



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Aprovechamiento del Orujo de Oliva y su
Posible Utilización en la Alimentación Animal



DEPTO. DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

JORGE RICARDO OCAMPO GARCIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE:	Prof. Pedro Valle Vega
VOCAL:	Prof. Eduardo Bárzana García
SECRETARIO:	Prof. Fidel Figueroa Martínez
1er. SUPLENTE:	Prof. Agustín López Munguía Canales
2do. SUPLENTE:	Prof. Federico Galdeano Biezobas

Sitio donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS.

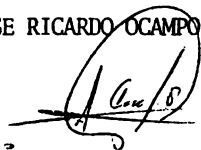
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO.

FACULTAD DE QUIMICA

U.N.A.M.

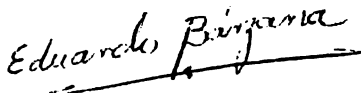
Nombre completo y firma del sustentante:

JORGE RICARDO OCAMPO GARCIA.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ocampo', is written over a horizontal line.

Nombre completo y firma del asesor del tema:

M. en C. EDUARDO BARZANA GARCIA.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Eduardo Bárzana', is written over a horizontal line.

A MIS PADRES:

Por la confianza, esfuerzo
y cariño que siempre me han demostrado

A MIS HERMANOS:

Lupita, Silvia y Toño.

PERSONAS E INSTITUCIONES A LAS CUALES

DESEO AGRADECER SU COLABORACION:

- A mi asesor y amigo: M. en C. Eduardo Bárzana García.
por su apoyo y dirección en todo momento.
- A la Empresa Olivares Mexicanos, S.A.
- A los miembros del Departamento de Alimentos D.E.Pg..
Facultad de Química. UNAM.
- Al Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.
- A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica. UNAM.
- Al Instituto de Biología. UNAM.

A CADA UNO DE MIS AMIGOS:

Porque existen muchos momentos
gratos que hemos compartido.

A LA MANIFESTACION MUSICAL DE ESTA EPOCA

Por sus efectos emocionantes

Breath, breath in the air
I like be here when I can
For long you live and high you fly
Nobody knows where you are, how near or how far
And who knows which is which and who is who
But... the sun is eclipsed by the moon.

P. Floyd

INDICE

I INTRODUCCION	1
----------------------	---

II GENERALIDADES

2.1 El Olivo	
2.1.1 Importancia del Olivo y su Composición Química	4
2.2 El Aceite de Oliva	
2.2.1 Obtención del Aceite	7
2.2.2 Valor Fisiológico y Alimenticio	10
2.2.3 Importancia de la Grasa en la Alimentación Animal.....	13
2.2.4 Efectos de la Oxidación de Lípidos	16
2.3 Digestibilidad Animal	19
2.3.1 Métodos de Determinación '.....	22
2.3.2 Factores que Afectan la Digestibilidad	22
2.4 Importancia de Selenio y Molibdeno en la Nutrición	
Animal	26

III ANTECEDENTES

3.1 Utilización de Subproductos del Olivo	
3.1.1.El Orujo	29
3.1.1.1 Recuperación del Aceite Residual	31
3.1.1.2 Como Alimento Animal	33
3.1.2 El Alpechin	40
3.1.3 La Almendra	43

3.1.4 El Orujillo	47
3.2 Población Ganadera en Baja California Norte	48

IV MATERIALES METODOS

4.1 Tratamiento de la Materia Prima.....	49
4.2 Análisis Proximal.....	50
4.3 Aislamiento e Identificación de Microorganismos	51
4.4 Caracterización de los Lípidos Presentes en el Orujo	
4.4.1 Propiedades Químicas.....	53
4.4.2 Identificación de los Acidos Grasos	54
4.5 Determinación de Selenio y Molibdeno	56
4.6 Pruebas Biológicas	
4.6.1 Determinación del Índice de Eficiencia Proteica.....	59
4.6.2 Método de Reflexión.....	62
4.6.3 Estudio Histológico	63
4.7 Digestibilidad "in vitro"	63
4.8 Determinación de Lignina.....	67
4.9 Determinación de Carbohidratos (Hexosas)	69

V RESULTADOS Y DISCUSION

VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFIA

I INTRODUCCION.

Los países en vías de desarrollo se enfrentan a grandes problemas en la actualidad, entre estos la carencia de alimentos es de particular relevancia. Una de las causas de esta situación consiste en que parte muy importante de la producción agrícola se destina a la alimentación del ganado. Entre las alternativas que se plantean actualmente para resolver este problema sobresale el empleo de materiales considerados como desperdicios agrícolas y que podrían ser aprovechados por el ganado. Uno de estos desechos, producto de la extracción de aceite en la industrialización de la oliva, es el orujo.

La importancia económica de la industrialización de la oliva en el mundo y en particular en Europa mediterránea es sobresaliente. Los dos productos obtenidos del olivo son: el aceite de oliva y las aceitunas llamadas "de mesa". De estos dos productos, el más importante es el aceite de oliva, siendo aproximadamente siete millones de toneladas métricas cosechadas de oliva que se destinan para este fin en el mundo (1).

El cultivo del olivo en México ha ido en aumento año con año. Hasta 1978 la producción nacional aproximada de oliva era de 13,000 toneladas métricas, de las cuales se destinaron para la producción de aceite de oliva sólo el 20% (2). El cultivo de este fruto y su industrialización esta concentrado en la región de Baja California Norte siendo su producción suficiente para satisfacer la demanda del consumo nacional, tanto de aceituna de mesa como de aceite de oliva.

Durante la extracción del aceite de oliva (método por prensado), se obtiene un subproducto conocido como orujo de oliva; este residuo se considera como desperdicio, sin que hasta el momento exista información al respecto sobre su posible utilización. Su contenido de aceite no extraíble económicamente es muy alto. Este desecho se almacena en los terrenos de la propia industria, por lo que existe una acumulación de años anteriores, lo que origina problemas de espacio y contaminación, debido a que transcurridos unos meses de almacenamiento al aire libre se produce un crecimiento microbiano abundante miceliares y enranciamiento de la materia grasa; este desarrollo microbiano múltiple aún existe en orujos de oliva almacenados por dos años. Su presencia al considerar al producto como materia dirigida a la alimentación de animales, produce cambios importantes en la composición química que pueden ser causantes de toxicidad.

De acuerdo al procedimiento que se emplea en la extracción de aceite de oliva y a la importancia económica y biológica de dicho producto, en el presente estudio se plantea el posible aprovechamiento del orujo en el campo de la alimentación animal, considerando los requerimientos de la región de Baja California Norte en esta área.

Es necesario hacer énfasis especial en que a la oxidación de los lípidos presentes y el contenido de fibra y lignina, constituyentes que abaten la digestibilidad del producto, son posible limitantes en esta aplicación. De igual manera que la presencia de metales como selenio y molibdeno en la dieta, son altamente indeseables para tales fines.

(3)

Se busca al mismo tiempo presentar información de algunos estudios y aplicaciones realizadas en otros lugares, con los diversos residuos de la oliva, con objeto de contar con una idea global actualizada de las posibilidades de su aprovechamiento.

II GENERALIDADES.

2.1 EL OLIVO

2.1.1 Importancia del Olivo y su Composición Química.

El olivo es conocido científicamente con el nombre de Olea europaea, es originario del oriente medio, de donde se expandió su cultivo de Este a Oeste. El olivo ha sido por muchos años el fruto más importante de los países del mediterráneo, donde se extendió su cultivo a casi todas las regiones subtropicales del mundo.

La producción actual de aceite de oliva en esta región constituye cerca del 85% de la producción mundial, lo que da una idea de su importancia económica. Los principales países productores son España, Italia, Grecia, Portugal, Túnez y Turquía. En América la industrialización del olivo destaca especialmente en los Estados Unidos, principalmente en California, destinando el 80% de su producción a aceituna de mesa. En relación a los países de Latinoamérica, Argentina ocupa el primer lugar entre los países olivares como Chile, México y Perú, los que han logrado un incremento notable en los últimos años.

El olivo pertenece al género Olea, de la familia de las oláceas. Esta familia comprende treinta especies, de las cuales el género Olea europaea es la única que produce fruto comestible. El olivo es un árbol siempre verde y goza de larga longevidad, existiendo muchos olivos que son centenarios y posiblemente milenarios. Las tierras aptas para su cultivo son preferentemente

suelos calcáreos-silíceo-arcillosos, adaptándose como ningún otro frutal a terrenos escarpados pedregosos, secos y áridos.

La oliva es una fruta que presenta un sabor amargo. Cuando la oliva se cosecha verde se obtiene un poco de aceite de color muy verde, con un sabor áspero y amargo. El sabor amargo se debe a la presencia de un glucósido llamado oleuropeína que conforme transcurre la maduración del fruto sufre gradualmente una hidrólisis, resultando como producto final α -D-glucosa. Durante esta maduración la oliva sufre una lipólisis enzimática, consecuencia de la acción de enzimas propias (lipasas) contenidas en la pulpa y su materia grasa, manifestándose su acción tras la pigmentación por oscurecimiento del fruto. Es importante no sobrepasar el grado de maduración porque se origina un aceite de mayor viscosidad, coloreado y que se podría enranciar o descomponer fácilmente. El fruto del olivo está constituido de las siguientes partes, según se describe en el diagrama adjunto (3).

COMPONENTE	%
Epicarpio (hollejo o piel).....	1.5-3.5
Sarcocarpio (pulpa o mesocarpio).....	70-80
Endocarpio (hueso).....	15-23
Almendra.....	2.5-4.0

4

II GENERALIDADES.

2.1 EL OLIVO

2.1.1 Importancia del Olivo y su Composición Química.

El olivo es conocido científicamente con el nombre de Olea europaea, es originario del oriente medio, de donde se expandió su cultivo de Este a Oeste. El olivo ha sido por muchos años el fruto más importante de los países del mediterráneo, donde se extendió su cultivo a casi todas las regiones subtropicales del mundo.

La producción actual de aceite de oliva en esta región constituye cerca del 85% de la producción mundial, lo que da una idea de su importancia económica. Los principales países productores son España, Italia, Grecia, Portugal, Túnez y Turquía. En América la industrialización del olivo destaca especialmente en los Estados Unidos, principalmente en California, destinando el 80% de su producción a aceituna de mesa. En relación a los países de Latinoamérica, Argentina ocupa el primer lugar entre los países olivares como Chile, México y Perú, los que han logrado un incremento notable en los últimos años.

El olivo pertenece al género Olea, de la familia de las oláceas. Esta familia comprende treinta especies, de las cuales el género Olea europaea es la única que produce fruto comestible. El olivo es un árbol siempre verde y goza de larga longevidad, existiendo muchos olivos que son centenarios y posiblemente milenarios. Las tierras aptas para su cultivo son preferentemente

(6)

La composición de la oliva es (4):

COMPONENTE	%
Aceite.....	20-25
Alpechin (residuo acuoso).....	40-45
Orujo.....	25-40

Las variedades de olivo que existen en México, y las que son utilizadas conjuntamente en diferentes proporciones para la obtención de aceite de oliva, son: Nevadillo, Manzanilla, Misión y Gordal (oliva Real o Sevillana). La composición del aceite en la pulpa de estas variedades es la siguiente (5):

VARIEDAD	%
Manzanilla.....	18-24
Misión.....	19-29
Nevadillo.....	22-25
Gordal.....	12-18

El promedio de la composición química de las variedades anteriores es la siguiente (6):

COMPONENTE	OLIVA VERDE %	OLIVA MADURA %
Humedad	78.41	69.60
Proteínas	2.43	2.00
Grasa	12.90	21.00
Carbohidratos	1.78	4.00
Cenizas	4.48	3.40

2. ACEITE DE OLIVA.

2.2.1 Obtención del Aceite.

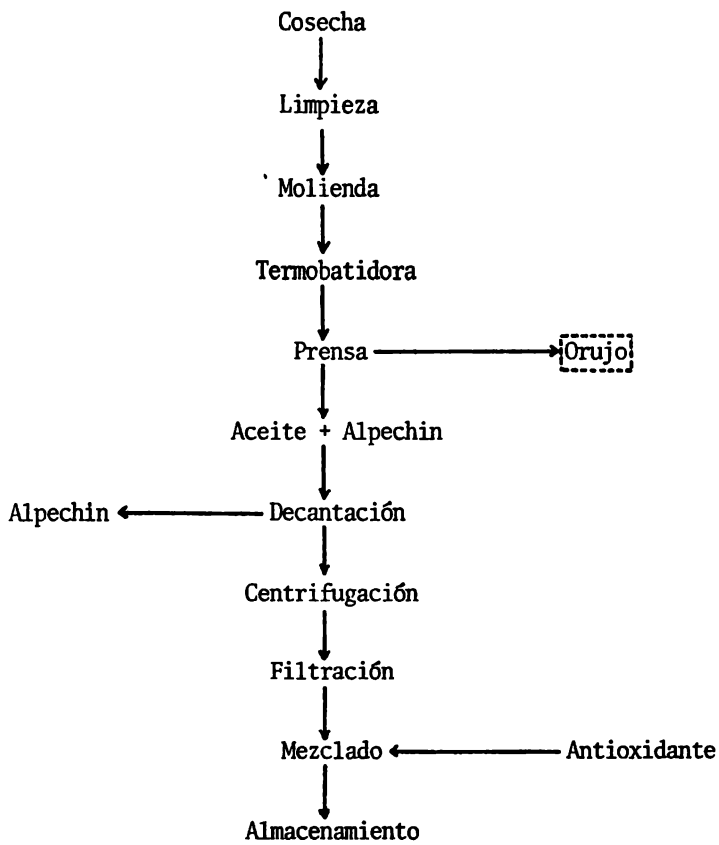
El aceite se encuentra en la oliva en forma de minúsculas gotitas alojadas en las vacuolas de las células del mesocarpio del fruto que constituyen el llamado "parénquima oleífero". Por consiguiente, el primer paso obligado para separar el aceite es la molienda o moliuración de la oliva para destruir, casi en su totalidad los tejidos vegetales que las forman.

Durante la molienda las células se rompen y desgarran, dejando libre la mayor parte de las gotitas de aceite. Estas gotitas microscópicas se reúnen fácilmente al principio en gotas más gruesas. Al mismo tiempo, en la superficie de las gotitas primitivas se van formando membranas lipoproteicas como consecuencia necesaria de su contacto con las proteínas disueltas o solubilizadas en el alpechín o agua de vegetación.

El batido lento de la pasta de olivas molidas facilita la reunión del aceite de las gotitas en gotas gruesas, e incluso en porciones de la fase oleosa continúa desligada de los sólidos de la pasta y del alpechín. Un calentamiento a 25-30°C durante esta operación facilita la extracción, al disminuir la viscosidad del aceite.

De acuerdo a estos principios los pasos de la extracción de aceite son los siguientes:

DIAGRAMA DEL PROCESO DE OBTENCION DE ACEITE



DESCRIPCION DEL PROCESO DE OBTENCION DE ACEITE

OPERACION	CONDICIONES
Cosecha	Se realiza a mano. La oliva debe encontrar <u>se</u> en su grado óptimo de maduración
Limpieza	Se realiza con tamices, eliminandose las ramitas, hojas etc., que imparten mal sa <u>bor</u> al aceite.
Molienda	Trituración simple y rápida que deshaga la pulpa, rompa el hueso y evite los hollejos grandes.
Termo-batidora	Calentamiento de 25-30°C durante 15 min. batido lento y uniforme que produzca una pasta homogénea.
Prensa	Extracción del aceite con prensa hidr <u>áuli</u> ca a una presión de 64 kg/cm.
Decantación	Reposo del líquido extraído en cubas de sedimentación.
Centrifugación	Eliminación de residuos de agua y sólidos extraños.
Filtración	En filtros prensa con filtros de papel o de lona.
Mezclador	Operación de homogenización de un antioxi <u>dante</u> con el aceite.

2.2.2 Valor Alimenticio y Fisiológico

Para evaluar el valor biológico de una grasa alimenticia, se considera fundamentalmente su contenido en ácido linoleico, su digestibilidad, su absorción y su contenido de vitaminas y se compara con los valores presentados por las grasas de mayor uso en la alimentación.

No se debe olvidar que en una dieta existe diferencia de contenido energético entre los diferentes constituyentes de los alimentos; proteínas, carbohidratos y grasas. Las grasas desarrollan hasta 9 calorías por gramo, mientras que las otras desarrollan únicamente cuatro calorías por gramo; Por ello, los aceites y grasas son alimentos con un gran poder energético, radicando principalmente en ello su importancia. Haciendo una comparación de calorías producidas por diferentes alimentos se muestra que el aceite de olivo es el de mayor contenido calórico (7).

CUADRO 1

CONTENIDO CALORICO DE ALGUNOS LIPIDOS

GRASA	cal/kg de alimento
Aceite de olivo	9,454
Aceite de ajonjolí	9,390
Aceite de algodón	9,375
Manteca de cerdo	8,820
Margarina legítima	7,730
Grasa de leche	7,640

Este alto valor energético en el metabolismo es debido a la gran capacidad que tiene para ser absorbido, y a que su equilibrio de constituyentes le imparte una buena fluidez. Unido a esto, las propiedades químicas de baja insaturación facultan una saponificación muy cercana a la reportada como ideal en los organismos sanos.

Las grasas son generalmente tanto más digeribles cuando más se aproxime su punto de fusión a la temperatura del cuerpo humano, lo que es proporcional al contenido de ácido oleico, siendo el aceite de oliva el que encabeza este nivel, sobre otros productos similares de origen vegetal. En el cuadro 2 se presenta la composición y propiedades físicas de varios aceites. El grado de emulsionabilidad tiene también una gran importancia, en la digestibilidad, siendo el aceite de oliva altamente emulsionable.

El porcentaje de asimilación en el organismo humano del aceite de oliva es de 97.7%, mientras que los demás aceites vegetales se sitúan en un intervalo de 93%.

La acción de las altas temperaturas disminuye el valor nutritivo de las grasas, al oxidar y polimerizar fácilmente notables cantidades de triglicéridos insaturados. La manteca y el aceite de oliva se alteran en menor proporción mientras que los aceites semisecantes frecuentemente empleados para este fin (cártamo, girasol, maíz, algodón y soya) experimentan alteraciones mucho más pronunciadas.

Es la composición del aceite de oliva la que le confiere una gran estabi-

CUADRO 2

COMPOSICION Y PROPIEDADES FISICAS DE ACEITES

AC.GRASOS	FORMULA EMPIRICA	PESO MOLECULAR	MAIZ	ALGODON	OLIVA	CACAHUATE	AJONJOLI	SOYA	GIRASOL
Mirístico	$C_{14}H_{28}O_2$	228.37	—	0.55	—	—	—	—	—
Palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	256.42	7.4	22.90	6.00	7.00	7.80	6.50	3.50
Estearico	$C_{18}H_{36}O_2$	284.47	3.50	2.15	4.00	5.00	4.70	4.20	2.90
Araquídico	$C_{20}H_{40}O_2$	312.52	0.60	—	—	4.00	0.40	0.70	0.60
Lignocérico	$C_{24}H_{48}O_2$	368.63	0.20	—	—	3.00	0.10	—	0.40
Olefco	$C_{18}H_{34}O_2$	282.46	46.00	24.70	82.8	60.00	49.30	28.00	34.00
Linolefco	$C_{18}H_{32}O_2$	280.44	42.30	49.70	7.20	21.00	37.70	52.60	58.60
Linolénico	$C_{18}H_{30}O_2$	278.42	—	—	—	—	—	8.00	—
Araquidónico	$C_{20}H_{32}O_2$	304.50	—	—	—	—	—	0.05	—
No. de Iodo			123	110	85	90	110	125-140	133
Indice de Saponificación			189-193	192-200	190-195	189-193	188-193	190-194	189-194

(12)

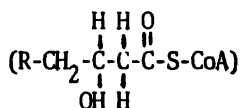
ROKEL INDUSTRIES INC. "OILS AND FATS" ALABANY CALIFORNIA USA.

lidad, lo que permite utilizarla en frío y en caliente. En frío se ha observado que es uno de los aceites que más tardan en enranciarse, mientras que en caliente, conserva sus propiedades durante un período de tiempo más largo que otros (8).

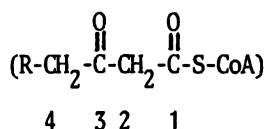
El empleo de aceite vegetales en la alimentación no depende exclusivamente del número de calorías que pueden suministrar sino también de la influencia que efectúan las sustancias tóxicas que se llaman secundarias. Por ejemplo, en el aceite de mora hay mucha fitoestearina; en el ajonjolí, hay fitoestearina y vesamina; en el algodón, por lo menos dos fitoestearinas y gocipol; el de soya, la estigmaesterina. El olivo presenta escasas cantidades de fitoestearina. Por ello es importante conocer las proporciones de estas grasas indeseables en la dieta con el fin de evitar problemas de toxicidad (7).

2.2.3 Importancia de los Lípidos en la Nutrición Animal.

Los ácidos grasos pueden servir en el metabolismo intermediario para la obtención de energía, en cuyo caso han de desdoblarse. Durante este proceso el ácido graso se transforma en un ácido graso - coenzima A mediante la captación de una molécula de ATP. En la siguiente fase los átomos C_2 y C_3 pierden cada uno un átomo de hidrógeno y se fija una molécula de H_2O , de tal manera que el grupo OH queda en el átomo de C_3 . De esta manera se forma un ácido B-hidroxigraso:



Tras una nueva deshidrogenación queda el correspondiente cetoácido:



Este cetoácido, tras nueva intervención del coenzima A, sufre una ruptura - los átomos de C₂ y C₃ . De ello resulta un compuesto ácido graso coenzima A de 2 átomos de carbono y una molécula de ácido acético activado. El ácido graso - remanente va siendo degradado progresivamente, hasta que toda la cadena de áci- dos grasos pasa a ácido acético activado. Durante la segunda deshidrogenación - de una reacción un par de hidrógenos es tomado por flavoenzimas y un par de hi- drógenos por el NAD. Según esto, por medio de la cadena respiratoria pueden ob- tenerse una vez 2 moléculas de ATP y otra vez 3 moléculas de ATP. El "ácido acé- tico activado" proporciona a través del ciclo de Krebbs 12 moléculas de ATP, de tal forma que, por lo general, de cada 2 átomos de carbono de la cadena de áci- do graso pueden obtenerse 17 moléculas de ATP. Por el contrario, de los dos úl- timos átomos de carbono sólo se obtienen 12 moléculas de ATP.

La introducción de las dobles ligaduras en ácidos grasos totalmente satura- dos es una reacción ampliamente difundida en la naturaleza. La reacción opuesta, también llamada de hidrogenación a través de la cual se producen ácidos grasos más saturados, no es común.

Sin embargo, esta reacción ocurre en el tracto digestivo de los animales ru- miantes, siendo realizada por los microorganismos del propio rumen (9).

El ácido linoleico, por ejemplo, es hidrogenado para obtener ácido esteárico. Estas reacciones son complejas, aumentando la participación de isómeros cuando el sustrato tiene mayor número de insaturaciones; este es el caso de los ácidos linolénico y araquidónico.

La hidrogenación de los ácidos insaturados en el rumen ocurre después de - que estos han sido liberados de las grasas por hidrólisis enzimática.

En lo general los rumiantes no sufren deficiencias en ácidos grasos esenciales a pesar de que una gran proporción de los ácidos en la dieta son destruidos por hidrogenación. Esto es debido a que la cantidad que no sufren esta degradación en su paso a través del rumen (4% de los ácidos ingeridos en la dieta) es suficiente para las necesidades del animal.

Las cantidades de grasa administradas en alimentación animal son relativamente escasas. Pese a ello, resultan de importancia como consecuencia de su elevado contenido energético (9500 cal/kg) y por su capacidad específica para influir sobre el organismo animal.

La grasa corporal de los animales puede servirles como reserva energética pero también para desempeñar funciones selectas. Así, la grasa sirve de aislante térmico y también para proteger las cavidades corporales y órganos sensibles como los ojos o los riñones. Especialmente importantes son las fracciones grasas específicas que participan en la composición de las estructuras de las membranas celulares. Así mismo es necesaria la presencia de grasas para el aprovechamiento de las vitaminas liposolubles.

Importancia muy destacada corresponde a los ácidos grasos polinsaturados como compuestos esenciales de la nutrición.

2.2.4 Efectos de la Oxidación de Lípidos.

La propiedad de presentar oxidaciones espontáneas con una exposición al aire esta limitada a los lípidos de los alimentos. Este tipo de reacciones origina nuevos compuestos causantes de problemas en las industrias alimenticias y y en la salud de organismos consumidores. Los constituyentes de los alimentos susceptibles a esta autooxidación son los ácidos grasos insaturados. En algunos casos estas sustancias oxidables estan acompañadas en los alimentos por enzimas y otros catalizadores capaces de acelerar las reacciones con oxígeno.

Los efectos de la oxidación de lípidos se reflejan en la formación de carbonilos volátiles (principalmente aldehídos y cetonas), causando la rancidez. También puede contribuir a la formación de sabores y olores ya sea en forma directa, por eliminación, enmascarando o induciendo otros compuestos. Los radicales libres a su vez pueden interaccionar con otros componentes del alimento, como proteínas, causando su polimerización y bajando su calidad nutricional (10). Los aldehídos y cetonas también pueden interaccionar con aminoácidos o proteínas formando productos del tipo Maillard (ennegrecimiento no enzimático). Otros efectos dañinos de la oxidación es la destrucción de vitaminas y la formación de tóxicos causando problemas de flatulencia, úlceras, hemorragias y degeneración celular en hígado, corazón y riñón (11). La necesidad de evitar estas transformaciones de oxidación resulta evidente.

Los problemas causados por las reacciones de oxidación han logrado tener

una solución al emplear antioxidantes. Todos los antioxidantes utilizados tienen una estructura química semejante, conteniendo un anillo de benceno con algunos grupos hidroxilo o amino. Estos compuestos químicos, cuando son agregados a las grasas, aceites vegetales o animales o a los alimentos que los contienen, les proporcionan gran estabilidad y duración contra el proceso de la oxidación.

La función del antioxidante es proveer un átomo de hidrógeno para completar la estructura electrónica del radical libre. Como donador de hidrógeno, el antioxidante detiene la reacción en cadena y por lo tanto la rancidez por oxidación es retardada, mientras el abastecimiento de antioxidante se agote.

Los antioxidantes de grado alimenticio de mayor uso comercial son: BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), PG (propilgalato) y TBHQ (2 - terbutilhidroquinona). El TBHQ fué aprobado recientemente para su uso comercial (12). Según estudios realizados en comparación con otros antioxidantes (15) (14), muestra ser un potente antioxidante de grasas vegetales y animales poliinsaturados.

Siendo el aceite de oliva un sustrato sujeto a la oxidación de lípidos, - y por consiguiente a problemas de rancidez, a continuación se señalan generalidades de la fisicoquímica de este fenómeno.

El mecanismo de oxidación de ácidos grasos se realiza por medio de radicales libres y la secuencia de etapas es la siguiente:

- (1) $\text{RH} \dots\dots\dots \text{R}^\cdot + \text{H}^\cdot$
- (2) $\text{R}^\cdot + \text{O}_2 \dots\dots\dots \text{ROO}^\cdot$
- (3) $\text{ROO}^\cdot + \text{RH} \dots\dots\dots \text{ROOH} + \text{R}^\cdot$
- (4) $\text{ROOH} \dots\dots\dots \text{RO}^\cdot + \cdot\text{OH}$
- (5) $2\text{ROOH} \dots\dots\dots \text{ROO}^\cdot + \text{RO}^\cdot + \text{H}_2\text{O}$
- (6) $\text{RO}^\cdot + \text{H} \dots\dots\dots \text{ROH}$
- (7) $\text{R}^\cdot + \text{R}^\cdot \dots\dots\dots \text{R-R}$

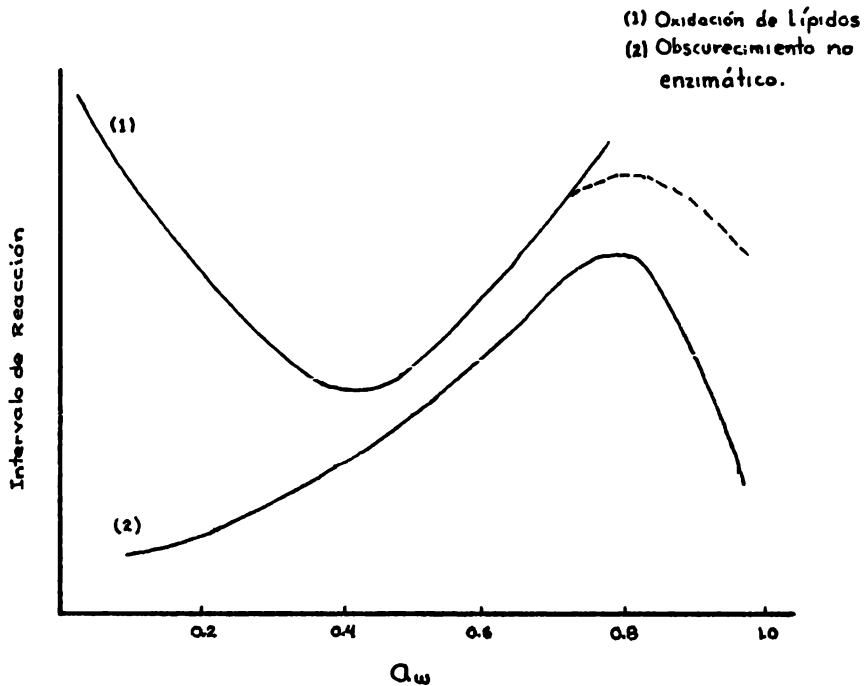
En las ecuaciones 1 a 3 se tiene la fase inductiva con formación de radicales libres, siendo la velocidad de oxidación lenta. Al irse acumulando los peróxidos se pasa a la fase autocatalítica donde éstos se pueden descomponer molecularmente o bimolecularmente (ecuaciones 4 y 5) causando un aumento en radicales libres con aumento en la velocidad de oxidación (15) (16).

La presencia del agua puede aumentar la velocidad de oxidación ya que la movilidad de reactivos aumenta. Por otro lado se tiene el aumento de la superficie de contacto al hincharse las matrices sólidas, lo cuál aumenta el área susceptible a oxidación. Sin embargo el agua puede retardar la oxidación; si hidrata, diluye o precipita (como hidróxidos) a los metales pesados, o bien forma puentes de hidrógeno con los hidroperóxidos. El agua también facilita la recombinación de radicales libres o dona hidrógenos, terminando así la cadena de reacciones (ecuaciones 6 y 7) (17) (18).

En la figura 1 el intervalo de actividad de agua (a_w) que corresponde aproximadamente de 0.4 a 0.5 es el más estable, ya que en esta región la menor cantiti

dad de oxígeno es consumido. Fuera de este intervalo hay un mayor consumo de oxígeno, causando problemas de oxidación, como en los alimentos de humedad intermedia que por lo general tienen un a_w mayor a 0.5 y con alimentos secos con un a_w menor de 0.4 (17).

FIGURA 1
Efecto de la actividad de agua en
algunas reacciones indeseables



2.3 DIGESTIBILIDAD ANIMAL.

Para tener un conocimiento de las propiedades nutritivas de un nuevo ali-

mento, es importante conocer su digestibilidad.

La mayoría de los componentes orgánicos del alimento existen en forma de grandes moléculas insolubles que han de ser convertidas en otras más simples - con capacidad de atravesar la mucosa intestinal para llegar al torrente sanguíneo. El proceso de conversión o degradación es la digestión y el paso de los - nutrientes a través de la mucosa es la absorción (19).

Para hacer la evaluación nutricional de los alimentos existen diferentes métodos, tanto químicos como biológicos. Entre los métodos químicos el más simple es el análisis proximal, que nos indica en forma general los nutrientes -- disponibles en el alimento. Otros métodos comúnmente usados son la determinación de fibra detergente ácido y lignina, que nos indican la cantidad de materia indigerible por el animal. Entre los métodos biológicos se encuentran los realizados "in vitro" e "in vivo". Por razones de economía y tiempo generalmente se emplean los métodos "in vitro" ya que no requieren de la presencia del - animal de prueba. Como contraparte su precisión es menor a los resultados obtenidos con los métodos "in vivo".

2.3.1 Métodos de Determinación

Para conocer la digestibilidad de los distintos alimentos de una dieta, se administra a los animales de experimentación una ración y, mediante análisis de las heces, se determinan las correspondientes cifras a sustraer de los alimentos. Los nutrientes no evidenciados de nuevo en las heces se consideran digeridos. Sin embargo, en las heces también aparecen productos procedentes del - metabolismo orgánico, es decir, componentes originariamente digeridos (proteí-

nas, sales minerales, etc.), de donde se deduce que, la cantidad digerida real es superior a la diferencia existente entre el pienso y las heces. De aquí que los valores obtenidos en una simple experiencia de digestibilidad constituyen la digestibilidad aparente. El correspondiente coeficiente de digestibilidad (CD) se obtiene, para la fracción nitrógenada (o proteína bruta) de un alimento, según el siguiente cálculo:

$$CD = \frac{N \text{ de la ración} - N \text{ de las heces}}{N \text{ de la ración}} \times 100$$

De acuerdo con este simple procedimiento, el contenido nitrogenado de las heces, que procede de proteínas de fermentos o del epitelio intestinal, se estima como nitrógeno (N) no digerido.

De aquí que el coeficiente de digestibilidad aparente resulte demasiado bajo. La digestibilidad verdadera sólo se obtiene teniendo en cuenta los componentes endógenos (derivados del metabolismo) de las heces. En el caso del nitrógeno se determina, por ejemplo, la excreción de N por las heces durante un período en que no se administra con la dieta nada de N. Este nitrógeno fecal es designado como nitrógeno de pérdida intestinal (NPI) y expresa la suma de todas las pérdidas endógenas de N por las heces. Según esto, para conocer la digestibilidad verdadera del coeficiente de digestibilidad se aplicará la siguiente fórmula:

$$CD = \frac{N \text{ de la ración} - (N \text{ de las heces} - NPI)}{N \text{ de la ración}} \times 100$$

La digestibilidad verdadera de las sales minerales sólo puede determinar-

se marcando en forma radiactiva el elemento en cuestión. En cambio, puede depreciarse en la práctica la diferencia existente entre la digestibilidad aparente y verdadera de la grasa bruta, fibra bruta y sustancias extractivas libres de N.

Los estudios de digestibilidad "in vitro" o en rumen artificial se han empleado extensamente con el fin de valorar la utilización de distintas sustancias alimenticias, especialmente forrajes.

Aunque el procedimiento puede variar de uno a otro laboratorio. Barnes - 1967 (20) ha resumido los datos acumulados en numerosos laboratorios que emplearon los mismos forrajes y métodos de determinación con propósitos comparativos. Los pasos esenciales incluyen la fermentación del sustrato que se desea probar por parte de los microorganismos del rumen, en un medio tamponado y durante un período determinado de tiempo.

Esta técnica requiere pequeñas cantidades del material a probar y pueden valorarse muchos forrajes en un período de tiempo relativamente corto. Las posibilidades de evaluar un forraje nuevo, sobre todo cuando el material de que disponemos es limitado, son obvias.

Para justificar el empleo de estos métodos se establecieron los índices de correlación entre la digestión "in vitro" de la materia a probar seca y de celulosa contra evaluaciones "in vivo", alcanzándose valores superiores a 0.9 (21).

2.3.2 Factores que Influyen en la Digestibilidad.

Si se tienen en cuenta las diferencias funcionales digestivas que existen entre los animales rumiantes y no rumiantes, se comprenderá la influencia ejercida por la especie animal sobre la digestibilidad de la ración. Así, los rumiantes aventajan siempre a los no rumiantes en la digestión de la fibra bruta. Si bien la vaca y la oveja digieren la fibra bruta del heno, de trébol, etc., en un 50 - 60%, la digestibilidad de este producto disminuye en el caballo al 35% y en el cerdo al 10 - 20%. La administración a animales no rumiantes de raciones con abundante fibra bruta perjudica también la digestibilidad de los demás nutrientes, ya que la proteína bruta, grasas y extractos libres de nitrógeno se encuentran un 20% de proteína bruta digerible para rumiantes, porcentaje que en el cerdo baja al 10 - 12%. Se ha determinado que la digestibilidad de la sustancia orgánica disminuye por cada 1% de fibra bruta en las distintas especies en la siguiente cantidad: vaca, 0.88%; caballo, 1.26%; cerdo, 1.68%; y gallina, - 2.33% (22).

Las sustancias alimenticias que preferentemente son desdobladas por acción enzimática no muestran diferencias ostensibles en las distintas especies domésticas en lo referente a coeficientes de digestibilidad en todas las fracciones nutritivas (digestibilidad de la sustancia orgánica superior al 80%). En una misma especie animal no existen diferencias de digestibilidad atribuibles a la raza. Así mismo, la edad de los animales tampoco ejerce influencia sobre la digestibilidad de la ración, siempre que realicen una masticación correcta. Tan sólo los animales muy jóvenes, como los terneros o lechones, carecen todavía de las posibilidades de digestión de los adultos. Igualmente las cerdas viejas de cría aprovechan la fibra bruta comparativamente mejor que los cerdos en crecimiento.

El aumento de la cantidad de la ración dentro de los límites fisiológicos no incluye negativamente sobre el coeficiente de digestibilidad.

La modificación de las proporciones en la composición de nutrientes de una ración no influye sobre la función digestiva en lo concerniente a la digestión - enzimática. Por el contrario, se producen alteraciones en la digestión bacteriana de los rumiantes cuando, por ejemplo, a una ración rica en fibra bruta se le agregan hidratos de carbono de fácil aprovechamiento, como el almidón o el azúcar. En este caso se multiplican en gran rapidez las bacterias de la panza encargadas de la degradación amilo y glucolítica, a la vez que las bacterias que realizan el desdoblamiento de la celulosa (degradadoras de fibra bruta) resultan inhibidas, con lo cual disminuye la digestibilidad de la sustancia orgánica de la ración - fundamental. Este fenómeno se denomina demérito digestivo.

El valor nutritivo de los alimentos clasificados como de baja calidad i.e. baja digestibilidad, en la alimentación animal depende de las características de la materia de las membranas celulares. La lignina es un material amorfo que aparece químicamente en la fracción de las membranas celulares y que físicamente esta asociada con los carbohidratos fibrosos de las membranas celulares (por ejemplo, la celulosa y la hemicelulosa). La lignina interpone una barrera física que impide la acción de los microorganismos o de sus enzimas hidrolíticas sobre estos hidratos de carbono. La lignina es un constituyente principal de los vegetales - que han dejado de madurar, esta lignificación no sólo sucede en tallos sino también en sus hojas y vainas.

La lignina es un polímero aromático tridimensional formado por la polimeriz

zación oxidativa de los tres alcoholes cinamílicos sustituidos (p-cumaril alcohol, coniferil alcohol y sinapil alcohol) la proporción de estos alcoholes va ría en los vegetales con el origen filogenético. La lignina es un compuesto -- complejo en su estructura y con una proporción mucho más elevada de carbono que en los carbohidratos. La presencia de nitrógeno en su determinación, proviene - del protoplasma viejo, atrapado dentro de la célula que se ha llenado de lignina (23). La lignina no es un carbohidrato pero se estudia en este grupo de compuestos por estar en íntima asociación con la celulosa y hemicelulosa.

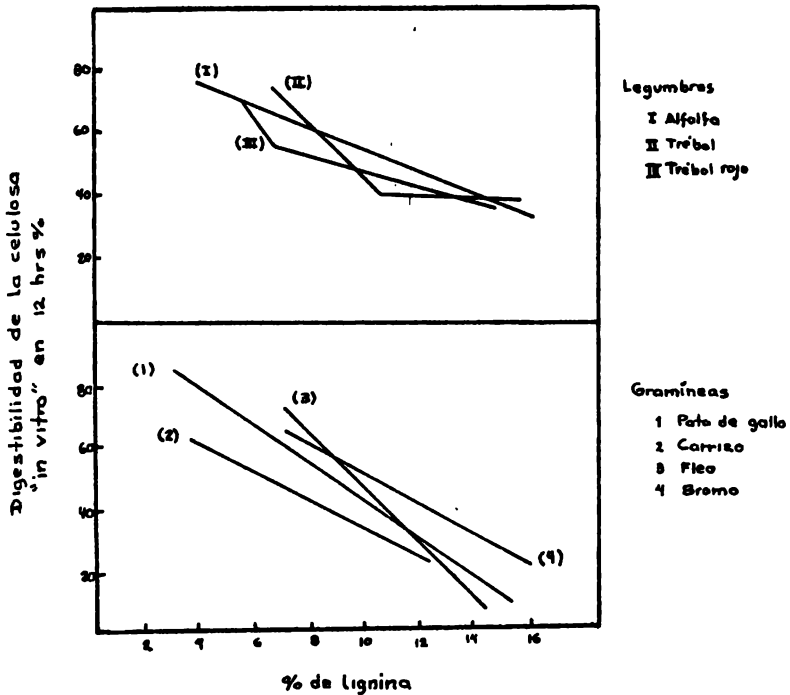
Un exámen de los residuos de los alimentos no concentrados consumidos por los rumiantes muestran que las únicas partículas de los tejidos de las plantas- que se hallan intactas son aquellas que estan lignificadas (24).

Hay pruebas de que la lignina entorpece la digestibilidad de toda la materia seca de un forraje por el simple mecanismo de aislar a esa materia suceptible de digestión del ataque de las enzimas por medio de paredes endurecidas de las células. La demostración experimental se logra cuando se agrega lignina purificada en pequeñas cantidades a una ración, sin presentar la depresión de digestibilidad que podría esperarse con una cantidad igual de lignina en un forraje natural (23).

La cantidad de celulosa que puede ser digerida en el rumen depende particularmente del grado de lignificación del material vegetal. En pastos no maduros que contienen sólo 5% de lignina en base seca, el 80% de la celulosa puede ser digerida, pero en pastos viejos con 10% de lignina la proporción de celulosa di gerida será menor de 60%.

Existen correlaciones entre el contenido de lignina y la digestibilidad aparente en especies e incluso en clases de forrajes (fig. 2) (21).

FIGURA 2
Relación entre contenido de lignina y digestibilidad aparente para varios forrajes



En consecuencia puede establecerse con seguridad que existe una relación negativa entre el contenido de lignina y el valor nutritivo de un producto.

2.4 IMPORTANCIA DE MOLIBDENO Y SELENIO EN LA NUTRICION ANIMAL.

Algunos elementos minerales resultan esenciales para el crecimiento, conservación y funcionamiento de los tejidos corporales. Son precisas cantidades y

proporciones mínimas para equilibrar las pérdidas corporales que se están produciendo constantemente, de modo que un consumo inferior al normal de dichos minerales pueden provocar graves trastornos metabólicos y funcionales (cuadro 3). En otras ocasiones el consumo excesivo de un determinado mineral puede provocar síntomas de intoxicación, bien directamente o mediante la alteración del metabolismo normal de otro mineral (25).

A causa de la elevada o baja concentración que presentan estos minerales en los tejidos animales suelen denominarse macronutrientes o micronutrientes. Dentro de los micronutrientes se encuentran el selenio y el molibdeno y no obstante que son esenciales, causan síntomas tóxicos cuando sobrepasan las cantidades de requerimientos en las dietas. Esto se presenta frecuentemente con animales apacentados en algunas regiones en donde los terrenos son arcillosos de naturaleza calcárea y alcalina, y donde en consecuencia la composición botánica de las plantas ha sido afectada (25).

El retraso del crecimiento, la pérdida de peso corporal junto con una elevada mortalidad, constituyen manifestaciones invariables de la intoxicación grave por molibdeno en todas las especies, siendo la diarrea característica del ganado vacuno (25).

En la intoxicación por selenio hay pérdida de pelo en las crines y cola de los caballos, en la cola de vacunos, y pérdida general de pelo en el ganado de cerda; decrece el consumo de alimentos y la muerte puede producirse por inanición (26).

CUADRO 3

REQUERIMIENTOS DE MINERALES EN NUTRICION ANIMAL.

MACROPONDERALES MINERAL	REQUERIMIENTO/DIA	MICROPONDERALES MINERAL	REQUERIMIENTO/DIA
Fósforo	40 gr.	fierro	30mg/kg ext. seco
calcio	0.3% ext. seco	cobre	5-10mg/kg ext. seco
magnesio	0.1-0.3% ext. seco	zinc	30-50mg/kg ext. seco
sodio	0.2-0.4% ext. seco	manganeso	10-30mg/kg ext. seco
potasio	0.2-0.4% ext. seco	iodo	0.3-1mg/kg ext. seco
cloro	0.2-0.4% ext. seco	selenio	0.5-1mg/kg ext. seco
		molibdeno	60-100µgr/kg ext. seco

III ANTECEDENTES

3.1 UTILIZACION DE SUBPRODUCTOS DEL OLIVO.

Después de extraído el aceite de la oliva, quedan fundamentalmente dos sub productos: el orujo y el agua de vegetación o alpechines. El orujo tiene todavía valor comercial, debido al aceite que contiene y el alpechin aunque de escaso interés, no han faltado estudios e investigaciones para intentar revalorizarlo.

3.1.1 El Olivo.

El orujo, residuo más importante de la extracción del aceite de oliva, se denomina "orujo virgen" o "orujo graso" cuando procede directamente de la planta de obtención de aceite de oliva y "orujillo" o "orujo agotado" si se obtiene como residuo después de la extracción por disolventes del aceite del orujo graso. El orujo graso está formado por fragmentos de piel, pulpa, hueso y almendra, conservando la grasa y humedad natural de la oliva.

La producción media mundial de orujo graso se puede estimar alrededor de las 650,000 toneladas métricas anuales, cuya composición media oscila entre los valores que se dan a continuación (cuadro 4), referidos a la composición del -- orujo a la salida de la prensa (27):

CUADRO 4
COMPOSICION DEL ORUJO GRASO DE OLIVA

COMPONENTE	%
Humedad	10-15
Grasa	6-15
Proteínas	7-13
Glúcidos	32-42
Fibra bruta	27-42
Cenizas	3-8

Los componentes minerales también varían dentro de muy amplios límites, según la procedencia. Los elementos predominantes son el potasio y el calcio, mientras se encuentran en orden decreciente el fósforo, sodio, azufre y magnesio (cuadro 5) (28).

CUADRO 5

MINERALES PRESENTES EN LAS CENIZAS DEL ORUJO DE OLIVA

ELEMENTO	PORCENTAJE EN LAS CENIZAS
Potasio	19.19
Silicio	3.65
Calcio	16.08
Fierro	1.66
Fósforo	2.20
Magnesio.....	0.97
Azufre	2.06
Cloro	1.50
Sodio	1.18

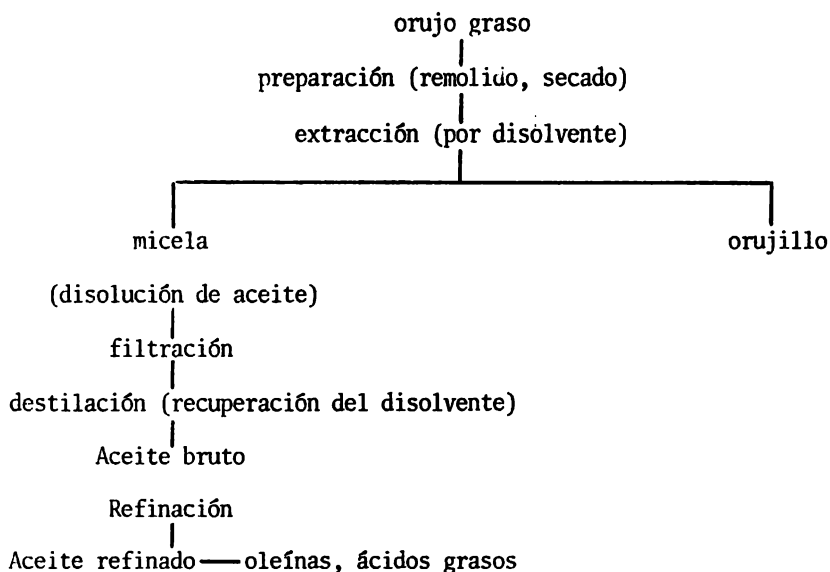
El contenido de agua desciende del 15 al 20% después de algunos días al aire libre. Este porcentaje de agua favorece un gran aumento de la flora fungal criptogámica (*Gliomastir chartarum*, *Aspergillus niger*, *Cephalosporum* sp., *Penicillium glaucum*, *Aspergillus glaucus*, etc.) y de las lipasas presentes en la almendra, dando como resultado que en pocas semanas la acidez del aceite de los orujos pueda alcanzar valores del 50 al 60%, partiendo de un valor inicial del 5-6%. Se forman oxiácidos, aldehídos y otros productos de reacción como resultados del enranciamiento del aceite.

3.1.1.1 Recuperación del Aceite Residual

En la actualidad prácticamente la única utilización industrial del orujo

graso de oliva es la extracción de su aceite mediante disolventes, Existe una producción media de aceite de orujo graso de aproximadamente 52,000 toneladas (8), en su mayor parte de baja acidez, con destino a refinación para su consumo en la alimentación y un porcentaje cada día más bajo, de aceites de mayor acidez, con destino a usos industriales.

El siguiente esquema es indicativo de las sucesivas manipulaciones durante la obtención de aceite a partir del orujo graso.



Como se observa en la técnica de extracción, se requiere de un secado con objeto de reducir la humedad. El propósito de esta operación consiste en facilitar la penetración del disolvente y evitar problemas fermentativos y de oxidación durante el almacenamiento del orujo. Existe, pues, un valor óptimo de hume

dad por encima del cuál los orujos se alteran, mientras que por debajo de él -- disminuyen las ventajas.

3.1.1.2 Como Alimento Animal

La preparación del orujo para su empleo en la alimentación animal, requiere una separación previa de la parte correspondiente de la piel, pulpa y almendra, de los correspondientes fragmentos del hueso. El rendimiento medio de la parte pulposa obtenido gracias a las deshuesadoras varía entre 50 y 60%

El deshuesado del orujo debe hacerse, en primer lugar, debido á la irritación que produce la parte leñosa sobre el aparato digestivo y además, porque -- los valores de digestibilidad para la grasa y las proteínas, así como de otros-constituyentes, son aproximadamente el doble de los registrados para los orujos integrales (no deshuesados), dado que con el deshuesado, el rendimiento alcanza del 50 al 60% y los fragmentos del hueso están prácticamente exentos de proteínas y lípidos. El contenido de fibra bruta (aún muy alto) de los orujos deshuesados, parece ser debido a pequeños trozos de huesos, que no pueden ser separados mecánicamente.

Aproximadamente desde la década de 1930, se han venido realizando estudios sistemáticos, principalmente en el Instituto Experimental Zootécnico de Roma, - con el fin de investigar la digestibilidad y el valor nutritivo de los orujos - de oliva, así como en la Facultad de Veterinaria de Córdoba España. A continuación se exponen los estudios de mayor importancia.

La incorporación de un 5 a 10% de pulpa de oliva virgen en la alimentación

de corderos de engorde, conlleva una reducción en la cantidad de comida ingerida (hasta un 20%) y una disminución importante de su velocidad de crecimiento - (que es dos veces menos elevada).

Esta reducción de la cantidad de comida ingerida no se presenta en ovejas que sólo reciben cantidades limitadas de alimento concentrado complementadas - por forrajes (henificados o en verde). A las ovejas de raza siciliana se les suministró como complemento de pasto, 200 grs. de una mezcla mitad orujo de oliva, mitad trigo, lo cual reduce de manera significativa el peso de nacimiento de sus corderos (3.6 Kgr en lugar de 3.9) (8).

Castejon et al. en 1966 (27), observaron que la ganancia de peso de los corderos merinos de un año, alimentados con heno de avena, residuo no graso de soya y trigo, es significativamente mayor que la ganancia de animales análogos cuyo régimen, igualado en nitrógeno con el anterior, se compone de orujos deshuesados y sin aceite, sustituyendo a una parte de heno de avena y de torta - de soya.

Para el engorde de cerdos también se ha estudiado el empleo del orujo deshuesado, comprobándose que no existe una influencia sensible sobre la consistencia de la grasa y la calidad de la carne (28).

Se emplearon dos mezclas de engorde, una tipo habitual y otra con orujo deshuesado:

MEZCLA A
Salvado de trigo 20%
Harina de maíz 50%
Residuo no graso de coco. 30%

MEZCLA B
Salvado de trigo 20%
Harina de maíz 30%
Orujo deshuesado..... 50%

Durante la experiencia de 64 días, el crecimiento medio de un kilo de - peso en vivo, necesitó un consumo de 7.41 kg de mezcla para los ejemplares alimentados con la mezcla a base de orujo, frente a 4.95 kg de la mezcla a base - de maíz.

En 1964 (24) se efectuaron experimentos con ovinos de 3 años y sus crías de 8 a 10 días realizandose con dos diferentes alimentos.

LOTE A
Paja 50%
Hojas de olivo (seca) 50%

LOTE B
Paja 66.66%
Pulpa de orujo (seco) ... 33.33%

Durante el período de 7 meses que duró el experimento se observó lo si- guiente:

- a) El peso de las crías en los lotes A y B fué en aumento por igual du- rante los 4 primeros meses, encontrandose una ligera disminución en- la evolución entre el cuarto y quinto mes. Posteriormente del quinto mes en adelante existió un declive del peso ganado. Las crías alimentadas con orujo de oliva presentaron menor peso que el lote A al fi- nalizar el experimento.

- b) El peso de los ovinos (3 años), en el caso del lote A logró un ligero aumento con respecto a su peso inicial de un 12%, transcurridos los 7 meses. En el lote B, la evolución fué menos favorable, existiendo al final una ligera disminución del peso inicial registrado de un 5%. Se observó que el alimento no indujo un apetito creciente, observandose inclusive de oliva, durante el período de experimentación.

Maymone y Carusi, realizaron en los años 1932 - 1934 (28), unas pruebas de digestibilidad con orujo graso deshuesado sobre vacas, terneros y borregos, observando en conjunto una digestibilidad muy débil para las proteínas y los extractos no nitrogenados, muy elevada para los lípidos y relativamente débil para la fibra bruta. El hecho más significativo resultante de todas estas experiencias radica en la baja digestibilidad de las proteínas. Valores de digestibilidad total aún más bajos fueron encontrados por Meade y Guilbert con orujos grasos de aceitunas de california.

Maymone y Givstozzi (28) realizaron, durante 94 días, experiencias con 14 vacas que se encontraban en período de crianza. La comparación se hizo con maíz y orujo graso, ya que no se presta a ninguna comparación con otros alimentos más ricos en proteínas.

Los resultados pusieron en evidencia una ligera disminución de la producción de leche durante los períodos, en los cuales fué administrado orujo en lugar de harina de maíz, por lo contrario, se observó un aumento neto del porcentaje de lípidos en la leche. Los resultados muestran ya sea un efecto por la baja apetencia o por causa del elevado porcentaje de fibra cruda. En consecuencia

no es recomendable abusar del orujo graso, limitandolo en el intervalo de 10 a 15 % de la ración total, siendo la baja proporción proteica compensada por otros componentes.

Estas pruebas también se realizaron con becerros pero en estos casos no conviene pasar de un 10% de orujo en la mezcla nutritiva, para no hacerla muy voluminosa y disminuir la apetencia de los animales.

Pais et al. en 1956 (29) efectuaron un estudio de digestibilidad con harina de orujo de oliva, obteniendo en buenas condiciones de conservación (7 meses de almacenamiento), con olor característico no desagradable, de color café oscuro, aunque ligeramente quemado sin fragmentos de hueso u otros desperdicios y con una presentación física del producto aceptable. La composición de la harina de orujo utilizada es como sigue:

COMPONENTES	%
Cenizas	3.02
Proteína bruta	10.63
Extracto etéreo	18.02
Fibra cruda	22.13
Sust. extrañas libres de nitrógeno	46.20

La digestibilidad fué evaluada por el método clásico del balance digestivo, experimentandose con ovinos. Los resultados fueron los siguientes:

MATERIA SECA	COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD %
Harina de orujo	45.8
Proteína bruta	20.4
Extracto etéreo	93.0
Fibra cruda	53.6
Extracto libre de nitrógeno	27.6

De estos resultados se corroboró la alta digestibilidad de los lípidos presentes en el orujo, contra un bajo valor para la proteína.

B. Maynone y A. Carusi (1932 - 1934) (28) reportaron los siguientes resultados:

CUADRO 6

DIGESTIBILIDAD DE LOS COMPONENTES DEL ORUJO VIRGEN DESHUESADO

	Proteínas brutas %	Proteínas puras %	Lípidos %	Fibra %	Ext. no nitrogenado %
Orujo virgen deshuesado (1932)	19.36	17.71	84.08	33.62	27.14
Orujo virgen deshuesado (1934)	15.75	15.83	86.55	38.12	37.97
Media	17.55	16.77	85.31	35.87	32.52

CUADRO 7

DIGESTIBILIDAD DEL ORUJO DE OLIVA DESHUESADO COMPARADO CON ALIMENTOS DE USO
COMUN EN ALIMENTACION ANIMAL (28)

ALIMENTO	DIGESTIBILIDAD %
Orujo virgen deshuesado	27-38
Avena	65-94
Arroz	87-96
Maíz	87-100

CUADRO 8

PRINCIPALES RESULTADOS DE DIGESTIBILIDAD EN ORUJO DE OLIVA(8)

AUTORES	AÑO	TIPO DE TORTA	COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDAD		
			MATERIA NITROGENADA	MATERIA GRASA	CARBOHIDRATOS
Kellner	1924	Orujos vírgenes	6.6	65.5	28.4
Meade y Guilbert	1927	Orujos vírgenes	negativo	86.0	0.0
Mavmone y Mattaglini	1962	Orujos vírgenes deshuesados	15.5	85.5	12.8
		Pulpa grasa (des huesada antes de moler)	21.5	85.6	negativo
Thierez y Boule	1971	Orujos vírgenes	23.6	23.6	—
Thierez, Skouri y Montrichard	1967	Torta de almendra	83.7	83.7	—

(40)

Ultimamente han aparecido varios trabajos y patentes (20), sobre estos - mismos temas, que aunque en esencia son similares a todo lo expuesto anteriormente, difieren en la forma de tratar el orujo para conseguir hacerlo más asimilable, eliminando la parte fibrosa del mismo. También existen proporciones - para aumentar la riqueza proteica del orujo mediante cultivos especiales a través de fermentaciones que aumenten el contenido de nitrógeno asimilable.

3.1.2 El Alpechin

Los alpechines son el residuo líquido, no oleoso, separado por sedimentación o centrifugación, en la extracción del aceite de oliva. Es un líquido oscuro de olor desagradable. Si se conoce que la oliva contiene, por término medio, hasta un 50% de agua, se ve claramente el interés económico que puede presentar cualquier utilización industrial de este residuo. Además se trata de un producto molesto, cuya eliminación puede llegar a hacerse obligatoria debido a que estas aguas de vegetación dan lugar a un efluente de materia orgánica que se eleva casi al 15% de una D.B.O. (Demanda Biológica de Oxígeno) de las aguas residuales que vierten a los cursos normales de agua. En Inglaterra, la ley autoriza un - máximo de 20 ppm. de D.B.O. mientras que el alpechin da lugar a un efluente - que varía de 40 a 80,000 ppm. de D.B.O. (21).

LA COMPOSICION QUIMICA DEL ALPECHIN

Agua	83.2%
Materias Orgánicas	15.0%
Sustancias grasas	0.03-1.0%
Sustancias nitrogenadas	1.20-2.4%
Azúcares	2.00-8.0%
Acidos Orgánicos	0.50-1.5%
Polialcoholes	1.00-1.5%
Pectinas, mucílagos y taninos	1.00-1.5%
Glucósidos	trazas
Minerales	1.8%

Entre los azúcares se encuentran la glucosa, manosa, sacarosa , fructuosa, rafinosa, etc..

Los ácidos orgánicos presentes son: acético, fumárico, glicérico, láctico, málico, malónico, tartárico, oxálico, etc..

De las sales minerales, según el análisis del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas de España, el análisis de un alpechin español dió las siguientes cifras:

CUADRO 10
MINERALES PRESENTES EN EL ALPECHIN

P_2O_5	13.75%	FeO	0.65%
SO_3	2.57%	CaO	5.85%
SiO_2	0.30%	MgO	0.47%
Cl_2	2.00%	K_2O	47.00%
Na_2O	6.53%		

En 1953, Fiestas (30) publicó las experiencias efectuadas con el alpechin para obtener levaduras alimenticias, ricas en proteínas y vitaminas, utilizando cepas de la levadura *Torulopsis utilis*. Según Fiestas debido a su composición química, su pH y su capacidad tampón, constituye una excelente materia prima para la obtención de levaduras alimenticias.

En un trabajo posterior el mismo autor describe la cinética de crecimiento de las levaduras, en función del contenido en azúcares. Las levaduras obtenidas contienen todos los aminoácidos esenciales, particularmente porcentajes altos de alanina- prolina y de leucina-isoleucina: porcentajes intermedios de serina, treonina, glicina y valina-triptofano y porcentajes inferiores aunque sensibles de cistina, tirosina, metionina y fenilalanina.

En 1953 Garrido M. et al. (3) en una patente de invención mencionan que es necesario completar los azúcares contenidos en los alpechines para su transformación mediante procesos fermentativos en productos de aplicación industrial,

tales como el etílico, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, acetona - butanol, glicerina, grasas, 2-3 butanol glicol y levaduras para utilización como pienso.

En 1960 Albi R, y Fiestas (30) afirman que los alpechines pueden utilizarse como fertilizantes en agricultura, a causa de su elevado contenido en potasio (1.0%) y en fósforo (0.3%).

3.1.3 La Almendra

La almendra de oliya junto con el hueso son un desperdicio en la elaboración de aceituna de mesa deshuesada. Esta almendra es rica en proteínas, y, por sus aminoácidos, se considera de buena calidad (cuadro 13) (31). Las pruebas de digestibilidad efectuadas en rumiantes, muestran que la proteína es asimilable (cuadro 8).

CUADRO 11

COMPOSICION DE LA ALMENDRA (31)

COMPONENTE	%
Proteínas	22.06
Humedad	4.60
Cenizas	2.17
Grasa	37.37
Carbohidratos (por diferencia)	33.80
Nitrógeno	3.53
Magnesio	0.01
Calcio	0.21
Fosfato inorgánico	0.38
Fierro	0.02

COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL ACEITE DE ALMENDRA (31)

COMPONENTE	%
Oleico	62.32
Linoleico	19.72
Palmitico	8.94
Linoleico	2.87
Mirístico	0.08
Esteárico	3.46
Otros ácidos	1.31

Dos experimentos hechos por Theriez et al. en 1966 (8) sobre corderos con firman esta hipótesis. La torta de la almendra puede remplazar sin inconvenientes (descenso en el consumo o disminución de la velocidad de crecimiento) las fuentes tradicionales de nitrógeno de los rumiantes, como tortas de lino y de chícharo.

La torta de almendra de oliva tiene una composición en aminoácidos intersante en comparación con otras proteínas (cuadro 14), toda vez que la metionina y lisina que contiene representan respectivamente el 2 y 4% de las proteínas. Así mismo, es posible sustituir la mitad de la torta de soya por la de la almendra de la aceituna en la alimentación de aves a partir de las cuatro semanas de edad, sin que se observe reducción en la cantidad ingerida o en la velocidad de crecimiento de los animales.

Por el contrario, la sustitución de la totalidad de la torta de soya por

(45)

CUADRO 13
COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE LA ALMENDRA
DE OLIVA

AMINOACIDOS	PORCENTAJE EN 100g DE MUESTRA
Aspártico	2.36
Treonina	0.97
Serina	1.35
Glutámico	4.10
Glicina	1.13
Alanina	1.09
Valina	1.41
Isoleucina.....	1.15
Leucina	1.80
Tirosina	0.93
Fenilalanina.....	1.25
Lisina	0.95
Histidina	0.51
Arginina	1.79
Cistina	0.35
Metionina	0.48
Triptofano.....	0.33
Total	22.05

CUADRO 14

COMPARACION DEL CONTENIDO DE AMINOACIDOS DE LAS PROTEINAS
DE ALMENDRA, TRIGO Y SOYA (31)

AMINOACIDOS	ALMENDRAS DE OLIVA	HARINA DE TRIGO (70-80% DE EXTRACCION)	PROTEINA DE SOYA
Isoleucina	84	58	72
Leucina	93	80	88
Lisina	62	30	92
Metionina	65	43	39
Fenilalanina	100	85	86
Treonina	87	53	75
Triptofano	94	72	86
Valina	94	60	70

la almendra de oliva, no da los mismos resultados satisfactorios.

Miladi y Hegsted en 1974 (31) alimentaron a un grupo de ratas con proteína de la almendra de oliva (extraída con alcohol). Los resultados fueron satisfactorios, determinándose que las proteínas en la dieta tenían una eficiencia nutricional del 50% comparada con la calidad de las proteínas de la lactoalbúmina.

3.1.4 El Orujillo

El orujillo, es el residuo sólido que resulta después de extraer con disolvente el aceite residual del orujo graso de oliva. Algunos valores de interés son:

CUADRO 15
COMPOSICION DEL ORUJILLO (20)

COMPONENTE	%
Humedad	11.75
Proteínas brutas	7.13
Grasa	2.30
Cenizas	8.00
Fibra Cruda	27.40
Glúcidos	11.00

En 1954, una Compañía Española en una de sus patentes (32) refiere un procedimiento para convertir el orujillo, en abono orgánico, especialmente indicado para el cultivo del olivar. Este estudio consiste en inocular en la masa del orujillo microorganismos fijadores de nitrógeno. La fermentación se realiza operan-

do bajo condiciones controladas, con objeto de disminuir el tiempo de la fermen
tación. Una segunda etapa de la fermentación continúa al aire libre hasta el to
tal logro del abono orgánico.

En el Instituto de la Grasa en España (27) desde 1964 se viene efectuando la preparación del orujillo para abono, siguiendo las técnicas generales de pre
paración conocidas como composteado, empleando alpechin o agua y agregando una sal amónica para facilitar el proceso de fermentación.

3.2 POBLACION GANADERA EN BAJA CALIFORNIA NORTE.

GANADO	CABEZAS
bovino	90,555
porcino	128,220
ovino	21,998
caprino	352,310

La principal zona ganadera de Baja Calirofnia Norte, son las regiones com
prendidas entre Ensenada y Rosarito y entre Tijuana y Tecate (33).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Tratamiento de la Materia Prima.

El orujo graso de oliva empleado en el presente estudio, fué el recién desechado en el proceso de extracción de aceite, en distintas etapas de la temporada de producción, procedente de la región olivarera de Ensenada, Baja California Norte.

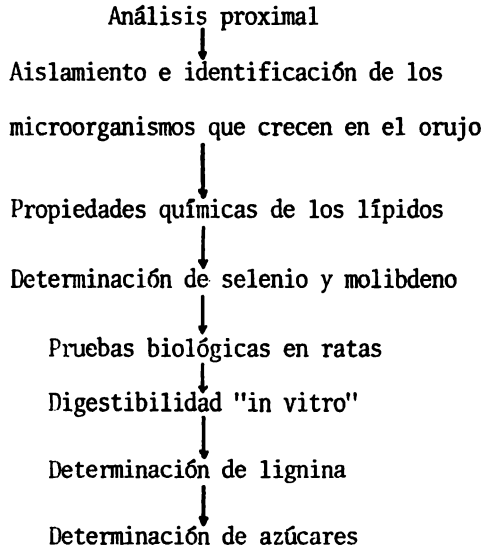
El orujo se almacenó en bolsas de plástico, forradas con papel aluminio y se almacenó en el congelador a - 20°C.

En la fase de estudio, el orujo deshuesado, fué primeramente secado a 40-45°C, con circulación de aire, durante aproximadamente 3.5 horas, logrando una humedad entre 5 y 10 % . El deterioro térmico del producto bajo estas condiciones se considera bajo, se escogieron esas condiciones después de haber observado el efecto de diversas temperaturas, empleando el Índice de Peróxidos como parámetro normativo. Las temperaturas inferiores a 45°C, muy a pesar de reducir notablemente la oxidación, requerían tiempos de tratamiento demasiado altos para alcanzar el nivel de humedad deseado, produciendo con ello un nivel de oxidación similar.

Una vez seco el producto, se molió en un mortero, y posteriormente se tamizó por medio de una malla de 1 mm.. La separación del hollejo se realizó haciendo pasar una corriente de aire. El procedimiento anterior se llevó a cabo con objeto de lograr resultados similares a la técnica de ventilación para el deshuesado del orujo, utilizada industrialmente (34) (35).

CUADRO 16

SECUENCIA EXPERIMENTAL



4.2 ANALISIS PROXIMAL.

Este análisis se realizó en el orujo de oliva, hollejo, pulpa, hueso y en el orujo de oliva deshuesado, de acuerdo a los métodos oficiales especificados en el Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) (36).

SECCION A.O.A.C.

a) Humedad	27.3
b) Proteínas	2.25
c) Extracto etéreo	27.25
d) Fibra cruda	27.28
e) Cenizas	27.29
f) Carbohidratos. Determinados por diferencia	

4.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS.

En el orujo de oliva se presenta un crecimiento microbiano abundante, a partir de la tercera semana de almacenamiento al aire libre, también se presenta este crecimiento en orujo almacenado en refrigeración (9°C)

i) Aislamiento de Microorganismos.

Método por dilución en agar. Se toma 1 g de orujo de oliva con crecimiento microbiano (1 mes de almacenamiento), se agrega a 50 ml de agua estéril y se agita, se toma 1 ml de la solución y se lleva a un tubo de ensayo con 10 ml de medio de cultivo (Sabouraud-agar) a una temperatura tal que el agar no solidifique, se agita, se toma 1 ml y se añade a un segundo tubo en condiciones similares. El resto del medio del primer tubo se vierte en una caja petri. Del segundo tubo se transfiere 1 ml a un tercero y así sucesivamente, con objeto de obtener en las cajas petri el desarrollo de colonias que pueden ser aisladas posteriormente y obtener cultivos puros.

Las cajas petri inoculadas fueron incubadas a temperatura ambiente el tiempo necesario para el desarrollo de los microorganismos.

ii) Identificación del Hongo Aislado.

La razón de haber seleccionado sólo un hongo, se debe a que este presenta una gran predominancia durante las primeras semanas de almacenamiento, siendo durante este período cuando el orujo de oliva aún puede utilizarse para los fi

nes del presente trabajo, dada la composición química del aceite.

La identificación se realizó de acuerdo a características tanto macroscópicas como microscópicas de los hongos.

Las características macroscópicas se hizo en colonias gigantes, para lo cual se sembró el hongo por picadura en el centro de una caja petri con medio de cultivo. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente.

Las características observadas fueron las siguientes:

- Forma de la colonia
- Tipo y largo del micelio
- Humedad de la colonia
- Color de la colonia por encima y debajo de la caja
- Cambio de la coloración de la colonia
- Cambios de coloración en el medio

La caracterización morfológica microscópica se efectúa mediante la preparación de microcultivos, empleando como medio de propagación del hongo, bloques de medio de cultivo V-8 agar de 1 cm de lado y 0.5 cm de alto.

La técnica del microcultivo es la siguiente:

En una caja petri con medio de cultivo solidificado se colocan cuatro -- bloques del mismo medio de cultivo, los cuales son inoculados con el hongo por todas sus caras laterales e inclusive la cara superior. Posteriormente se coloca un cubre-objetos estéril sobre cada bloque inoculado. Permitiendo el desarrollo del hongo, que queda adherido al cubre-objetos. Este último se separa del blo-

que y se coloca sobre un porta-objetos con una gota de Lactofenol de Arman (37) como medio de contraste en la observación. No es aconsejable teñir el hongo para observarlo en el microscopio ya que se pueden afectar sus estructuras. En forma similar se procede con 3 cajas petri con 4 bloques cada una, de las que se hacen preparaciones cada dos días, para determinar el tiempo al cual el crecimiento es el conveniente.

Por último para que la preparación sea conservada, se sellan las orillas del cubre-objetos con barniz de uñas transparente.

Para la identificación del género de los diferentes hongos, se siguió la clave de Gilman (38), observando las estructuras de reproducción características microscópicas, el micelio y características macroscópicas del hongo.

4.4 CARACTERIZACION DE LOS LIPIDOS PRESENTES ES EL ORUJO.

4.4.1 Propiedades Químicas.

Los ácidos grasos son ácidos alifáticos de cadena larga, saturada o con uno o más dobles enlaces y constituyentes las unidades fundamentales de los lípidos. Según sean las características de los ácidos grasos presentes será la naturaleza de la grasa correspondiente.

Las determinaciones se realizaron de acuerdo a los métodos oficiales especificados en el A.O.A.C. (36). La extracción de los lípidos del orujo de oliva fresco se realizó por el método Soxhlet utilizando como disolvente éter etílico.

SECCION A.O.A.C.

a) Acidez libre	28.03
b) Indice de peróxidos	28.023
c) Índice de saponificación	28.026
d) Indice de iodo	28.020

4.4.2 Identificación de los Acidos Grasos

El análisis de los ácidos grasos presentes en el aceite del orujo de oliva deshuesado fué realizado por cromatografía gas-líquido.

i) Extracción de Acidos Grasos y Preparación de Esteres Metílicos.

La extracción de los ácidos grasos fué por el método Soxhlet utilizando como disolvente éter etílico.

Obtenido el aceite, se tomó 1 ml de aceite y se le agregaron 3 ml de KOH en solución alcohólica al 20%, y se puso a reflujo durante 15 minutos; al irse formando las sales de ácido graso se observa que las dos fases que se tenían inicialmente, pasan a ser una sola. Este primer paso se realizó con el objeto de efectuar una hidrólisis alcalina, utilizando una base fuerte. Una vez que la hidrólisis hubo terminado, se pasaron las sales de ácidos grasos hasta la completa disolución del jabón. La fase acuosa, que contenía las sales de ácido graso, se acidificó con HCl concentrado hasta alcanzar un pH de 3.0 liberando así una mezcla de ácidos carboxílicos libres.

A continuación se extrajeron los ácidos libres con hexano, para lo cual los ácidos ya liberados se pasaron a un embudo de separación y se agregaron 20

ml de hexano, se agitó y se dejó reposar hasta que las dos fases se separaron. Como siguiente paso, se descartó la fase acuosa, y la porción ácido graso-hexano se lavó con agua para eliminar el exceso de ácido que pudo haber quedado. La porción del hexano, se secó con Na_2SO_4 anhidro hasta quedar la disolución cristalina, se filtró y eliminó el hexano en un rotavapor.

En un matraz de 30 ml., los ácidos grasos hidrolizados fueron depositados y se añadieron 2 ml. de trifluoruro de boro en metanol y unas gotas de ácido sulfúrico concentrado, dando esto un color blanquecino que desapareció conforme se formaron los ésteres metílicos; se pusieron a réflujo inmediatamente durante 20 minutos hasta que se observaron dos fases, siendo la fase superior la de los ésteres metílicos. Una vez obtenidas las dos fases, se depositó la mezcla en un embudo de separación y se añadieron 7 ml. de CCl_4 , se descartó la fase acuosa y la superior se secó con Na_2SO_4 anhidro. Los ésteres se diluyeron con 5 ml. de tetracloruro de carbono quedando así listo para inyectarse en el cromatógrafo de gases.

ii) Determinación por Cromatografía de Gases.

Con objeto de determinar los ácidos grasos presentes, se trabajó con los ésteres metílicos de los mismos, mediante la técnica de Cromatografía Gas-Líquido.

La separación e identificación de los diferentes ácidos grasos se efectuó en un cromatógrafo varian aerograph, modelo 2100 integrador Spectra-Physics sp 4100 del Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, U.N.A.M.

La identificación de los ácidos grasos se hizo comparando sus tiempos de retención, con los obtenidos de estandares en las mismas condiciones.

La determinación cuantitativa se obtuvo de la suma de las áreas de los - picos del cromatograma y calculando en seguida el porcentaje que corresponde a cada pico, que es proporcional a la concentración en que se encuentra el ácido graso correspondiente.

4.5 DETERMINACION DE SELENIO Y MOLIBDENO.

Considerando la importancia del selenio y del molibdeno en la nutrición - animal, de las características del terreno donde el olivo se cultiva y el porcentaje ligeramente importante de cenizas que el orujo de oliva presenta, se - procedió a cuantificar estos oligoelementos. La determinación se realizó por - medio de absorción atómica.

Fundamento:

Se basa en la absorción de energía por electrones de valencia de los áto - mos en estado basal, en una flama generalmente de aire acetileno, siendo trans - portados a dicha flama por un sistema de atomización.

El espectro resultante después de la absorción pasa a través de un mono - cromador para aislar la longitud de onda de interés, llevandose después esta - radiación a un fotodetector en donde se convierte en energía eléctrica, esta - energía se amplifica por medios electrónicos adecuados llevandose a un sistema de lectura tal que nos de una medida ya sea de la absorbancia o de la concen - tración de la muestra.

Material:

- Parrilla
- Refrigerante
- Matraz de 30 ml.
- Pipetas graduadas y volumétricas de 1,5 y 10 ml.
- Embudos
- Papel filtro Whatman No. 1
- Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 ml.
- Perlas o piedras de ebullición.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica Varian Techtron AA6
- Frascos con tapón (Nalgene).

Reactivos:

- Estándares de 1000 ppm de selenio y molibdeno (Merck)
- Acido perclórico
- Acido nítrico concentrado
- Agua desionizada

Preparación de las muestras (39):

Se hizo una digestión del material orgánico con ácido nítrico concentrado y ácido perclórico de la siguiente manera:

- (a) Se pesa 1 gr de muestra seca a analizar y se coloca en un matraz de 30 ml.
- (b) Se añaden 5 ml de HNO_3 concentrado al matraz con la muestra y se deja en reposo durante una noche.
- (c) El matraz se conecta a un refrigerante y se calienta con parrilla eléctrica a una temperatura ligeramente superior a la ebullición.
- (d) Cuando el contenido del matraz se aclare (aproximadamente 1 hr) se --- agregará por el extremo superior del refrigerante 2 ml del ácido per---clórico continuandose el reflujo por 30 minutos.

- (e) En seguida quitar el refrigerante y seguir calentando por espacio de 10 a 15 minutos más y dejar enfriar. (no digerir en seco, es peligroso).
- (f) Agregar un poco de agua desionizada y caliente con el fin de lavar las paredes del matraz y diluir un poco la muestra.
- (g) Filtrar a través de papel Whatman No. 1 eliminando así la materia insoluble en ácido con agua desionizada, el filtrado se recibe en un matraz aforado de 10 ml. y se afora.
- (h) Finalmente las muestras se agregan a frascos de plástico tapandose perfectamente, si la determinación no se realiza en seguida es recomendable guardarlos en refrigeración.

Nota: Se prepara un blanco con los reactivos, siguiendo el mismo procedimiento.

Preparación de los Estándares:

A partir de las soluciones estandar de 1000 ppm (Merck) de selenio y molibdeno, se preparan las diluciones deseadas para obtener la curva estandar de cada mineral.

Concentración de los Estándares

Elemento	ppm.			
Se	1	2	10	20
Mo	1	2	10	15

Método:

Dado que las concentraciones de selenio y molibdeno en el orujo de oliva estan por abajo del límite detectable instrumental, se recurrió al método de adición estandar, este método se basa en la adición de una cantidad conocida de material a una porción de la muestra, la diferencia de absorbancia entre ésta y la solución original proporciona la pendiente de la curva calibrada. De la curva obtenida se efectúan los cálculos correspondientes considerando las diluciones hechas , de donde se obtiene finalmente la concentración de las muestras problema.

4.6 PRUEBAS BIOLOGICAS.

Debido a estudios anteriormente realizados (31) que muestran problemas de consumo por efecto de sabor del orujo al tratar de determinar el Indice de Eficiencia Proteica (IEP), se procedió a emplear menores cantidades del producto en estudio y en forma indirecta utilizar este método en la evaluación del efecto del aceite de oliva como fuente calórica.

4.6.1 Determinación del Indice de Eficiencia Proteica (IEP) (36)

Las dietas preparadas para el estudio fueron isocalóricas e isoproteicas y se compararon con una dieta de referencia llamada control. La composición de las dietas fué como sigue:

COMPONENTE	D I E T A S			
	CONTROL, %	G - I %	G-II %	O-D %
Caseína (90% proteína)	12	12	12	1.5
Mezcla de Vitaminas (1)	2	2	2	2.0
Mezcla de Minerales (2)	4	4	4	3.0
Azúcar	10	10	10	3.5
Aceite de maíz	5	-	-	-
Almidón tapioca	63	54	42	-
Salvado	4	-	-	-
Orujo de oliva deshuesado.	-	18	30	90

(1) Vitamin Fortification Mix. Teklad Test Diets Cat. No. 40060

Formely General Bioquimicals (g.b.i.), Lanthan Drive Madison Wn. 53713

(2) Minerals Mix., Rogers - Harper Teklad Test Diets Cat. No. 170760 ARS/

Srage-Dawley Division of the Mogul Corporation, Madison Wn. 53713

En las dietas G-I y G-II la fuente calórica proporcionada por el aceite de maíz y por el almidón de tapioca, se substituyó por 18 y 30% de orujo de oliva deshuesado respectivamente, lo cual representó un 5.4 y 9.0% de aceite de oliva. En la dieta O-D la proteína fué proporcionada por el orujo de oliva, siendo ajustado al 10% con caseína.

Las dietas se conservaron en una cámara fría (9°C) durante todo el experimento.

Para este ensayo biológico se utilizaron ratas Wistar albinas, recién des-
tetadas, de 21 a 23 días de nacidas, obtenidas de la colonia del Bioterio de la
Facultad de Química de la UNAM, cuyo peso oscilaba entre 45 y 50 grs.

En cada determinación se utilizó un lote de ratas, el cual estaba inte-
grado por 3 hembras y 3 machos, seleccionados de forma tal que la suma de los
pesos entre lotes, no excediera de ± 5 grs.

Los animales fueron colocados en jaulas individuales distribuyéndose se-
gún el método de números aleatorios durante 28 días donde se les proporcionó
la dieta y agua "ad libitum". La temperatura se controló entre 22 y 25°C, la
humedad relativa fué controlada al 60% y con iluminación eléctrica durante el
día que se apagaba por las noches.

Durante todo el período del experimento, se registraron los cambios de
peso y la cantidad de dieta ingerida de cada una de las ratas cada semana, te-
niéndose al final del estudio la ganancia total de peso y el consumo total de
proteína.

El IEP se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{IEP} = \frac{\text{peso ganado por el animal}}{\text{proteína ingerida}}$$

$$\text{proteína ingerida} = \frac{(\text{total de comida ingerida}) (\% \text{ de proteína en la mezcla})}{100}$$

Corrección del IEP con caseína 2.5 (con objeto de que los resultados sean
comparables con experimentos reportados en la literatura).

$$\text{Corrección del IEP con caseína 2.5} = \frac{(\text{caseína 2.5}) (\text{IEP obtenido})}{(\text{IEP obtenido por caseína})}$$

La variabilidad con respecto al promedio de los resultados entre animales, se expresó como error estandar en cada caso y la significancia de los resultados se determinó mediante el análisis de varianza.

4.6.2 Método de Replexión

Esta prueba biológica se basa en la propiedad de las proteínas de mantener el peso de un animal (40).

Tratando de eliminar las condiciones de cambio del alimento y la mayor resistencia de los animales en estudio (ratas adultas), se propuso este método pretendiendo observar en forma indirecta, si el efecto de sabor del orujo de oliva presentaba consecuencias importantes en su consumo.

Para este ensayo biológico se utilizaron ratas Wistar albinas adultas de aproximadamente 160 gr. $\pm$ 1.0. En la determinación se utilizó un lote de 2 hembras y 2 machos.

Los animales fueron distribuidos en jaulas individuales y en la fase inicial sólo se les proporcionó agua "ad libitum" hasta la pérdida de un 20% de su peso inicial. A continuación se les alimentó con la dieta O-D (90% de orujo) y agua "ad libitum" durante 14 días, la temperatura se controló entre 22 y 25°C - con humedad relativa del 60% e iluminación durante el día (luz eléctrica) que se apagaba durante las noches. Se registraron los pesos individuales de los animales en estudio cada tercer día, así como la cantidad de dieta ingerida. Duran

te el presente estudio se alimentó un lote de ratas con la dieta control como referencia.

4.6.3. Estudio Histológico

Con objeto de localizar un posible efecto tóxico del alimento estudiado, el hígado de animales sacrificados fué estudiado conforme al método habitual de inclusión en parafina, cortándose con un microtomo de Spencer a 5-7 micras de espesor. Los cortes de hígado fueron teñidos con Carmín de Best y con Hematoxilina Eosina, se fijaron, se montaron y se observaron al microscopio óptico. Estos estudios se efectuaron en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, con la colaboración de la Dra. Reyna Sánchez.

4.7 DIGESTIBILIDAD "IN VITRO".

Con objeto de determinar la digestibilidad "in vitro" del orujo de oliva deshuesado, se siguió la modificación de Barnes al método de Tilley and Terry (41).

Fundamento:

Por medio de este método se intenta simular el desdoblamiento de algunos componentes de los carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosas, etc.) en componentes solubles mediante enzimas producidas por microorganismos del rumen bajo condiciones anaerobias y con temperatura y pH controlados. En una segunda etapa la técnica simula el desdoblamiento del material proteico por medio de pepsina, en el tracto intestinal posterior de los rumiantes.

La etapa inicial del método, comprende la incubación de la muestra con - microorganismos del rumen en un medio nutritivo tamponado. La segunda etapa comprende la incubación del residuo de la primera etapa en una solución de pepsina ácido clorhídrico. La cantidad de materia seca que desaparece está estrechamente relacionada con los valores de digestibilidad "in vivo".

Material:

- Tubos de ensaye de 100 ml. de vidrio o plástico
- Tapones de goma para los tubos mencionados, equipados con
- Válvulas busen para dejar escapar el gas.
- Papel filtro Whatman No. 541
- Fuente para producir vacío
- Manta de cielo
- Termo de boca ancha
- Potenciómetro
- Baño de incubación
- Tanque o fuente de CO_2 (matraz Erlenmeyer con hielo seco y agua, con un tapón y una salida de vidrio).
- Equipo convencional de laboratorio.

Reactivos:

- Saliva artificial de Mc-Dougall (solución buffer).

9.80 g NaHCO_3

7.00 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.57 g KCl

(65)

0.47 g NaCl

0.12 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.04 g CaCl_2

Se mezclan los primeros cinco reactivos en más o menos 500 ml. de agua destilada en un matraz volumétrico y se agitan hasta - que se disuelvan. Se ajusta el volumen y se almacena. Antes de usarse se le adiciona el cloruro de calcio, se mantiene a 39°C y se burbujea CO_2 en la solución hasta un pH de 6.8 a 7.0

- Solución de HCl 2N aproximadamente.

200 ml. de HCl concentrado, aforados a 1 litro con agua destilada.

- Solución de pepsina (Merck, DAB5) 5%.

5 g. de pepsina aforados con 100 ml. de agua destilada.

- Inóculo de líquido ruminal filtrado. Se utiliza líquido ruminal extraído de una res que tenga fístula ruminal. El líquido ruminal se colecta a media mañana, dos horas después de que haya comido el animal.

Por medio de la fístula se introduce una manguera de una pulgada de diámetro. Esta manguera se une a un tapón colocado en un matraz Kitazato cubierto con tela gruesa de color obscuro. Se succiona con bomba de vacío hasta obtener la cantidad requerida, en seguida el líquido se transporta al laboratorio- en un termo a 39°C, se burbujea CO_2 durante un minuto y se - utiliza inmediatamente. Una vez obtenido el líquido, éste se

filtra a través de ocho capas de manta de cielo. Esta metodología se realizó en las instalaciones del rancho "Pasteje", agradeciendo las atenciones al M. en C. Pablo Pérez Gavilán, --- Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

Método:

Las muestras por analizar deben estar secadas al aire con una humedad menor del 12% y cernidas por un tamiz de 1 mm. Se pesan exactamente alrededor de 0.5 g de muestra. Al tubo conteniendo 0.5 g de muestra se le adicionan 40 ml. de la solución buffer. Se deja estabilizar a 39°C. Se realiza la prueba por cu triplicado y se incluyen cuatro blancos que contengan líquido ruminal y solución buffer. Se incuban durante 48 horas rotando suavemente los tubos a las 2, 4, 20 y 28 horas después de iniciada la incubación. Todas las operaciones anteriores deben hacerse en la obscuridad.

Después de las 48 horas de incubación se remueven los tubos y se agrega 1 ml. de HCl 2N cuidando la espuma, la cual se controla con alcohol amílico. Se repite la operación agregando 4.4 ml. de HCl 2N hasta completar 7.4 ml. por tubo. Se adiciona finalmente 2 ml. de solución de pepsina al 5% por tubo, se rota y se incuban los tubos a 39°C por 48 horas, agitando a las 2, 4, 20 y 28 horas de incubación.

Al final de las 48 horas el material de los tubos se filtra a través de papel filtro Whatman No. 541 previamente secado a la estufa y tarado, se seca posteriormente el filtrado en estufa a 105°C durante una noche. El material-

que permanece en el filtro es la materia seca no digerida, la cual se determina por diferencia.

Cálculos:

Digestión de materia seca "in vitro" :

$$\text{Porcentaje} = \frac{C - (D - E)}{C} \times 100$$

Peso del papel filtro tarado A

Peso del papel filtro con el residuo B

Peso de la muestra analizada en base seca C

Materia seca residual en la muestra B - C = D

Materia seca residual en el blanco B - C = D

4.8 DETERMINACION DE LIGNINA

El método empleado es la modificación de H. Leal (42) a las técnicas de Van Soest (43) y de Deriaz (44).

Fundamento:

Una muestra desgrasada se somete a una digestión en frío con H_2SO_4 al 72% para oxidar los compuestos excepto la lignina. El residuo contiene lignina y -- además, proteínas y cenizas, éstas se determinan por los métodos correspondientes obteniendo por diferencia la lignina.

Material:

- Tubos de ensaye 10x100 mm.
- Varilla de vidrio 6x140 mm.
- Baño a 30°C
- Probeta 50 ml.
- Pipetas de 10 ml.
- Pipetas de 2 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 125 ml.
- Kitazato 1000 ml.
- Embudo Buchner 106 mm.
- Papel filtro Whatman No. 41
- Estufa
- Balanza Analítica
- Extractor Soxhlet

Reactivos:

- Acido sulfúrico, grado analítico (Baker) al 72% p/p.
- Benceno-etanol 2:1 ambos (Baker) grado analítico.

Método:

Se extrae la muestra con benceno-etanol 2:1 durante 8 horas. Se pesan 200 mg. de la muestra extraída y seca en un tubo de ensaye de 10 x 100 mm. Se agregan 2 ml. de ácido sulfúrico al 72% p/p, se mezcla y macera con una varilla de vidrio.

Se coloca en un baño a 30°C durante 1 hora. Se vierte cuantitativamente el contenido del tubo de ensaye en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. con 56 ml. de agua destilada. Se coloca el matraz en un autoclave 1 hora a 120°C. Se deja enfriar y se filtra el contenido en un papel Whatman No. 41, previamente tarado.

Se lava el filtrado muy bien con agua destilada. Se seca en una estufa a 100°C durante 8 horas, se deja enfriar en un desecador y se pesa.

Posteriormente, a una parte del residuo se le determina proteínas por Microkjeldahl y al resto del residuo se le determina cenizas.

Cálculos:

$$\% \text{ lignina cruda} = \frac{(\text{residuo} - \text{cenizas})}{\text{peso muestra original}}$$

$$\% \text{ lignina verdadera} = (\% \text{ lignina cruda}) - (\% \text{ de proteínas})$$

4.9 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS (HEXOSAS).

Dado que los carbohidratos obtenidos en el análisis proximal no resultan confiables, se decidió utilizar el método modificado por H. Leal et al. (42) a las técnicas de Klein (45) y Deriaz (44). La elección de esta técnica se fundamenta en que los azúcares componentes de la oliva son en su mayoría hexosas (30).

Fundamento:

Las hexosas presentes en la muestra reaccionan con la solución de ac. cromotrópico en ac. sulfúrico 15 M, produciendo una coloración violeta que se mide en el espectrofotómetro a 570 mμ. La reacción depende de la conversión de las hexosas a 5-hidroximetil furfural y de la ruptura del grupo metilo para dar lugar al formaldehído que reacciona con el ac. cromotrópico. Bajo estas circunstancias, las pentosas forman el furfural pero no dan lugar al formaldehído.

Material:

- Tubos de ensaye
- Pipetas volumétricas de 1 y 5 ml.
- Perilla p/pipeta
- Recipiente para baño maría
- Recipiente con hielo
- Gradilla
- Espectrofotómetro

Reactivos:

- Ac. Sulfúrico 15 M
- Ac. cromotrópico (disódico): disolver 0.5 gr de ácido en 5 ml de agua, añadir 205 ml de H_2SO_4 15 M (solución reciente no más de 72 horas).

Método:

Con objeto de remover los residuos insolubles del orujo, se pesa 1 gr. de la muestra y se añaden 30 ml de agua destilada a 40°C aproximadamente, se centrifuga 10 min. a 6000 rpm y finalmente la solución se separa.

Considerando el contenido de azúcares de la muestra y la curva patrón se realizan las diluciones correspondientes con la solución obtenida. Posteriormente en tubos de ensaye se agrega 1 ml del problema y 5 ml del ac. cromotrópico, se tapan y colocan en un baño maría por 50 min. se enfrían inmediatamente en hielo y se leen a 570 m contra un blanco con agua destilada.

V RESULTADOS Y DISCUION

5.1 ANALISIS PROXIMAL.

A continuación se presentan los resultados de este análisis en el orujo de oliva, en sus fracciones constitutivas en el material de interés para este estudio i.e. orujo deshuesado.

PRODUCTO ANALIZADO Y PORCENTAJE DEL COMPONENTE

COMPONENTE	ORUJO EN CONDICIONES INICIALES	ORUJO TRATADO	PULPA	HOLLEJO	HUESO	ORUJO DESHUESADO
Humedad	35.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Proteínas	3.69	5.23	10.48	7.81	0.64	9.83
Grasa	11.78	16.68	26.37	30.55	4.71	28.78
Cenizas	2.64	3.73	6.97	5.08	0.95	6.72
Fibra Cruda	43.15	61.07	13.68	12.77	54.67	13.78
Carbohidratos	3.74	5.29	34.01	35.78	31.03	32.89

En la separación de los componentes del orujo de oliva (pulpa, hollejo y hueso) se determinó la proporción de cada uno de ellos.

ORUJO DE OLIVA		ORUJO DESHUESADO	
	%		%
Hollejo	8.27	Hollejo	17.09
Pulpa	40.12	Pulpa	82.91
Hueso	51.61		

En los resultados obtenidos se observa que la presencia del hueso en el orujo de oliva es considerable, elevando el contenido de fibra cruda. La separación del hueso aumenta la proporción de los componentes químicos de interés como es el caso de la proteína y de la grasa.

En el orujo deshuesado la proporción del hollejo no es muy importante. Al comparar la composición química del hollejo y de la pulpa se tienen sólo - ligeras diferencias en la cantidad de grasa y proteínas.

La proporción de carbohidratos presentes en el hueso es más elevada de lo esperado.

5.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL HONGO.

El aislamiento del hongo identificado no presentó problemas, debido al dominio de crecimiento de este hongo en las cajas petri de las diluciones efectuadas.

Las características macroscópicas del hongo identificado, usando como medio Sabouroud-agar e incubados a temperatura ambiente durante 6 días son:

Forma de la coloniaredonda
Tipo y largo del miceliocompacto y corto.
Humedad de la coloniaseca.
Color de la colonia por encima
y debajo del medioverde pálido.
Cambios de coloración en el medioninguno.

Las características estructurales vegetativas y reproductoras del hongo - (en un microscopio Baush and Lomb) son las siguientes:

Presentan micelio vegetativo incoloro y tabicado. Las ramas fértiles (canidióforos) que arrancan del micelio sumergido y más o menos perpendiculares al

mismo, están reunidas en fascículos, son septadas, lisas y terminan en un verticilo de ramas en forma de pincel. La ramificación está de 2 a 3 veces certificilada, simétrica, con ramas terminales denominadas fiálides. Los conidios se producen por escisión y forman cadenas no ramificadas, son globosos, lisos y de color verde pálido.

El género identificado fué el *Penicillium* sp. por el Dr. Miguel Ulloa, Departamento de Botánica. Instituto de Biología UNAM. No fué posible determinar su especie por la cantidad existente y debido a la experiencia que se requiere para ello. Según el último estudio taxonómico del género se han encontrado 257 especies.

La fotografía del hongo aislado se presenta en la figura 3.

5.3 CARACTERIZACION DE LOS LIPIDOS PRESENTES EN EL ORUJO.

5.3.1 Propiedades Químicas.

Enseguida se presentan los resultados del análisis efectuado:

DETERMINACION QUIMICA	UNIDADES
Acidez libre	3.2% ácido oléico
Indice de peróxidos	5.2 m.e./kg de lípido
Indice de saponificación	182.07 mg KOH/g
Indice de iodo	84.34 % I_2 absorbido

Estos resultados están comprendidos dentro de los que especifica la Comisión de Codex Alimentarius. Esto indica que el aceite de orujo presenta propiedades químicas semejantes al aceite de oliva virgen de calidad comercial.

(74)

FIGURA 3



5.3.2 Identificación de Acidos Grasos

Los ácidos grasos presentes en el aceite de orujo de oliva analizado (figura 4) son los siguientes:

ACIDO GRASO	%
Palmítico (C ₁₆)	9.26
Esteárico (C ₁₈)	2.50
Oleico (C _{18:1})	71.94
Linoleico (C _{18:2})	16.30

Comparando el resultado, con los estandares reportados en el cuadro 2 de aceite de oliva virgen, la cantidad del ácido graso linoléico en el aceite de orujo existe en doble proporción. Esto nos indica, en cierto grado la menor estabilidad que presenta este aceite a la oxidación. El uso de antioxidantes -- puede resultar recomendable. En términos generales la proporción de estos ácidos grasos esta considerada dentro de los límites de composición del aceite de oliva.

5.4 DETERMINACION DE SELENIO Y MOLIBDENO.

Las concentraciones de las muestras problema obtenidas de las figuras 5 y 6 fueron las siguientes:

MUESTRA	MINERAL	mgr/100 gr DE ORUJO SECO
Orujo de oliva deshuesado	Se	0.1116
Orujo de oliva deshuesado	Mo	0.1003

(76)

FIGURA 4

Spectra-Physics

104

Columna : 20 % DEGS Chromosorb
W. AW DMCS 80/100 8' $\frac{1}{8}$ "
Material : Acero inoxidable
Temperatura : Columna 200°C
Detector 205°C
Inyector 205°C
Flujo de N₂ : 30 ml/min.

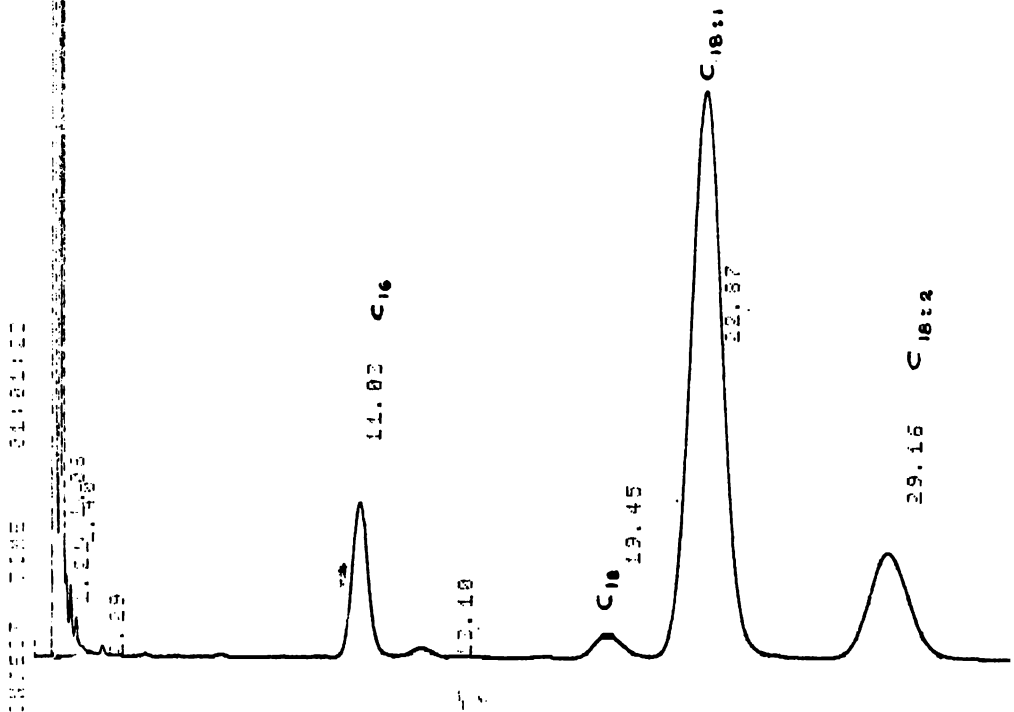
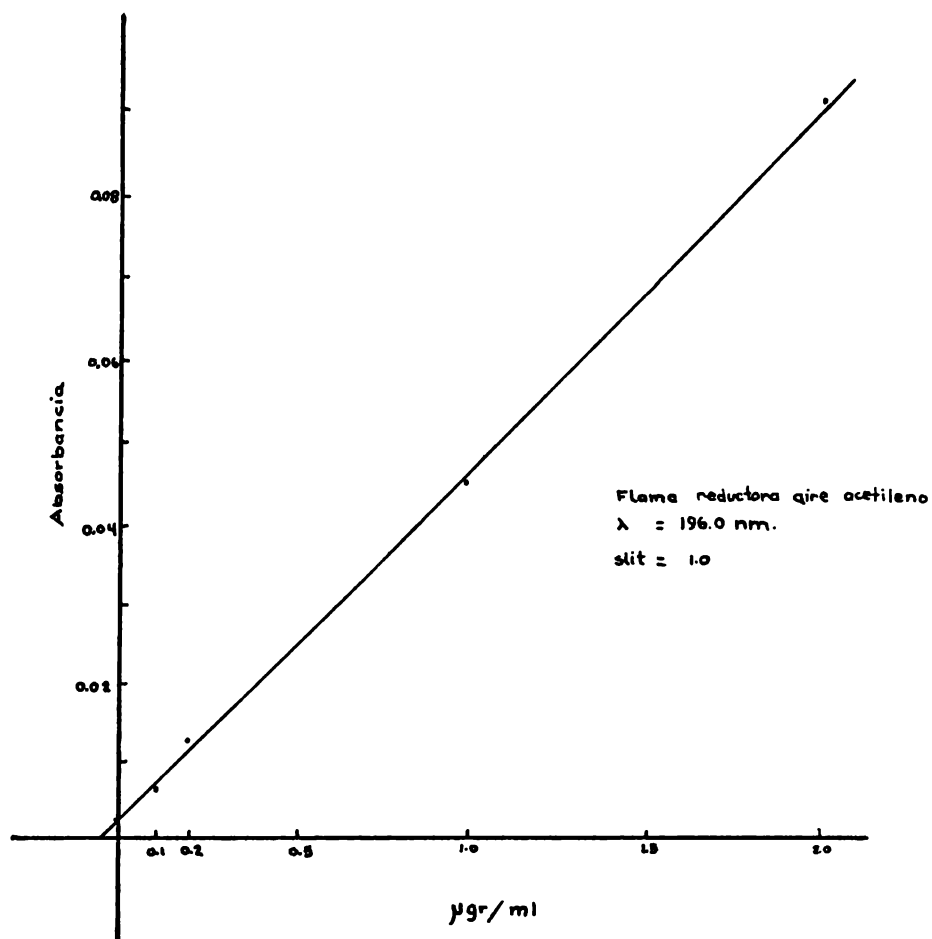


FIGURA 5

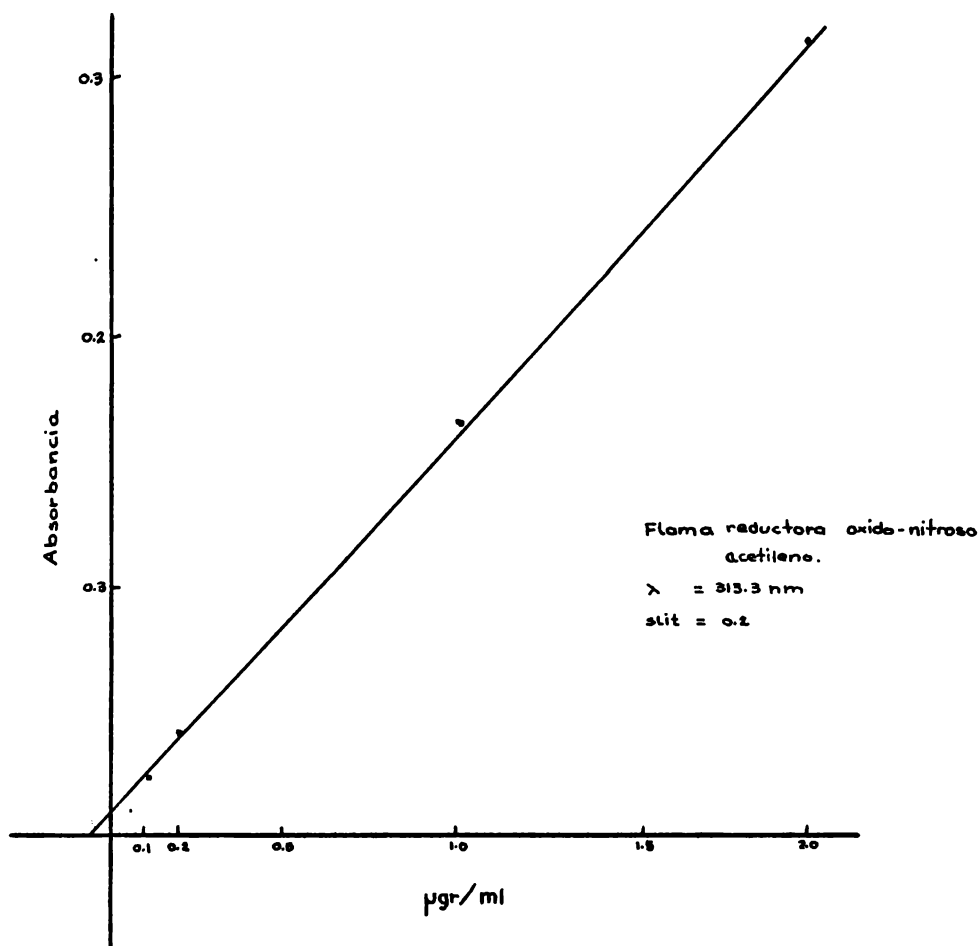
Curva de adición estandar
selenio



(78)

FIGURA 6

Curva de adición estandar
molibdeno





(79)

Considerando el uso que se daría al orujo de oliva deshuesado en la proporción del 15% en los concentrados para alimentación animal, la contribución de este en Se y Mo en la dieta total no sobrepasaría los requerimientos reportados en el cuadro 3, pudiéndose afirmar que la muestra analizada no presenta riesgos tóxicos por estos minerales.

5.5 PRUEBAS BIOLOGICAS

5.5.1 Determinación del Índice de Eficiencia Proteica (I.E.P.)

Los resultados se proporcionan a continuación:

LOTE	I.E.P. ⁺	HEMBRAS	MACHOS	TOTAL
control		$2.59 \pm 0.2^{++}$	$2.73 \pm 0.135^{++}$	$2.65 \pm 0.17^{++}$
G-I		2.19 ± 0.12	2.34 ± 0.325	2.25 ± 0.25
G-II		2.42 ± 0.18	2.46 ± 0.11	2.44 ± 0.15
O-D		---	---	---

+ I.E.P. corregido con caseína 2.5

++ error estandar

Nota: Los animales del lote O-D murieron durante el estudio.

El error estandar obtenido de los promedios de I.E.P. en cada lote, estan considerados dentro de los límites permitidos.

Los resultados de I.E.P. se sometieron a un análisis de varianza, encontrándose que no existe diferencia significativa a ningún nivel entre dietas. Estos cálculos se indican en el anexo 1.

Los resultados anteriores nos confirman el buen aprovechamiento del aceite de orujo y la posibilidad de sustituir los porcentajes de 18 y 30% de orujo de oliva en estas dietas, como fuente calórica sin riesgos. Se observó que el efecto de palatabilidad afectó ligeramente los resultados de consumo de las dietas G-I y G-II con respecto a la dieta control (cuadro 17). Los animales en estudio no presentaron problemas de toxicidad evidente al final del experimento, esto, por la apariencia general de las ratas y por no presentar diferencia en el valor de I.E.P. entre las dietas en estudio y la de control. Durante el estudio la apariencia del excremento fué normal.

En el lote O-D (90% de orujo de oliva) los animales murieron entre el intervalo de 4 a 6 días de iniciado el experimento, con un consumo total individual muy por debajo de la dieta control y de lo que realmente consumo una ratade su peso, con una pérdida entre 30 y 40% del peso inicial. La necropsia practicada en estos animales indicó ausencia de capa lipídica y anemia, el hígado pareció aparentemente normal, presentando ausencia de toxicidad, por lo menos a ese nivel de consumo antes reportado.

Experimentos similares realizados con pasta de almendras de oliva, Samir Miladi et al. en 1974 (31) indican la existencia de una toxina o, con mayor probabilidad, un producto que le resta notablemente la palatabilidad al producto y que necesariamente se encuentra en el orujo.

Los resultados anteriores indican que el efecto del sabor junto con el contraste de cambio del alimento después del destete, repercuten fuertemente en el rechazo de las dietas con una subsecuente muerte por inanición, para el caso

de dietas con porcentajes muy altos de orujo.

5.5.2 Método de Replexión.

Durante el experimento los animales presentaron disminución del peso con respecto al inicial, de las 4 ratas utilizadas, murió únicamente un macho y -- efectuados los estudios de necropsia e histológico se determinó que la muerte -- fué por neumonía fibrino-purulenta causada por agente bacteriano y en consecuen -- cia por un afecto ajeno a la dieta. Así mismo, el consumo de la dieta O-D (90 % de orujo de oliva) fué muy bajo. Se observó que aún cuando el consumo no fué el esperado, la aceptación del producto en el transcurso del experimento presentó un ligero aumento en relación a los resultados de I.E.P. con ratas jóvenes.

5.5.3 Estudio Histológico.

Finalmente con el fin de detectar un posible efecto tóxico del orujo de -- oliva consumido a lo largo de 14 días, se sacrificó una de las 3 ratas por as -- fixia con éter, realizándose la necropsia y el estudio histológico correspon -- diente. El resultado no mostró ninguna alteración en órganos y tejidos, indi -- candonos la ausencia de toxicidad por el orujo de oliva en las cantidades em -- pleadas en este estudio.

La dieta aplicada con tan alto contenido de orujo de oliva (90 %) dis -- gusta a las ratas, por lo tanto los efectos observados son por inanición y no por una posible toxicidad del alimento..

CUADRO 17

LOTE	ALIMENTO TOTAL		INCREMENTO TOTAL		EFICIENCIA = n^{+++}		I.E.P.	
	CONSUMIDO G.		DE PESO G.					
	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS
control	271.47	310.67	77.17	93.67	0.2843	0.3015	2.59	2.73
G - I	221.26	199.00	69.00	68.00	0.3118	0.3417	2.19 ⁺	2.34 ⁺
G - II	165.37	194.53	52.67	63.00	0.2185	0.3238	2.42 ⁺	2.46 ⁺
O - D ⁺⁺	---	---	---	---	---	---	---	---

+ I.E.P. corregido con caseína 2.5

++ Los animales del lote O - D murieron durante el estudio.

+++ $n = \frac{\text{Incremento total}}{\text{Alimento Consumido}}$

5.6 DIGESTIBILIDAD "IN VITRO"

De los resultados obtenidos, se proporciona el promedio:

MUESTRA	% DIGESTIBILIDAD <u>"IN VITRO"</u>
Orujo de oliva deshuesado	28.5

En esta determinación se emplearon muestras como referencia.

MUESTRA	% DIGESTIBILIDAD <u>"IN VITRO"</u>
soya	89.4
alfalfa	70.7
avena	54.75

Para esta determinación se utilizó también el método de Mellenberger (46), sin embargo los resultados de digestibilidad fueron eliminados por considerarse imprecisos.

El resultado obtenido para el orujo de oliva deshuesado es considerablemente bajo, este valor es similar al reportado por B. Maynone y A. Carusi, (1932-1934)(cuadro 7). Esto nos indica que en el análisis proximal las cantidades de fibra cruda y carbohidratos obtenidos no resultan confiables, siendo en realidad más ricos en sustancias indigestibles.

5.7 DETERMINACION DE LIGNINA.

Efectuados los cálculos correspondientes, el porcentaje de Lignina presente en el orujo en base seca es:

$$\% \text{ Lignina cruda} = 26.17$$

$$\% \text{ Lignina verdadera} = 21.89$$

La cantidad de Lignina determinada en la muestra es elevada comparada con el contenido de algunos forrajes.

En la determinación se observó que una cantidad importante, aproximadamente el 50% de las proteínas del orujo de oliva se determinaban en el residuo de Lignina cruda.

5.8. DETERMINACION DE AZUCARES.

Haciendo uso de la curva patrón (figura 7) y de los cálculos correspondientes por las diluciones efectuadas, el contenido de azúcares (hexosas) solubles en el orujo de oliva es el siguiente:

(84)

MUESTRA	%AZUCARES SOLUBLES (base seca)
orujo de oliva deshuesado	1.47

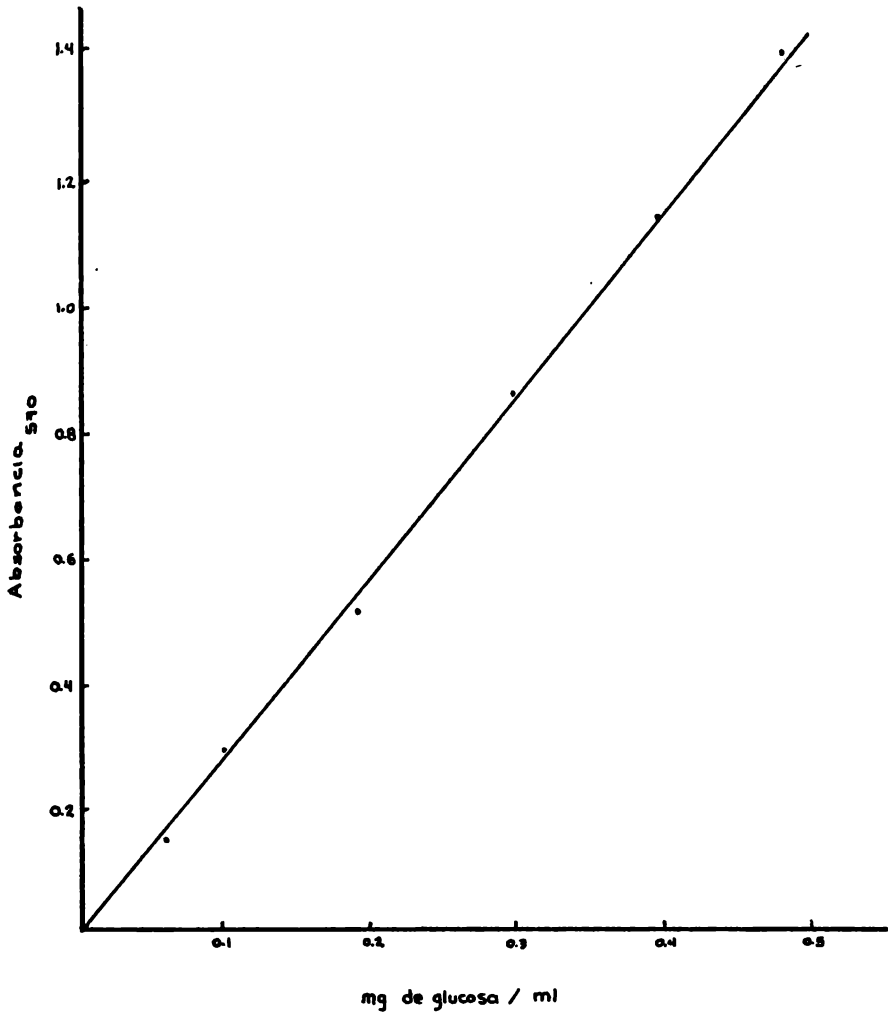
;

;

!

FIGURA 7

Curva patrón



VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Durante la separación de los fragmentos del hueso presentes en el orujo de oliva, la composición original de la grasa, las proteínas y demás constituyentes se ven aumentados notablemente.

El método de ventilación, empleado en la separación del hueso, presenta facilidad de procesamiento con la ventaja adicional en que conjuntamente se seca el producto.

La disminución de la humedad hasta 8% logra dar solución al problema del crecimiento de microorganismos fundamentalmente hongos del tipo *Penicillium*. Así también se observa que el producto presenta ligera mejoría con respecto a la oxidación de los ácidos grasos constituyentes.

Por lo anterior se sugiere que el orujo de oliva empleado sea procesado enseguida de ser obtenido como subproducto de las aceiteras.

Según la Norma Internacional del Codex Alimentarius, el aceite de orujo se encuentra dentro de los límites especificados de composición y calidad de los aceites de oliva.

De acuerdo a las pruebas efectuadas el orujo de oliva no presenta efectos tóxicos ni problemas serios de palatabilidad en animales de laboratorio (ratas), en los porcentajes de 18 y 30% en la dieta. Se verificó en este

estudio el aprovechamiento del aceite del orujo como fuente calórica.

El gran contenido de lignina presente en el producto y a la íntima asociación que presenta con la celulosa y la hemicelulosa, disminuye notablemente el aprovechamiento de estos polisacáridos.

No fue posible evaluar la calidad de las proteínas del orujo por el método I.E.P.; sin embargo, con respecto a su aprovechamiento, se determinó que en la lignina cruda existe una cantidad importante de proteínas.

Según Narasaki y Katakura, 1954 (27), dado el bajo contenido de proteínas (1-2%) en la pulpa, durante el desarrollo y maduración del fruto, las proteínas existentes en el mismo, más que elementos acumulativos, son componentes constitutivos posiblemente de naturaleza compleja y asociados a otros compuestos.

J. Fernández Díez en 1959 (47) en un estudio de extracción por solventes de las proteínas del orujo de oliva, reporta que el tratamiento con NaOH 1N en caliente permite obtener un extracto que contiene la mayor proporción del nitrógeno (80%).

En consecuencia con lo anterior, esto indica que en el orujo existe proteína asociada con la lignina, lo que explica en parte el bajo aprovechamiento de estas proteínas y en especial las provenientes de la pulpa y del hollejo, dado que las proteínas de la almendra presentan alta digestibilidad.

La digestibilidad del orujo deshuesado determinada "in vitro" en este estudio, indica gran cantidad de material indigestible en el orujo, esto probablemente representa sólo la digestibilidad del aceite presente en el orujo.

La información recopilada muestra el interés que ha existido en el aprovechamiento de los subproductos de la oliva y en especial en la utilización del orujo como alimento animal. Sin embargo, la composición que se reporta de fibra cruda se contrapone a la digestibilidad verdadera del orujo. Estos valores ilógicos seguramente son debidos a los errores de la metodología empleada, de tal forma que la cantidad de fibra determinada es menor a la real y este error se suma al contenido del extracto libre de nitrógeno determinable por diferencia. Por ello deben emplearse métodos que eviten estos errores y que actualmente son ampliamente utilizados en nutrición animal. Por otro lado, en todos los ensayos reportados en la literatura se observa que el orujo es utilizado como fuente nutritiva en base a su composición química proximal, lo que origina deficiencias en los animales al final de los experimentos y errores en las conclusiones.

Debido a la baja digestibilidad presentada por el orujo de oliva, por su alto contenido de lignina y por el alto valor energético y de digestibilidad que los lípidos del orujo presentan, se sugiere emplear el orujo de oliva deshuesado sólo como un sustituto de fuente grasa en los concentrados destinados a la alimentación de ganado vacuno, no debiendo sobrepasar del 15% de orujo en la mezcla nutritiva, para evitar hacerla muy voluminosa y disminuir la

apetencia en los animales.

El valor comercial que puede presentar el orujo de oliva, primordialmente se debe al contenido de aceite.

Empleando el orujo en un máximo de 15% en la dieta total en la ali-mentación de ganado, las proporciones de selenio y molibdeno no sobrepasan los límites en los que causarían efectos tóxicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que si se cumplió con el objetivo planteado, justificando la utilización del orujo de oliva como sustituto en las mezclas nutritivas de la ali-mentación animal. Así también se proporciona en él, información acerca de las características de otros productos de la oliva y su posible aprovechamiento.

Tratando de complementar este estudio, a continuación se presentan las siguientes recomendaciones:

- a) Que se realice un estudio de secado por fluidización del orujo de oliva para las necesidades de producción de la región olivarera señalada de acuerdo con los requerimientos enmarcados en este trabajo.
- b) Con objeto de conservar el orujo de oliva deshuesado, se sugiere efectuar un estudio en particular con el antioxidante TBHQ (terbutilhidroquinona), determinando la etapa de proceso de secado donde se debe agregar, así como

la forma de aplicación.

- c) Verificar el resultado de digestibilidad "in vitro" por el correspondiente método "in vivo", para obtener la digestibilidad verdadera del orujo de oliva.
- d) Con el objeto de utilizar el orujo de oliva en la alimentación animal, se recomienda experimentar con ganado fórmulas de concentrados, que incluyan orujo como fuente de grasa tanto para el ganado lechero como el destinado a producción de carne.
- e) Procurar sustituir la semilla de algodón, actualmente empleada como fuente de grasa en la preparación de concentrados, por el orujo de oliva deshuesado en Baja California Norte.
- f) Por otro lado, aunque son pequeñas las cantidades de almendra de oliva que se desperdician, resultaría interesante efectuar un estudio de este producto como posible fuente de alimento animal, debido a que presenta un alto contenido en proteínas y grasa, junto con una digestibilidad aceptable.

ANEXO 1

ANALISIS DE VARIANZA

IEP/SEXO	CASEINA	G - I	G - II	
H	2.36	2.1	2.40	6.86
H	2.76	2.13	2.24	7.13
H	2.66	2.34	2.61	7.61
M	2.70	2.72	2.36	7.78
M	2.88	-	2.59	5.47
M	2.61	1.97	2.42	7.0
	15.97	11.26	14.62	11.85

G - I = 18% de orujo de oliva.

G - II = 30% de orujo de oliva.

Fuente de Varianza	GL	SC	MC	F _c	F _t (1%)
- Dietas	2	1.962	0.981	2.595	7.56
- Ratas	5	1.03	0.205	0.542	5.64
- Error	10	3.784	0.378		--
- Total	17	6.776	--		--

GL = Grados de Libertad

SC = Suma de Cuadrados

MC = Media de Cuadrados

F_c = Razón de Varianza Calculada

F_t = Razón de Varianza Teórica.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Olivicultura Moderna. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo de la Agricultura. Córdoba, España, 1976.
- 2.- Econotécnia Agrícola. Consumos Aparentes de Productos Agrícolas, SARH, SAO, DGEA, Vol. III Núm 9, Septiembre 1949.
- 3.- Garrido Márquez, F., et al. Nuevo Aprovechamiento de Fabricación de Aceite de Oliva y Aprovechamiento Integral de todos los Componentes del Fruto del Olivo. Patente Española Núm. 206, Mayo 1975.
- 4.- La Eleotécnia Rural. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma 1956.
- 5.- Morris, B. Jacobs. The Chemistry and Technology of Food and Food Products. Vol. III. Interscience Publishers Inc., New York, 1961.
- 6.- Cruess, W.V. Commercial Fruit and Vegetable Products. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, 1948.
- 7.- Martínez Salazar Jorge. Aceite de Olivo. Tesis. E.N.A. Chapingo, 1956.
- 8.- Loussert, R. y G. Brousse. El Olivo. Ed. Multiprensa. Madrid, España, 1980.
- 9.- Gurr, M.I. y James, A.J. Lipid Biochemistry: An Introduction. Third Edition. London, 1980.
- 10.- Karel, M., K. Schaich y R.B. Roy, 1975. Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and aminoacids. J. Agric Food Chem., 23(2): 159.

- 11.- Andia, A.M. y J. Street, 1975. Dietary Introduction of Hepatic Microsomal Enzymes by Thermally Oxidized Fats. J. Agric. Food Chem., 23(2):173.
- 12.- Federal Register. Additive Regulation Section 121.1244, December 10, 1976.
- 13.- Sherwin, E.R. y Thompson, J.W., 1967. Tertiary-Butylhydroquinone an Antioxidant for Fats and Oils and Fat-Containing Foods. Food Tech., 21(6): 106.
- 14.- Sherwin, E.R. y Luckadoo, B.M., 1969. Studies on Antioxidant Treatment of Crude Vegetable Oils. Food Tech., 47(1):19.
- 15.- Schultz, H.W. y Day, E.A. Lipids and their Oxidation. AVI Publ. Co., Westport, Conn. 1962.
- 16.- Kirk, R.E., 1957. Encyclopedia of Chemical Technology. Interscience Publ., Inc. New York (Antioxidants) p. 77.
- 17.- Davis, R., G.G. Birch y K.J. Parker. Intermediate Moisture Foods. Appl. Sci. Publ., LTD, London. Chapter 9, 1976.
- 18.- Labuza, T.P., S.R. Tannenbaum y M. Karel, 1970. Water Contents and Stability of Low Moisture and Intermediate Moisture Food. Food Tech., 24:543.
- 19.- McDonald, P. Nutrition Animal. Ed. Acribia. Zaragoza, España, 1975.
- 20.- Barnes, R.F., et al. 1964. Comparison of in vitro Rumen Fermentation Method. J. Anim. Sci., 23:1061.
- 21.- Church, D.C. Fisiología Digestiva y Nutrición de los Rumiantes, Vol. 1 Fisiología Digestiva. Ed. Acribia. Zaragoza, España, 1974.

- 22.- Berger, Hans. Elementos de Nutrición Animal. Ed. Acribia. Zaragoza, España, 1970.
- 23.- de Alba, Jorge. Alimentación de Ganado en América Latina. 2a. Ed., 1974.
- 24.- Cramton, E.W. Nutrición Animal Aplicada. Ed. Acribia. Zaragoza, España, 1961.
- 25.- Underwood, E.J. Los Minerales en la Alimentación de Ganado. Ed. Acribia. Zaragoza, España, 1969.
- 26.- Maynard, Leonard A. Nutrición Animal. Ed. Hispano-Americana, México, 1975.
- 27.- Huesa, J. y Ramos F., 1969. Aplicaciones del Orujillo de Aceituna. Grasas y Aceites, 20:189.
- 28.- Maymone, S., A. Battaglini y M. Tiberio, 1962. Ricerche sul Valore Nutritivo della Sansa di Olive. Inform. Oléic. Internacionales 1962, Núm. 17, 65.
- 29.- Pais de Azevedo, J., 1966. A Farinha de Bagaco de Azeitona na Alimentacao do Gado. Junta Nacional de Azeite, 11, Núm. 43-44, 38.
- 30.- Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Ministerio de Agricultura. Ed. Agrícola Española, S.A. Córdoba, España, 1974.
- 31.- Miladi, S. y D.M. Hegsted, 1974. Olive Kernels as a Source of Protein. Nutrition Reports International (9):117.
- 32.- Compañía Exportadora Española, S.A. Fertilizer from Extracted Olive Residues. Patente Española Núm. 208.152, 1954.

- 33.- Anuario Estadístico de la Población y Producción Pecuaria de los Estados Unidos Mexicanos. SARH-DGEA, 1977.
- 34.- Ortega, J.A. y F. Ramos, 1978. II Máquinas Separadoras de las Fracciones Pulpa-Hueso. Grasas y Aceites, (29):147.
- 35.- Gomez, T. et al., 1981. Waste Olive Husk as Raw Material for Fodder Production Experimental Contribution. Grasas y Aceites (32):25.
- 36.- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Eleventh Ed., 1970.
- 37.- Ulloa, M. y Hanlin, R. Atlas de Micología Básica, Ed. Concepto, S.A. México, 1978.
- 38.- Gilman, J. A Manual of Soil Fungi. Ed. Iowa State University, Press. 2nd. Edition, E.U.A., 1957.
- 39.- Pinta, M., et al. Spectrometric d'Absorption Atomique, Vol. 2: Application a L'analyse Chimique, 1981.
- 40.- C. de Angelis, Rebeca. Encontro. Tecnico Cientifico de Alimentação. ABIA, 1980.
- 41.- Tilley, J.M. y R.A. Terry, 1963. A Two Stage Technique for the in vitro Digestion of Forage Crops. J. Brit. Grass Soc., Vol. 28, 104.
- 42.- Leal Lara, H. Comunicación personal. Departamento de Alimentos, D.E.Pg. Facultad de Química, UNAM.
- 43.- Van Soest, Peter J., 1963. Use of Detergents in Analysis of Fibrous Feeds. I. Preparation of Fiber Residues of Low Nitrogen Content. J. of the AOAC, (46):825.

- 44.- Deriaz, R.E., 1961. Routine Analysis of Carbohydrates and Lignina in Herbage. J. Sci. Food Agric., 12(2):152.
- 45.- Klein, B. Weismann, 1953. New Color Reagent for Determination of Hexoses: Determination of Glucose in Blood Serum. Analytical Chemistry, 25(5):771.
- 46.- Mellenberger, R.W., 1970. An in vitro Technique for Estimating Digestibility of Treated and Untreated Wood. J. Anim. Sci., 30:1005.
- 47.- Fernández Díez, M.J., 1959. Sobre el Posible Aprovechamiento de las Proteínas del Orujo de Aceitunas. I. Grasas y Aceites (9):163.