

Composición de la fibra alimentaria en el orujo de aceituna. Aminoácidos asociados a la fibra insoluble, soluble y total.

Por C. Valiente^a, E. Arrigoni, J.R. Corrales^a, *R.M. Esteban^a y R. Amadó

Department of Food Science, Swiss Federal Institute of Food Technology, CH-8092, Zürich (Suiza).

^a Dpto. Química Agrícola, Geología y Geoquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid.

RESUMEN

Composición de la fibra alimentaria en el orujo de aceituna. Aminoácidos asociados a la fibra insoluble, soluble y total.

Se determinó el contenido en azúcares solubles y fibra alimentaria del orujo de aceituna, analizándose los principales componentes de las fracciones de fibra insoluble, soluble y total. Asimismo, se realizó un análisis detallado de los aminoácidos no asociados a la fibra y de los presentes en cada fracción de la misma. Los resultados muestran que dicho subproducto está constituido fundamentalmente por un residuo insoluble en alcohol (77%) que contiene principalmente lignina Klason (37%), polisacáridos no celulósicos (24%), celulosa (19%), y proteína (9%). Los azúcares libres constituyen el 10% en peso, de los cuales el 60% es sacarosa. Aproximadamente el 80% del total de aminoácidos del orujo están asociados a la fibra insoluble, encontrándose que algunos de ellos, como hidroxiprolina y lisina, estaban no disponibles en su totalidad, mientras que metionina era el más ampliamente solubilizado.

PALABRAS-CLAVE: Aminoácido — Fibra alimentaria — Orujo de aceituna.

SUMMARY

Composition of dietary fibre in olive cake. Amino acids associated with insoluble, soluble and total dietary fibre.

Soluble sugars and dietary fibre were determined and the main components of the insoluble, soluble and total dietary fibre were analyzed. Aminoacids in both olive cake and fibre fractions were also studied. The results showed that olive cake fractions were also studied. The results showed that olive cake consists mainly of an alcohol insoluble residue that accounts for 77% of the dry matter (Klason lignin 37%, non-cellulosic polysaccharides 24%, cellulose 19% and protein 10%). Free sugars constitute 10% of the dry matter. Nearly 80% of all the amino acids in olive cake is associated with the insoluble dietary fibre fraction of these hydroxyproline and lysine are completely undigestible and methionine is the most available.

KEY-WORDS: Aminoacid — Dietary fibre — Olive foot cake.

1. INTRODUCCION

Actualmente, el estudio de la composición química de los subproductos procedentes de las industrias agroalimentarias tiene un gran interés debido, por una parte, a la rentabilidad económica que supone la utilización de estos materiales, y por otra, a la importancia ecológica que conlleva su eliminación. En el caso de la industria oleícola, las fases sólidas sedimentables, en forma de lodos tratados y desecados, constituyen la parte final del proceso de depu-

ración de aguas de tratamiento de dicha industria (alpechines), que en caso de acumularse, pueden llegar a originar graves problemas medioambientales. Por ello, se ha intentado encontrar diferentes aplicaciones, entre las que se incluye su empleo como combustible, pienso, abono, etc. (Illescas, 1993). Algunos autores han estudiado distintas fracciones del orujo de aceituna con el propósito de conseguir una aplicación práctica de este subproducto, disponible en grandes cantidades, que habitualmente es desechado (Bondioli y col., 1989; Heath, 1992).

La fibra alimentaria constituye una de las fracciones más importantes de los subproductos de origen vegetal. Dicha fracción presenta una composición química variable que dependerá tanto del producto original, como del procesamiento a que éste es sometido en la industria hasta la obtención del subproducto. Sin embargo, una característica común a todos ellos es la presencia de una considerable cantidad de proteína asociada, en mayor o menor grado, a los componentes de la fibra, especialmente en aquellos que muestran un elevado contenido en lignina.

Recientemente, se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar la composición química de la fibra alimentaria en aceituna de mesa (Gil-Serrano y col., 1986; Heredia y col., 1987; Guillén y col., 1992; Jiménez y col., 1994). Sin embargo, esta fracción se ha estudiado menos en el orujo de aceituna.

El objetivo de este trabajo es aportar información sobre la composición química de las fracciones de fibra insoluble, soluble y total, presentes en el orujo de aceituna y, especialmente, sobre la distribución en ellas de los aminoácidos que constituyen la proteína asociada a la fibra alimentaria.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Muestra

El orujo de aceituna fue suministrado seco (5,7% humedad), desengrasado ($\leq 5\%$ grasa) y sin huesos, por una almazara de Luque (Córdoba, España). La muestra fue pasada por un tamiz de 0,25 mm antes de su utilización para eliminar restos de huesos.

2.2. Reactivos y equipo

- Enzimas: Termamyl (Novo Ferment Schweiz AG, Basel, Suiza), proteasa P-5380 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) y amiloglucosidasa (BDH Chemicals Ltd. Poole, UK).
- Patrones: glucosa, de Merck, y ácido galacturónico, de Sigma, para las colorimetrías automatizadas. Patrones comerciales para el calibrado del analizador de aminoácidos, de Pharmacia. El resto de reactivos utilizados fue de calidad p.a.
- Equipos utilizados: Autoanalizador Technión II, módulo de azúcares y módulo de ácidos urónicos; analizador automático de aminoácidos (Alpha Plus, Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) equipado con una columna de intercambio catiónico en forma de sodio (Ultropac 7).

2.3. Métodos analíticos

El residuo insoluble en alcohol (RIA) se obtuvo por extracciones sucesivas de la muestra (3g) con EtOH 95% (120 ml) calentando a reflujo durante 10 minutos, repitiéndose los procesos de extracción hasta obtener negativo el test de Mölish. El residuo obtenido se lavó con acetona, se secó en estufa de vacío a 30°C, y fue cuantificado por pesada.

El extracto etanólico obtenido fue concentrado hasta sequedad en un rotavapor (30°C), se adicionó agua destilada para redissolver los azúcares y se filtró, llevándose posteriormente a volumen. La cuantificación de azúcares libres, reductores y totales, presentes en el extracto etanólico, se llevó a cabo por el método de Bittner y Manning (1967) utilizando neocuprofina como reactivo y glucosa como patrón, en un autoanalizador Technión II. Para la determinación de azúcares totales se llevó a cabo una hidrólisis ácida (HCl 2N, 1h, T° ambiente) sobre una alícuota (5 ml) del extracto etanólico.

A partir de RIA se realizó la extracción fraccionada de pectinas, utilizando diferentes soluciones extractantes (H₂O, oxalato amónico, NaOH) para la obtención de pectinas de alto metoxilo, bajo metoxilo y protopectina, respectivamente, de acuerdo con Robertson (1979). En cada uno de los extractos obtenidos se determinó el contenido en ácidos urónicos colorimétricamente por el método de Esteban y col. (1993) utilizando m-hidroxidifenilo como reactivo y ácido galacturónico como patrón.

Las fracciones de fibra alimentaria se obtuvieron por el método enzimático-gravimétrico de Prosky y col. (1988), modificado para la obtención de la fibra soluble por diálisis, según Arrigoni y col. (1984). Para ello, la muestra se somete a una digestión secuencial con α -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa. El residuo obtenido es cuantificado como fibra insoluble mientras que el sobrenadante se somete a diálisis en agua destilada durante 48 horas, liofilizándose posteriormente para la obtención de la fibra soluble. El residuo de fibra insoluble se sometió a dos tipos de hidrólisis: una hidrólisis ácida secuencial con H₂SO₄ 12M, 3h, 20°C y luego H₂SO₄ 1M, 2.5 h, 100°C (hidrólisis Saeman); y a una hidrólisis suave con H₂SO₄ 1M,

2.5h, 100°C. El material insoluble en ácido, procedente de la primera hidrólisis fue cuantificado gravimétricamente como lignina Klason y la proteína presente en dicho residuo determinada tras mineralización Kjeldhal (N x 6.25). El residuo de fibra soluble se sometió a una hidrólisis suave con H₂SO₄ 1M, 2.5h, 100°C. En los hidrolizados obtenidos se cuantificaron los azúcares neutros y los ácidos urónicos por colorimetría, según los métodos anteriormente mencionados. Así, la fibra insoluble se calcula como la suma de lignina Klason, azúcares neutros y ácidos urónicos, y la fibra soluble como suma de azúcares neutros y ácidos urónicos.

El contenido en proteínas se determinó como suma de los aminoácidos obtenidos tras la hidrólisis de la proteína. Para ello, se pesaron con precisión 20 mg de muestra en un tubo de hidrólisis provisto de tapón de rosca. Se adicionó 1 ml de HCl (6 mol/L) manteniéndose durante 10 minutos bajo corriente de N₂. A continuación las muestras se mantienen durante 24 horas a 110°C, en baño de aceite, para completar la hidrólisis. El ácido clorhídrico se evapora en un rotavapor a una temperatura no superior a 50°C y el residuo seco se redissuelve en 5 ml de tampón pH 2.20. Tras agitar en un Vortex durante 30 segundos, se pasa la muestra por un filtro de 0,45 μ m, antes de su cuantificación en el autoanalizador de aminoácidos. Como eluyente se utilizaron secuencialmente soluciones tampón de pH 2.20, 3.00, 3.50, 4.25, 8.80 y NaOH 0.4M. La reacción con ninhidrina se empleó para la detección de los aminoácidos (Lebet y col., 1994). Se analizaron hidroxiprolina (Hyp), ácido aspártico + asparagina (Asx), treonina (Thr), serina (Ser), ácido glutámico + glutamina (Glx), prolina (Pro), glicina (Gly), alanina (Ala), cisteína (Cys), valina (Val), metionina (Met), isoleucina (Ile), leucina (Leu), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), hidroxilisina (Hys), lisina (Lys), histidina (His) y arginina (Arg).

El contenido en cenizas se determinó por mineralización de las muestras en mufla a 550°C, durante 8 h.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

El residuo insoluble en alcohol (RIA) constituye aproximadamente el 77% del peso del orujo de aceituna, como muestra la Tabla I. Este elevado porcentaje indica la presencia mayoritaria de paredes celulares en este subproducto.

El diferente grado de solubilización de las sustancias pécticas según el extractante empleado, indica que las pectinas de bajo metoxilo, extraídas con oxalato amónico, constituyen la fracción mayoritaria (54% del total), seguida por las protopectinas, sustancias pécticas asociadas a otros componentes de la pared celular, extraídas con NaOH, que constituyen el 42% del total; finalmente, las pectinas de alto metoxilo se encuentran en una proporción muy pequeña. En cualquier caso, el porcentaje de polímeros pécticos solubilizado por los extractantes fue bajo.

Los componentes solubles en etanol representan un 23% del peso total, correspondiendo aproximadamente el 45% de éstos a azúcares solubles. Este valor es ligeramente inferior al encontrado en aceitunas de mesa, donde el contenido en azúcares solubles representa el 14% y

13% del peso total, en variedades Gordal y Manzanilla, respectivamente, según Guillén y col. (1992). El material soluble restante del orujo de aceituna incluiría proteínas solubles y polifenoles no asociados a la fracción de fibra. Vázquez y col. (1971) encontraron un contenido en polifenoles en aceitunas superior al 5% en peso seco. Por otro lado, es interesante señalar el elevado porcentaje de cenizas presente en el subproducto por el importante contenido de minerales que esto supone.

Tabla I
Composición general del orujo de aceituna
(% materia seca)

Componentes	%
RIA ^a	76,9 ± 1,3
pectinas totales	1,2 ± 0,0
alto metoxilo ^b	49,7 ± 4,2
bajo metoxilo ^b	634,5 ± 30,9
protopectina ^b	500,6 ± 11,9
Azúcares libres totales	10,5 ± 0,3
Azúcares reductores	4,6 ± 0,2
Sacarosa	5,9 ± 0,1
Proteína	8,6 ± 0,1
Cenizas	11,4 ± 0,2
Grasa	≤ 5
Humedad	5,7 ± 0,2

^a Residuo insoluble en alcohol

^b Expresados en mg/100 g

En la Tabla II se muestran los componentes de las fracciones de fibra insoluble, soluble y total del orujo de aceituna. Los resultados muestran la elevada proporción de fibra alimentaria, que constituye el 65% en peso del orujo, siendo la fibra insoluble la fracción mayoritaria (93% de total). Tanto en la fibra insoluble como en la soluble, el elevado porcentaje de azúcares neutros frente a ácidos urónicos pone de manifiesto la baja proporción de sustancias pécticas frente a otros polisacáridos constituyentes de la pared celular del orujo de aceituna. El contenido en celulosa puede estimarse a partir de la diferencia de azúcares neutros (x 0,9) liberados tras la hidrólisis ácida Saeman (12M H₂SO₄ + 1M H₂SO₄) y la hidrólisis suave (1M H₂SO₄) del residuo de fibra insoluble, teniendo en cuenta que en estas últimas condiciones se produce la hidrólisis de azúcares procedentes de xiloglucanos y de, aproximadamente, un 10% de celulosa, según Stevens y col. (1980). Así, el contenido en celulosa estimado en el orujo de aceituna es del 14,3%, proporción equivalente al contenido en polisacáridos no celulósicos (PNC). El hecho de que la cantidad de ácidos urónicos obtenida por hidrólisis ácida de los polisacáridos sea mucho mayor que la obtenida mediante el fraccionamiento del material inicial, pone de manifiesto la presencia de formas complejas de sustancias pécticas, y posiblemente hemicelulosas, asociadas al residuo insoluble de celulosa, que no son solubilizadas durante el fraccionamiento rea-

lizado con los distintos extractantes. Según los resultados obtenidos, los polisacáridos constituyen el 51% en peso de la fibra total frente al 29% de lignina Klason. Este residuo está constituido en un 20% en peso por proteína, y en él estarían incluidos otros componentes como cenizas y taninos condensados (Rebolé y col., 1989), que incidirán en la digestibilidad de la proteína presente en el orujo de aceituna. Se puede concluir que celulosa y PNC de la fibra alimentaria, más lignina, proteína y cenizas asociadas a las distintas fracciones de fibra constituyen el RIA del orujo de aceituna.

Tabla II
Composición de las fracciones de fibra alimentaria del orujo de aceituna
(% materia seca)

Componentes	Fracciones		
	Insoluble	Soluble	Total
Azúcares neutros (Hidrólisis Saeman)	29,7 ± 0,9	-	29,7
Azúcares neutros (Hidrólisis 1M H ₂ SO ₄)	15,4 ± 0,1	2,8 ± 0,1	18,3
Ácidos urónicos	2,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1	3,7
Polisacáridos totales	28,6	4,0	32,6
Celulosa	14,3	-	14,3
PNC ^a	14,3	4,0	18,3
Lignina Klason (L _k)	28,9 ± 0,8	-	28,9
Fibra alimentaria	60,7	4,4	65,1
Proteína en L _k	5,9 ± 0,2	-	5,9
Proteína en fibra	6,8 ± 0,4	0,3 ± 0,0	7,1
Cenizas en fibra	7,9 ± 0,5	2,7 ± 0,2	10,6

^a Polisacáridos no celulósicos

Los aminoácidos presentes en el orujo así como en las fracciones de fibra aparecen expresados, por orden de elución en las Tablas III y IV, respectivamente. El orujo de aceituna muestra una apreciable cantidad de proteína total (8,6% respecto a materia seca). En general, se puede destacar el elevado contenido en glutamina más glutámico (Glx) y asparragina más aspartato (Asx). Las proteínas presentes en el orujo de aceituna contienen todos los aminoácidos esenciales, que suponen el 38% de los aminoácidos totales, como muestra la Tabla III. La proteína de la pared celular representa una pequeña parte de la proteína total como indica el bajo contenido en hidroxiprolina (Hyp). En los cromatogramas se observó la presencia de tres picos desconocidos, que eluían a un tiempo de retención comprendido entre los correspondientes a histidina y lisina. Los ensayos realizados para identificarlos indicaron que uno de ellos eluía al mismo tiempo que el aminoácido ornitina, y ninguno de ellos correspondía a hidroxilisina, en el sistema de análisis empleado. Estas sustancias se perdían en gran medida durante la determinación de fibra como mostraron los cromatogramas correspondientes a las fracciones de fibra alimentaria.

Tabla III
Aminoácidos en el orujo de aceituna

Orujo de aceituna		
	g/100g proteína	mg/100g materia seca
Hyp	1,39	120,0
Asx	11,28	975,6
Thr	5,70	487,8
Ser	6,51	562,0
Glx	14,88	1283,1
Pro	5,58	477,2
Gly	5,93	509,0
Ala	6,28	540,8
Cys	0,23	21,2
Val	7,21	625,7
Met	1,51	127,2
Ile	5,81	498,4
Leu	9,77	837,7
Tyr	4,19	360,5
Phe	6,63	572,6
Hys	0,0	0,0
Lys	0,23	21,2
His	1,05	95,0
Arg	5,93	509,0
Total	100,11	8620,6

En la Tabla IV se muestra la distribución de los aminoácidos en las fracciones de fibra insoluble, soluble y total. El 79% de la proteína presente en la fibra total se encuentra asociada a los componentes de la fibra insoluble, siendo Glx, Asx, Leu y Val los aminoácidos mayoritarios en esta fracción, que constituyen el 42% del total. Por otra parte, fue necesario hacer un blanco del proceso de obtención de fibra con el fin de conocer la contribución de los enzimas utilizados durante la digestión enzimática al contenido en proteína de la fibra alimentaria, especialmente de la fibra soluble. Los resultados indicaron que el kit enzimático aportaba el 65% en peso del total de los aminoácidos detectados junto con la fracción de fibra soluble; entre ellos el 100% de Cys y Lys, 93% de Tyr, 80% de Leu y otros porcentajes no inferiores al 40% del resto de aminoácidos, como puede deducirse de la Tabla IV. En la fracción de fibra soluble también fueron identificados glucosamina y galactosamina procedentes de los enzimas. Efectuada la corrección de aminoácidos, se observa que la cantidad de proteína asociada a la fibra soluble es insignificante y que la proteína digerida es completamente eliminada por diálisis.

Tabla IV
Distribución de aminoácidos en las fracciones de fibra alimentaria
(mg/100g materia seca)

Fibra alimentaria				
	Insoluble	Soluble	Soluble ^a	Total
Hyp	120,0	0,0	0,0	120,0
Asx	764,4	146,2	57,7	822,1
Thr	389,5	109,5	23,3	412,8
Ser	448,3	114,9	32,5	480,5
Glx	926,1	130,6	74,1	1000,2
Pro	389,5	49,6	24,4	413,9
Gly	404,2	60,5	29,8	434,0
Ala	433,6	77,5	21,2	454,8
Cys	14,7	4,1	0,0	14,7
Val	507,1	66,6	22,8	529,9
Met	80,8	6,8	4,0	84,8
Ile	396,9	42,8	15,5	412,4
Leu	676,2	76,2	15,4	691,6
Tyr	308,7	49,0	3,5	312,2
Phe	441,0	49,0	13,5	454,5
Hys	0,0	0,0	0,0	0,0
Lys	21,2	21,8	0,0	21,2
His	80,8	12,2	5,1	85,9
Arg	374,8	41,5	8,7	383,5
Total	6790,9	1009,8	352,2	7136,1

^a Corregida por el aporte de aminoácidos del kit enzimático empleado.

Comparando el contenido en proteína del orujo de aceituna y de la fibra total se pone de manifiesto que la proteína del orujo es poco digestible por los enzimas empleados en este ensayo. La proteína intracelular no se elimina durante el tratamiento enzimático debido a que los taninos forman complejos con las proteínas haciendo difícil su extracción (Kumar y *col.*, 1984). El grado de solubilización de la mayor parte de los aminoácidos es de aproximadamente el 20%, con valores superiores para la metionina (33%) o inferiores en el caso de la tirosina (13%) o de la hidroxiprolina, completamente indigestible por la proteasa empleada, por tratarse de un aminoácido presente en las proteínas de las paredes celulares.

BIBLIOGRAFIA

1. Arrigoni, E., Caprez, A., Amadó, R. y Neukom, H. (1984).- "Gravimetric method for the determination of insoluble and soluble dietary fibre".- *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **178**, 195-198.
2. Bittner, D.L. y Manning, J. (1967).- "Automated neocuproine glucose method: critical factors and normal values".- *Autom. Anal. Chem. Technicon Sym.* **1**, 33-36.
3. Bondioli, P., Lanzani, A., Fedeli, E. y Casarotto, L. (1989).- "Le sanse esauste di oliva: tecniche di trasformazione e di recupero di costituenti di pratico utilizzo".- *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **LXVI**, 661-667.

4. Esteban, R.M., López-Andréu, F.J., Martín-Cabrejas, M.A. y Mollá, E. (1993).- "Pectin changes during the development and ripening of eggplant fruits".- *Food Chem.* **46**, 289-292.
5. Gil-Serrano, A., Mateos-Matos, M.I. y Tejero-Mateo, M.P. (1986).- "Acidic xylan from olive pulp".- *Phytochem.* **25**, 2653-2654.
6. Guillén, R., Heredia, A., Felizón, B., Jiménez, A., Montañó, A. y Fernández-Bolaños, J. (1992).- "Fibre fraction carbohydrates in *Olea europaea* (Gordal and Manzanilla var.)".- *Food Chem.* **44**, 173-178.
7. Heath, G. F.- "Methods for processing and reconstituting olive pulp".- Patente U.S. Nº 5.094.871. (10.3.92).
8. Heredia, A. y Fernández-Bolaños, J. (1987).- "Evolución de la fibra alimentaria durante el desarrollo y maduración del fruto del olivo (*Olea Europea arolensis*)".- *Alimentaria*, Abril, 19-22.
9. Illescas, M. (1993).- "Tecnologías patentadas en España de aprovechamiento integral de los residuos de la industria aceitera".- Resúmenes IX Congreso Nacional de Química, Química Agrícola y Alimentaria 4.08-H.
10. Jiménez-Araujo, A., Labavitch, J. y Heredia, A (1994).- "Changes in the cell wall of olive fruit during processing".- *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1194-1199.
11. Kumar, R. y Singh, M. (1984).- "Tannins: their adverse role in ruminant nutrition".- *J. Agric. Food Chem.* **32**, 447.
12. Lanzani, A., Bondioli, P., Mariani, C. y Fedeli, E. (1985).- "Le sanse di oliva: tecniche di trasformazione e di recupero di costituenti di pratico utilizzo. Nota I".- *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **LXII**, 597-604.
13. Lebet, V., Arrigoni, E., Schneider, H. and Amadò, R. (1994).- "A critical appreciation of the protein determination by Kjeldahl's method based on the amino acid analysis".- *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.* **85**, 46-58.
14. Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F. DeVries, J.W. y Furda, Y. (1988).- "Determination of insoluble, soluble and total dietary fibre in foods and foods products: Interlaboratory study".- *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 1017-1023.
15. Rebolé, A., Alvira, P. y González, G. (1989).- "Variations of chemical composition data of agricultural and forst fibrous by-products as determined by the two detergent systems os analysis".- *J. Sci. Food Agric.* **48**, 141-153.
16. Robertson, G.L. (1979).- "The fractional extraction and quantitative determination of pectic substances in grapes and musts".- *Am. J. Enol. Vitic.* **30**, 182-186.
17. Stevens, B.J.H. y Selvendran, R.R. (1980).- "The isolation and analysis of cell wall material from the alcohol insoluble residue of cabbage (*Brassica oleracea var. capitata*)".- *J. Sci. Food Agric.* **31**, 1257-1267.
18. Vázquez, A., Maestro, R., y Graciani, E. (1971).- "Determinación de polifenoles totales en las aceitunas".- *Grasas y Aceites* **22**, 371-376.

Recibido: Noviembre 1994

Aceptado: Marzo 1995