis de varianza, se concluye que no hay diferencias significativas en la celulosa de FI, ADF y NDF (Tabla I), ni en las hemicelulosas de FI y NDF (Tabla II). En la ADF, que teóricamente no debe contener hemicelulosas, se aprecian pequeñas cantidades de las mismas, hecho coincidente con lo que ocurre en otros productos vegetales, que llegan a retener hasta el 10% (6).

Mediante una hidrólisis ácida de cada una de las fracciones se ha podido estudiar la composición en azúcares neutros de las distintas fracciones de fibra (Fig. 3), siendo la glucosa el componente principal, excepto en la FS que lo es la arabinosa. Los mayores porcentajes de galactosa se encuentran en la FI, en tanto que en la NDF ésta se solubiliza parcialmente y en la ADF sólo se detectan trazas. El contenido de manosa es sensiblemente igual en FI, NDF y ADF, y sólo se aprecian trazas en FS. En el tratamiento NDF se pierde una fracción importante de arabinosa y en la ADF prácticamente desaparece. La ramnosa es prácticamente inapreciable.

Aunque todos los sistemas de aislamiento de fibra implican la solubilización de proteínas, en ninguno de ellos se llega a su eliminación total y actualmente existe una tendencia a considerar las proteínas más insolubles como uno de los cons-

Tabla I
Celulosa: análisis de varianza.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F	Nivel de significación
Entre grupos	0,15	3	0,50	2,937	0,16
Dentro de grupos	0,07	4	0,17		
Total	0,22	7			

Tabla II
Hemicelulosas: análisis de varianza.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrados medios	F	Nivel de significación
Entre grupos	1,30	2	0,65	71,18	0,00
Dentro de grupos	0,03	3	0,01		
Total	1,33	5			

tituyentes de la propia fibra. Su presencia puede ser debida a la existencia, o posterior formación, de productos de condensación entre proteínas, polifenoles y polisacáridos.

En la figura 4 quedan representadas las proteínas de la pulpa original y las remanentes en cada una de las fracciones, así como los porcentajes de proteína no solubilizada. El sistema más

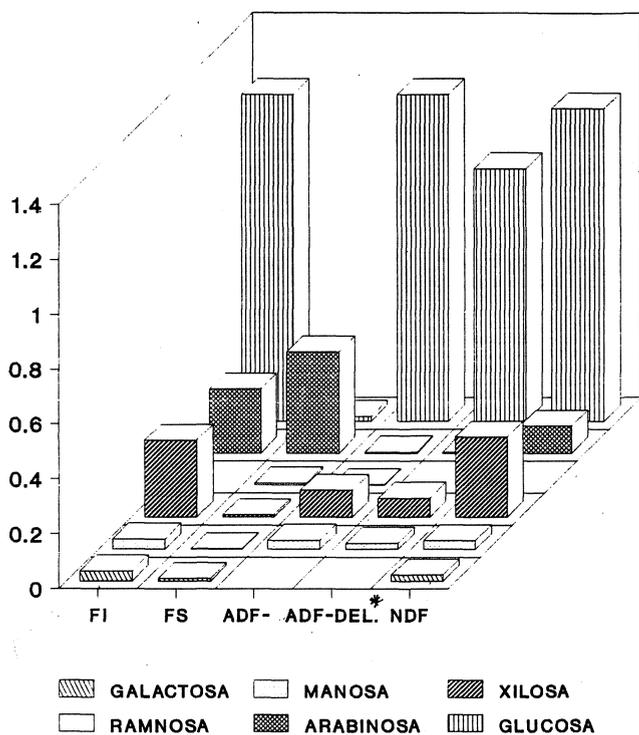


Figura 3

Composición de azúcares neutros de las fracciones de fibra.

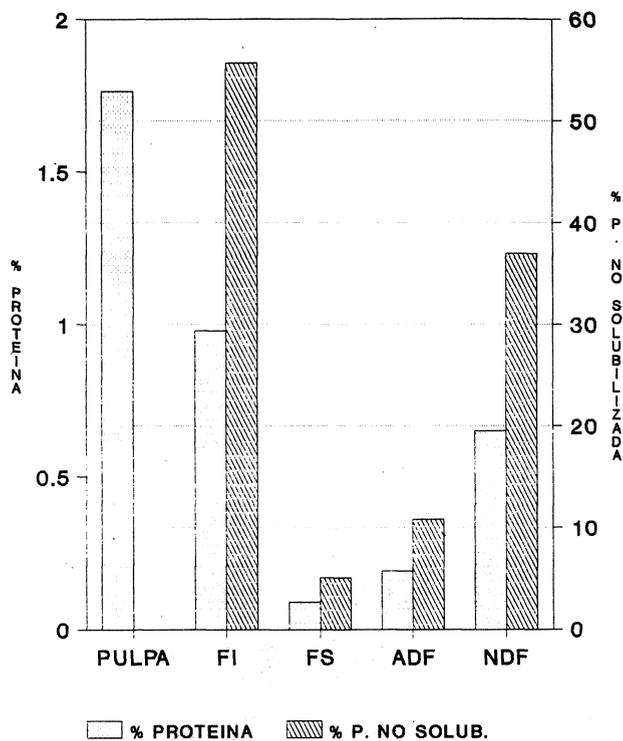


Figura 4

Proteínas de la pulpa y remanentes en las fracciones de fibra.

efectivo en su eliminación resulta ser el ADF, seguido del NDF, en tanto que en FI permanecen en cantidad considerable.

Los resultados obtenidos permiten indicar que:

a) la digestibilidad de la celulosa puede determinarse indistintamente por uno u otro método.

b) el porcentaje de hemicelulosas obtenidas a partir de NDF y FI es el mismo; sin embargo, calculadas como diferencia NDF y ADF son muy superiores, por lo que este último sistema no resulta adecuado.

c) el método NDF resulta más efectivo en la solubilización de proteínas.

BIBLIOGRAFIA

1. Castro, R.; Nosti, M; Vázquez, A.- "Composición y valor nutritivo de algunas variedades españolas de aceitunas de mesa".- Grasas y Aceites **30** (1979) 83-91.
2. Fernández, M. J.- "Biotecnología de Aceituna de Mesa".- Consejo Superior de Investigaciones Científicas.- Madrid, 1985.
3. Heredia, A.- "Composición de fibra. IV. Una comparación de método de fibra en aceitunas".- Grasas y Aceites **31** (1980) 251-254.
4. Heredia, A. y Fernández, M. J.- "Composición de fibra. V. Hemicelulosas e índice de digestibilidad en aceitunas de mesa".- Grasas y Aceites **33** (1982) 197-200.
5. Englyst, H.; Wiggins, H. J. y Cumming, J. H.- "Determination of the non-starch polysaccharides in Plant Foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates".- Analyst **107** (1982) 307-312.
6. Blumenkrantz, N. y Absoe-Hansen, G.- "New method for quantitative determination of uronic acids".- Anal. Biochem. **54** (1973) 484-489.

(Recibido: Noviembre 1990)