

Optimización de la Biodegradación de Azúcares Reductores en Efluentes de la Industria Olivícola para contribuir a la Revalorización de Polifenoles Antioxidantes

Optimization of Reducing Sugars Biodegradation in Olive Industry Effluents to contribute to the Valorization of Antioxidant Polyphenols

Presentación: 13 y 14 de septiembre de 2023

Joaquín Revol Medrano

Centro de Investigación y Tecnología Química (CITeQ), CONICET-UTN, Facultad Regional Córdoba, Universidad Tecnológica Nacional
joaquinrevolmedrano@gmail.com

Diana Ondina Labuckas

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad Nacional de Córdoba. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal
dilabuckas@unc.edu.ar

Silvia Nazaret Mendieta

Centro de Investigación y Tecnología Química (CITeQ), CONICET-UTN, Facultad Regional Córdoba, Universidad Tecnológica Nacional
smendieta@frc.utn.edu.ar

Mónica Elsie Crivello

Centro de Investigación y Tecnología Química (CITeQ), CONICET-UTN, Facultad Regional Córdoba, Universidad Tecnológica Nacional
mcrivello@frc.utn.edu.ar

Dolores María Eugenia Álvarez

Centro de Investigación y Tecnología Química (CITeQ), CONICET-UTN, Facultad Regional Córdoba, Universidad Tecnológica Nacional
dalvarez@frc.utn.edu.ar

Mariela Maldonado

Departamento de Ingeniería Química, Facultad Regional Mendoza, Universidad Tecnológica Nacional
marielabeatrizmaldonadolezaun@gmail.com

Resumen

Se propone una alternativa para la degradación de azúcares reductores presentes en efluentes de la elaboración de aceitunas, mediante el empleo de microorganismos. Dichos azúcares interfieren en ensayos de cuantificación de polifenoles, compuestos que se desea recuperar, a los fines de la revalorización de los subproductos olivícolas. Se evaluaron dos cultivos, uno con microorganismos endógenos a los efluentes (A-SMeN) y otro con microorganismos endógenos y bacterias lácticas inoculadas (B-CMeN). Los resultados mostraron que ambos cultivos lograron una reducción significativa de azúcares reductores, con porcentajes de 78% y 81%, respectivamente. En el ensayo conteniendo el cultivo B-CMeN los compuestos fenólicos a recuperar fueron degradados solamente en un 24%. Si el objetivo es contribuir a la revalorización de compuestos fenólicos, es recomendable trabajar con la adición de microorganismos, además de los endógenos a los efluentes, para aprovechar el remanente de fenólicos después de la biodegradación de azúcares, y poder reutilizarlos como antioxidantes.

Palabras clave: Olivo, Polifenoles, Antioxidantes, Azúcares Reductores, Microorganismos Endógenos, Tratamiento de Efluentes

Abstract

An alternative is presented for the degradation of reducing sugars present in effluents from olive processing through the use of microorganisms. These sugars interfere with the quantification assays of polyphenols, compounds that are desired to be recovered for the valorization of olive byproducts. Two cultures were evaluated, one with endogenous microorganisms in the effluents (A-SMeN) and another with endogenous microorganisms and inoculated lactic acid bacteria (B-CMeN). The results showed that both cultures achieved a significant reduction in reducing sugars, with percentages of 78% and 81%, respectively. In the assay containing the B-CMeN culture, the phenolic compounds to be recovered were degraded only by 24%. If the aim is to contribute to the valorization of phenolic compounds, it is recommended to work with the addition of microorganisms, in addition to those endogenous to the effluents, to utilize the remaining phenolics after the destruction of sugars, and be able to reuse them as antioxidants.

Key words: Olive, Polyphenols, Antioxidants, Reducing Sugars, Endogenous Microorganisms, Effluent Treatment

Introducción

El olivo, *Olea europaea* L., pertenece a la familia botánica *Oleaceae*, con especies distribuidas en las regiones tropicales y templadas del mundo. El género *Olea* comprende a unas treinta y cinco especies, siendo *O. europaea* L. la única de la familia con fruto comestible (Rapoport H.F, 1999). Dicho fruto es empleado para la producción de aceitunas de mesa y aceite de oliva.

Actualmente existen diversos métodos para el procesamiento de las aceitunas de mesa. El estilo de producción español o sevillano es el más difundido, representando el 50% de la producción mundial. (Abdelkafi et al., 2013). A partir de este proceso el amargor de los frutos es removido mediante su inmersión en soluciones de hidróxido de sodio (NaOH) de concentración variable, durante 8 - 15 h (Fernández et al., 2018). En esta instancia, conocida como “quemado”, tiene lugar la hidrólisis de la oleuropeína con la formación simultánea de glucósido de ácido elenólico e hidroxitirosol. Posteriormente, las aceitunas son lavadas con grandes cantidades de agua para remover el NaOH presente en la pulpa. El método más utilizado para esta etapa es el enjuague. Este se lleva a cabo en tiempos y modalidades variables, de acuerdo a las particularidades de cada proceso. Después del lavado, las aceitunas procesadas se transfieren a tanques con solución acuosa de NaCl de concentraciones de entre 9 - 10% p/v,

donde tiene lugar una fermentación espontánea, a expensas de la microflora proveniente de los frutos (Fernández et al., 2018).

La industria olivícola se caracteriza por generar grandes cantidades de desechos, que son potenciales contaminantes para suelo y agua. Los volúmenes de las aguas residuales provenientes del quemado, lavado y fermentación de las aceitunas pueden alcanzar valores de 0,5; 2 y 0,7 litros de efluente por kg de aceitunas producidas (Kopsidas et al., 1992). Estas aguas poseen una alta carga contaminante debido a su elevado contenido de sustancias orgánicas, tales como azúcares, polifenoles, polialcoholes, pectinas, lípidos y considerable cantidad de minerales (Demerche et al., 2013; Dhouib et al., 2006). Entre los compuestos presentes, los polifenoles son los mayores contribuyentes a su toxicidad, representando un gran problema medioambiental, debido a su carácter fitotóxico y antibacteriano, lo cual limita sus posibilidades de degradación (Galanakis et al., 2013). No obstante, estudios realizados destacaron su alto poder antioxidante, despertando así el mayor interés por parte de las industrias cosméticas, farmacéuticas y alimenticias (Cádiz-Gurea et al., 2021).

Sin embargo, a la hora de analizar estas sustancias durante el estudio de una estrategia para su posterior revalorización, se detectaron interferencias por la presencia de azúcares reductores remanentes de la fermentación de las aceitunas. En el actual trabajo se propone una alternativa para la degradación de dichos azúcares, mediante el empleo de microorganismos endógenos presentes en los efluentes. Esta metodología fue empleada por otros autores, en trabajos anteriores (Affranchino et al., 2022; Boscarriol et al., 2022).

Desarrollo

Se prepararon dos cultivos (A - SMeN y B - CMeN), por duplicado y como experimentos independientes, en matraces Erlenmeyer de 5 L (4 en total).

Ambos cultivos se acondicionaron añadiendo efluentes provenientes del quemado (Q) y lavado (L) de aceitunas en una relación Q:L (1:1). Las muestras fueron provistas por una industria elaboradora de aceitunas de la ciudad de Cruz del Eje, Córdoba, Argentina.

El cultivo A - SMeN contenía únicamente microorganismos endógenos, principalmente coliformes y bacterias lácticas, remanentes del proceso de fermentación. El cultivo B - CMeN, en tanto, fue adicionalmente inoculado con 10 mL de salmuera de aceitunas con una carga de fue 10⁹ UFC/mL de bacterias lácticas. Con el objeto de estimular el crecimiento bacteriano, en ambos matraces se añadió fosfato monopotásico, cloruro de amonio, citrato de sodio, sulfato de magnesio y fertilizante granulado TRIPLE 15©; en concentraciones respectivas de 2; 0,5; 1,1 y 1 g/L. Los mismos se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y agitación (30 °C y 130 rpm) durante 16 días. El vortex generado por la agitación aseguró la aireación de los ensayos mediante la incorporación del oxígeno presente en el aire. De cada cultivo se extrajeron alícuotas a distintos tiempos (t₀ = 0 días t₁ = 4 días, t_f =16 días) a fin de realizarles determinaciones físico-químicas. En algunas oportunidades, luego de realizar la extracción, fue necesario el agregado de agua destilada para completar el volumen debido a la evaporación producida.

La determinación de los compuestos fenólicos totales se realizó con el reactivo Folin-Ciocalteu (FCC), mediante lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 720 nm y calibración con ácido gálico (Becker et al., 2022). Se empleó un espectrofotómetro "Metrolab" 330 UV Visible. Se extrajeron 0,1 mL de muestra, y esta se la diluyó en agua destilada (18:1). De esa mezcla se extrajeron 0,1 mL y se añadieron 0,9 mL de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 2,5 mL de una solución de carbonato de calcio (CaCO₃) al 20 % p/v y 0,5 mL de FCC (1:1). Se agitó vigorosamente y se dejó reposar en oscuridad durante 40 minutos antes de realizar la lectura correspondiente. Los resultados se expresan como Equivalente a Ácido Gálico (EAG) (mg/L) y los valores como promedio con desvío estándar de las mediciones realizadas por duplicado.

La determinación de azúcares reductores se realizó empleando la técnica de Miller (Ávila Núñez et al., 2012), con una solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) al 1% p/v, mediante

calibración con glucosa y lectura espectrofotométrica a 540 nm. La solución de DNS empleada se preparó en un matraz aforado de 100 mL. Se añadió 1 g de DNS y 20 mL de hidróxido de sodio 2 N. Se agitó y se dejó en reposo 1 día para garantizar total disolución. Posteriormente, se agregaron 30 g de tartrato de sodio y potasio y se llevó a volumen con agua destilada. La técnica de Miller consistió en mezclar 0,5 mL de muestra, convenientemente diluida en una relación de 3:1, con 0,5 mL de solución DNS. A continuación, las soluciones se colocaron en un baño de agua a temperatura de ebullición, por 5 min. Luego se enfriaron en hielo y se añadieron 5 mL de agua destilada. Finalmente se dejaron reposar durante 15 min, previo a realizar las mediciones. Los resultados se expresan como Equivalente a Glucosa (EG) (mg/L) y los valores como promedio con desvío estándar de las mediciones realizadas por duplicado.

El pH se valoró empleando electrodo de pH, previamente calibrado a dos puntos (pH 7 y 10).

A continuación, se exponen los resultados de las mediciones realizadas.

Tiempos	A-SMeN (mol/L)	Reducción (%)	B-CMeN (mol/L)	Reducción (%)
t ₀	3,09 (± 0.3)	-	4,01 (± 0.2)	-
t ₁	1,75 (± 0.3)	43%	2,93 (± 0.2)	27%
t _f	0,67 (± 0.3)	78%	0,78 (± 0.2)	81%

Tabla 1 – Concentración de azúcares reductores en los cultivos A-SMeX y B-CMeX en función del tiempo (t) del ensayo.

Tiempos	A-SMeN (mol/L)	Reducción (%)	B-CMeN (mol/L)	Reducción (%)
t ₀	0,73 (± 0.01)	-	0,75 (± 0.02)	-
T ₁	0,62 (± 0.01)	15%	0,65 (± 0.02)	13%
t _f	0,47 (± 0.01)	36%	0,57 (± 0.02)	24%

Tabla 2 – Concentración de compuestos fenólicos totales en los cultivos A-SMeX y B-CMeX en función del tiempo (t) del ensayo.

Tiempos	A-SMeN	B-CMeN
t ₀	8,89 (± 0.01)	8,91 (± 0.01)
t ₁	8,17 (± 0.68)	8,79 (± 0.68)
t _f	9,14 (± 0.01)	8,99 (± 0.01)

Tabla 3 – Valores de pH obtenidos en los tratamientos A-SMeX y B-CMeX, en función del tiempo de ensayo.

En la Tabla 1 se observa que tanto en el cultivo A-SMeN como en B-CMeN se lograron porcentajes similares de degradación de azúcares reductores, alcanzando un 78% y un 81%, respectivamente. Sin embargo, el cultivo A-SMeN muestra una ventaja en términos de tiempo, ya que a los 4 días experimentó una disminución del 43% en azúcares reductores, en comparación con el 27% obtenido en el cultivo B.

Por otro lado, en la Tabla 2, se observa que la menor reducción de compuestos fenólicos totales, con un 24%, se logró en los ensayos con microorganismos añadidos (B-SMeN), además de los endógenos provenientes de los efluentes.

Conclusiones

Mediante el presente trabajo se propone una alternativa para la degradación de los azúcares reductores que interfieren en la determinación de los compuestos fenólicos, tendientes a revalorizar como antioxidantes.

Para esto se emplearon microorganismos endógenos a la salmuera y también bacterias lácticas agregadas. Se determinó que la mayor biodegradabilidad de dichos azúcares y la menor reducción de compuestos fenólicos fueron logradas agregando microorganismos endógenos y bacterias lácticas, conjuntamente. A su vez, no se observó modificaciones significativas en relación al pH, en cada uno de los ensayos realizados.

Referencias

Abdelkafi S., Bouaziz M., Chamkha M., Fendri S., Labat M. y Sayadi S. (2013). "Olive fermentation brine: biotechnological potentialities and valorization", *Environmental Technology*, 34, 181-193. Disponible en: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593330.2012.689364>>

Affranchino G., Baigori M. y Maldonado M. (2022). "Biodegradation of organic compounds and decrease in electrical conductivity by native consortium in effluents from the olive industry", *International Journal of Recycling Organic Waste in Agriculture*, 11, (2), 177-187. Disponible en: <https://ijrowa.isfahan.iau.ir/article_685584.html>

Ávila Núñez R., Chirinos M., Hernández Motzezak R. y Rivas Pérez B. (2012). "Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores", *Agave Cocoui Trelease Multiciencias*, 12, (2), 129-135. Disponible en: <<https://www.redalyc.org/pdf/904/90424216002.pdf>>

Becker K., Mohan P. S. y Siddhuraju P. (2022). "Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (Cassia fistula L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp", *Food Chemistry*, 79, 61-67. Disponible en: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814602001796?via%3Dihub>>

Boscariol A., Contreras S., Enriquez Tellez V., Giorlando P., Lesik D., Maldonado M. y Zaragoza C. (2021). "Effect of bioestimulation in the bioremediation of Waters coming from debittering olive process", *Environmental Advances*, 10, 1-7. Disponible en: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666765722001569?via%3Dihub>>

Cádiz-Gurea M. L., Delerue-Matos C., Pinto D. y Rodrigues F. (2021). "Residuos de frutos y hojas de olivo como ingredientes bioactivos para cosméticos: un estudio preliminar", *Antioxidantes*, 10, (2), 245. Disponible en: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/10/2/245>>

Demerche S., Larroche C., Michaud P., Mouliti-Mati F. y Nadour M. (2013). "Olive millwastes: biochemical characterizations and valorizations strategies", *Process Biochemistry*, 48, 1532-1552. Disponible en <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511313003917>>

Dhouib A., Mekki A. y Sayadi, S. (2006). "Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill wastewater", *Microbiological Research*, 161, (2), 93-101. Disponible en: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501305000649>>

Fernández M. J., Lama-Calvente D. y Rincón-Llorente. (2018). "Table Olive Wastewater: Problem, Treatments and Future Strategy. A Review", *Frontiers in Microbiology*, 9, Sec.

Food Microbiology, 2-4. Disponible en: <
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01641/full>>

Galanakis C. M., Jafari S. M. y Rahmanian N. (2013). "Recovery and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, (1), 61-67. Disponible en: <<https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1007/s11746-013-2350-9>>

Kopsidas G. C., (1992). "Wastewater from the preparation of table olives", *Water Research*, 26, (5), 629-631. Disponible en: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004313549290237X>>

Rapoport H. F. (1999). "Botánica y morfología", *El Cultivo del Olivo*, 35-60.