



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 889**

51 Int. Cl.:
C11B 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04764483 .6**

86 Fecha de presentación : **25.08.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1658360**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2006**

54 Título: **Optimización biotecnológica del proceso en la obtención de aceite.**

30 Prioridad: **25.08.2003 DE 103 39 010**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **SÜD-CHEMIE AG.**
Lenbachplatz 6
80333 München, DE

72 Inventor/es: **Jackisch, Björn-Oliver**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Optimización biotecnológica del proceso en la obtención de aceite.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de aceite a partir de masas de aceitunas y/o de componentes de aceitunas, utilizándose una enzima o una mezcla de enzimas.

10 El aceite de oliva se obtiene de los frutos del olivo (árbol de la clase de las dicotiledóneas, orden de los oleales, familia de las oleáceas, especie: *Olea europaea*). El fruto del olivo (aceituna) tiene una forma redonda, de sección transversal oval, y es un fruto carnoso de hueso con sabor amargo. Las propiedades físicas y químicas de los frutos del olivo dependen de muchos factores, como, por ejemplo, el tipo o variedad, el grado de maduración, el momento de la cosecha, la situación geográfica o las condiciones del crecimiento. Desde el punto de vista estructural, puede dividirse el fruto del olivo en dos componentes esenciales, que son el pericarpio y el endocarpio. El pericarpio abarca el epicarpio (exocarpio) y el mesocarpio (pulpa), que rodean el endocarpio (hueso de madera), en el cual, nuevamente, se halla incluida la semilla.

15 La producción de aceite a partir de los frutos del olivo es de gran importancia económica. De acuerdo con los datos del Concejo Internacional del Aceite de Oliva (International Olive Oil Council, IOOC), para el año de producción 2003/2004 se espera una cantidad mundial total de más de 2,8 millones de toneladas de aceite de oliva. Esta cantidad se elabora mediante los métodos tecnológicos más diversos, y abarca diversas calidades. Es posible una subdivisión de los métodos de producción sobre la base de dos principios, a saber, por una parte la tecnología mecánico-física como, por ejemplo, prensado, percolación, así como procedimientos de dos o tres fases, y por otra parte, procedimientos basados en disolventes en forma de tecnología química-extractiva.

20 La tecnología empleada y el tipo de conducción del proceso, determinan, entre otros, el rendimiento en aceite de oliva. Para la elaboración en los procedimientos mecánico-físicos, se procede en primer lugar a triturar o desmenuzar las aceitunas, por ejemplo, mediante muelas de molino o molinos de martillo, seguido por un paso en el que se somete a incubación la pasta de aceitunas durante un tiempo determinado (típicamente durante 30-90 minutos) bajo agitación horizontal, eventualmente bajo adición de agua, para un mayor desmenuzado y maceración. A ello le sigue una obtención del aceite a partir de la suspensión obtenida, típicamente mediante presión (prensado) y/o mediante fuerza centrífuga.

25 En el primer paso de aislación, descrito en lo que precede, es decir en el paso en el que las aceitunas trituradas ingresan directamente, se aísla, en función del procedimiento, típicamente entre 50 y 85% de la totalidad del aceite contenido. La masa de aceitunas (pulpa de aceitunas) obtenida después del primer paso de aislación presenta por consiguiente todavía un significativo contenido residual de aceite, siendo posible causar su reducción mediante la repetición única o múltiple del primer paso del proceso, eventualmente bajo la modificación de determinados parámetros del proceso como, por ejemplo la temperatura, fuerza centrífuga aplicada, adición de agua, etc. Sin embargo, la aislación del aceite mediante métodos mecánicos-físicos puede llevarse a cabo de una manera económicamente conveniente solamente hasta un determinado contenido residual de aceite. Por ello, a efectos de reducir más aún el contenido residual de aceite y con ello elevar el rendimiento en aceite, se recurre a procedimientos químicos de extracción. A tal efecto se seca la pulpa de aceituna, eventualmente se la extruye y extrae con un disolvente como, por ejemplo, hexano. El aceite se obtiene del extracto por separación del disolvente, por ejemplo por evaporación. Además del rendimiento, también la calidad del aceite de oliva es influida por el tipo de procedimiento y por la conducción del proceso. Es económicamente conveniente la elección de aquellos procedimientos que provean aceite de alta calidad, ya que la calidad se correlaciona positivamente con el precio a obtenerse. A tal efecto son especialmente adecuados los procedimientos mecánico-físicos. También por razones ambientales y de seguridad laboral existe un empeño de renunciar en todo lo posible a los procedimientos químico-extractivos, a favor de los procedimientos mecánico-físicos.

30 La utilización de enzimas se conoce también de la bibliografía. Las enzimas son polipéptidos funcionales que están en condiciones de catalizar el desdoblamiento de sustratos definidos o la síntesis de determinados productos. Con referencia al proceso de la producción del aceite de oliva, en el pasado se han descrito preferentemente aquellas enzimas o mezclas de enzimas que están en condiciones de tener un efecto de degradación sobre determinadas estructuras celulares del fruto del olivo.

35 El empleo de enzimas que degradan las paredes de las células en la producción del aceite de oliva ya se ha descrito en 1954 por Soroa y Pineda (de Soroa y Pineda, J. M. (1954) *Oleagineux* 9, 865-868. *Emploi des enzymes dans l'extraction de l'huile d'olive*). Por otra parte, del estado la técnica se conoce el empleo de enzimas endógenas o exógenas como las poligalacturonasas (EC 3.2.1.15 (*endo*-) o EC 3.2.1.67 (*exo*-)), las pectina esterasas (EC 3.1.1.11), la pepsina (EC 3.4.23.1), la papaína (EC 3.4.22.2), las celulasas (EC 3.2.1.4), la α -amilasa (EC 3.2.1.1.), las proteasas (EC 3.4.2x.yz), la β -glucosidasa (EC 3.2.1.21), la β -galactosidasa (EC 3.2.1.23), las α -arabinosidasas (EC 3.2.1.55), la α -mannosidasa ((EC 3.2.1.24), las β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), la β -N-acetilglucoamidasa (EC 3.2.1.52), la α -D-galactosidasa (EC 3.3.1.22), las pectina-liasas (EC 4.2.2.10) y la pectato-liasa (EC 4.2.2.2). Los números de EC indicados se refieren a la nomenclatura de las enzimas conforme a las Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzyme-Catalysed Reactions (Recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y de Biología Molecular sobre la Nomenclatura y Clasificación de Reacciones Catalizadas mediante Enzimas (www.

chem.qmul.ac-uk/iubmb/enzyme). El documento EP 0 616 024 describe un procedimiento específico para la producción de aceite de oliva a partir de frutos de olivo deshuesados mediante la utilización de una celulasas.

5 Sin embargo, en este sentido los sistemas descritos en la bibliografía no son óptimos, ya que sólo elevan de manera relativamente reducida el rendimiento en aceite en la producción del aceite de oliva. Además, falta una optimización biotecnológica del proceso del procedimiento de la producción de aceite, en especial en relación con las masas de aceitunas previamente desaceitadas.

10 Por ello la misión de la invención consistió en poner a disposición un procedimiento mejorado para la producción de aceite bajo la utilización de una enzima, o de una mezcla de enzimas, con cuya ayuda sea posible elevar de manera significativa el rendimiento del proceso de la producción del aceite y además de ello facilitar el proceso de la separación del aceite.

Descripción de la invención

15 La misión se resuelve mediante el procedimiento conforme a la reivindicación 1. En las reivindicaciones secundarias se indican formas de realización ventajosas.

20 En primer lugar, se prepara una composición o masa, de aceitunas o de componentes de aceituna. En este caso, puede emplearse cualquier masa de aceitunas o de componentes de aceituna usual para la persona experta, tratándose por lo general de una masa de aceitunas o de componentes de aceitunas, previamente trituradas. En este caso, en principio pueden encontrarse presentes diversos componentes del fruto de olivo en proporciones arbitrarias. Por lo general, en la práctica de la producción del aceite se trata de una masa de aceitunas o de una pulpa de aceitunas, que contiene las porciones de pericardio del fruto de olivo, es decir el epicarpio y el mesocarpio. Se trata preferiblemente de una masa en la que las aceitunas, o los componentes de las aceitunas, ya han sido trituradas mediante procedimientos mecánicos tales como molienda. Se ha descubierto de manera sorprendente que el procedimiento conforme a la invención es especialmente adecuado y eficiente para la producción de aceite a partir de masas de aceitunas o de componentes de aceitunas, de las cuales no se han retirado o separado los huesos. Por lo tanto, también se encuentran contenidas porciones de endocarpio. Esto posibilita un procedimiento simplificado, pudiéndose lograr un rendimiento y una calidad de aceite muy buenos.

30 Por otra parte, puede tratarse de una masa de antes o después del primer desaceitado (obtención de aceite). Sin embargo, se ha demostrado de manera sorprendente que se obtienen resultados especialmente buenos en el marco de la presente invención, cuando en el caso de la masa se trata de una masa ya previamente desaceitada, es decir, que ya ha tenido lugar por lo menos el primer paso de producción del aceite. De acuerdo con una forma de realización especialmente preferida conforme a la invención, se emplea en este caso una pulpa de aceituna previamente desaceitada, almacenada (que frecuentemente recibe también la denominación de "orujo"), que no ha sido expuesta a un paso adicional de separación en el que se separan huesos y pulpas, sino que se expone directamente a otro paso de desaceitado.

40 A la masa de aceitunas y/o de componentes de aceitunas, anteriormente mencionada, se añade una enzima o una mezcla de enzimas que contiene al menos una pectina esterasa. La adición puede tener lugar en una forma arbitraria, líquida o sólida. Sin embargo, en virtud de la dosificabilidad se recomienda la preparación de una solución de enzimas, es decir, de una mezcla líquida de enzimas, antes de la adición a la masa de aceitunas o de componentes de aceitunas. 45 En este caso, es posible partir de una solución madre concentrada de la mezcla de enzimas, que se prediluye poco antes de la adición a la masa. La adición de enzimas puede tener lugar en un momento arbitrario; sin embargo preferentemente antes o durante un paso para el entremezclado y/o triturado de la masa de aceitunas o de componentes de aceitunas. Una adición especialmente preferida es la que tiene lugar en los recipientes de mezclado con barras de agitación verticales u horizontales.

50 En términos generales, el entremezclado de la(s) enzima(s) y de la masa de aceitunas puede efectuarse con todos los medios usuales y conocidos de la persona experta (por ejemplo, mediante agitación), pudiendo también tener lugar de manera simultánea una trituración (adicional) de las aceitunas (de los componentes de las aceitunas), por ejemplo, en un molino.

55 El tiempo y la temperatura de incubación óptimos para cada caso individual, pueden ser determinados por la persona experta de manera sencilla mediante ensayos de rutina. Por lo general, las temperaturas entre 20 y 60°C, preferentemente de 25-55°C, en especial de 30-50°C, y preferentemente los tiempos de incubación entre 5 y 120 min, preferentemente de 10-100 min, en especial de 30-90 min, conducirán a buenos resultados. Sin embargo, también pueden ser convenientes duraciones esencialmente más cortas o más prolongadas. También es eventualmente posible prescindir por completo de una fase de incubación propia.

60 Seguidamente, y como ya se expuso en lo que precede, debe separarse el aceite de la mezcla. La obtención del aceite bajo separación de la fase de aceite puede tener lugar de cualquier manera usual para la persona experta, remitiéndose también, por ejemplo, a los procedimientos indicados en la introducción de la presente memoria descriptiva. Se trata preferentemente de un procedimiento mecánico-físico, es decir, a diferencia del procedimiento químico-extractivo, para la extracción del aceite no se utiliza ningún agente disolvente como por ejemplo, hexano.

Dentro de los alcances de la invención se ha descubierto ahora de manera sorprendente, que gracias al empleo conforme a la invención de la enzima, o de la mezcla de enzimas que contiene al menos una pectina esterasa, se posibilita una producción de aceite especialmente eficiente mediante la utilización de un decantador de tres fases.

En el denominado procedimiento de tres fases, mediante el empleo de al menos un decantador de tres fases se separa la masa introducida, por ejemplo, la pulpa de aceituna que contiene aceite (en un paso de trabajo) en una fase líquida de aceite, una fase acuosa (también denominada frecuentemente “papilla”) y una suspensión (de sólidos) parcialmente desaceitada y parcialmente deshidratada (que muchas veces recibe también la denominación de “alperujo”). Sin embargo, debido a la limitada capacidad de separación del decantador de tres fases, se encuentra convencionalmente una cantidad significativa de aceite en la papilla. Este aceite se aísla habitualmente de la papilla, en un paso posterior del proceso. Mediante el procedimiento conforme a la invención, se eleva ahora inesperadamente la capacidad de separación del decantador de tres fases, caso éste en que se eleva en especial el rendimiento en aceite y es posible reducir considerablemente la proporción de aceite en la papilla. De manera sorprendente, con la ayuda del procedimiento conforme a la invención, es posible lograr en la mayoría de los casos que sean superfluos los pasos de proceso eventualmente subsiguientes para aislar el aceite de la papilla. Al respecto, los decantadores de tres fases son conocidos como tales por la persona experta; pueden utilizarse modelos cualesquiera.

Según otro aspecto de la presente invención, se ha descubierto que no solamente en el procedimiento de tres fases, antes descrito, sino también en la utilización de otros procedimientos físicos, o mecánico-físicos, en especial del denominado procedimiento de dos fases, es decir, en el cual gracias al empleo de decantadores de dos fases la pulpa de aceite se separa en una suspensión de fuerte contenido de sólidos (que también recibe la denominación de “alperujo”) y en una emulsión agua/aceite, y se obtiene el aceite por centrifugación a partir de esta emulsión, mediante el empleo conforme a la invención de enzimas, puede hacerse superfluo la interposición de amasadoras, es decir, los piletones de agitación usuales para la persona experta provistos de barras de agitación horizontales, y/o de piletones de agitación, también usuales para la persona experta, con barras de agitación verticales. De una manera especialmente preferida, conforme a la invención, es posible omitir las amasadoras en el procedimiento. En este caso es evidente, sin que por ello la invención se limite a la exactitud de esta suposición, que tiene lugar un mejoramiento de la coalescencia debido a las enzimas solamente. Gracias a la posibilidad de omitir las amasadoras, es posible incrementar considerablemente la rentabilidad económica del proceso.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se ha descubierto que las ventajas, descritas en la presente, del procedimiento para la producción del aceite son especialmente grandes cuando la mezcla de enzimas presenta una determinada composición. Así, se ha descubierto de manera sorprendente que para una relación entre la actividad de la(s) pectina esterasa(s) y la actividad de la(s) *endo*-poligalacturonasas(s) de al menos 0,13, se obtienen propiedades especialmente ventajosas en la producción de aceite. Además, se ha descubierto de manera inesperada que una relación entre la actividad de la(s) pectina esterasa(s) y la actividad de la(s) *exo*-poligalacturonasa(s), de al menos 0,3, es especialmente favorable. Si se respetan estas relaciones, los efectos positivos sobre la liberación del aceite de la masa de aceitunas o de componentes de aceitunas, y sobre la liberación y separación de la proporción acuosa (de la fase acuosa) en el proceso de la producción del aceite, son especialmente marcados. En su conjunto, es posible incrementar de manera sorprendente el rendimiento en aceite.

Conforme a la invención, por una pectina esterasa (PEasa) se entiende una enzima del Grupo de Clasificación EC 3.1.1.11. En principio, es posible determinar la actividad de esta enzima mediante métodos estándar usuales para la persona experta. En el siguiente capítulo, relacionado con los métodos, se indica un método utilizado conforme a la invención. Por lo tanto, la mezcla de enzimas empleada conforme a la invención contiene al menos una (actividad de) PEasa.

Por una *endo*-poligalacturonasa (*endo*-PGasa, *endo*-pectinasa) se entiende conforme a la invención una enzima del Grupo de Clasificación EC 3.2.1.15. En principio, la actividad de esta enzima puede determinarse con la ayuda de los métodos estándar usuales para la persona experta. El método empleado conforme a la invención se indica en el siguiente capítulo, relacionado con los métodos (ácido pectínico (PGA) como sustrato). Por consiguiente, la mezcla de enzimas empleada conforme a la invención contiene al menos una (actividad de) *endo*-PGasa.

Conforme a una forma de realización especialmente ventajosa, la relación entre la pectina esterasa (PEasa) y la actividad de la *endo*-poligalacturonasa, es de al menos 0,15, preferentemente de al menos 0,16.

La mezcla de enzimas empleada conforme a la invención contiene además al menos una *exo*-poligalacturonasa (*exo*-PGasa, *exo*-pectinasa), siendo la relación entre la actividad de la(s) pectina esterasa(s) y la actividad de las *exo*-poligalacturonasa(s), al menos igual a 0,3. Se prefiere especialmente una relación entre las actividades, de al menos 0,33. Conforme a la invención, por *exo*-PGasa se entiende una enzima del Grupo de Clasificación EC 3.2.1.67. En principio, es posible determinar la actividad de esta enzima con ayuda de los métodos estándar usuales para la persona experta. En el siguiente capítulo, relacionado con los métodos, se indica un método empleado conforme a la invención.

Se supone, sin que la invención se limite a este mecanismo teórico, que debido a la proporción de pectina esterasa, relativamente elevada, en especial en el caso de una presencia simultánea de *endo*- y *exo*-PGasa(s), se logra un desintegración especialmente eficiente de las estructuras polisacáridas de elevado peso molecular, en las cuales se halla “incluido” el aceite a producir. También se supone que gracias a las pectina esterases se mejora la accesibilidad a

los sustratos de *endo*- y *exo*-PGasas como también de otras enzimas que desdoblan polisacáridos. Por ello es manifestamente también posible acelerar la descomposición de estructuras de elevado peso molecular, con los cuales está asociado el aceite a producir. Por definición, la *exo*-PGasa cataliza la liberación de monómeros D-galactouronato a partir de polímeros 1,4-alfa-D-galacturónicos por desdoblamiento de enlaces O-glicósidos en posición extrema. Si se emplea pectina como sustrato, será necesario, lo mismo que en el caso de la *endo*-PGasa, que los eventuales ésteres de ácido metílico de los ácidos poligalacturónicos se conviertan en primer término en el ácido libre, o en la sal del mismo, para que se encuentren a disposición como sustrato para la *exo*-PGasa. En este contexto, el ajuste de la relación (mínima) conforme a la invención entre pectina esterasa y *exo*-PGasa es de manera evidente, especialmente ventajoso. El desdoblamiento de los ésteres de ácido por las pectina esterases a lo largo de la cadena de polisacáridos tiene lugar de manera por demás estadística. De esta manera, en el primer paso, la cadena se vuelve accesible como sustrato para la PGasa, y el sustrato divide seguidamente la cadena en oligosacáridos. Es posible que en este caso la *exo*-PGasa ya lleve a cabo un desdoblamiento en posición terminal, pero solamente hasta que se encuentre nuevamente con un éster de ácido metílico en la cadena. Entonces, una nueva descomposición en posición terminal de la cadena podría tener lugar solamente si este éster de ácido metílico se transforma en el ácido. La relación mínima, conforme a la invención, entre PEasa y *endo*-PGasa puede proporcionar que el desdoblamiento estadístico de los ésteres de ácido metílico por la PEasa se sintonice con la actividad de *exo*-PGasa, de modo tal que el mismo puede trabajar con una eficiencia especialmente elevada sin que se presente una restricción de la conversión debida a ésteres metílicos bloqueantes. Es también posible imaginar otras interacciones favorables entre las actividades enzimáticas anteriormente mencionadas.

Se prefiere especialmente que la relación entre la actividad de la pectina esterasa y la actividad de la *endo*-poligalacturonasa no sea mayor que aproximadamente 1, en especial no mayor que aproximadamente 0,5, y que la relación entre la actividad de la pectina esterasa y la actividad de la *exo*-poligalacturonasa no sea mayor que aproximadamente 1, en especial no mayor que aproximadamente 0,6.

De acuerdo con otra forma de realización preferida, la mezcla de enzimas empleada contiene además al menos una laminarinasa (β -1,3-glucanasa). Conforme a la invención, por laminarinasa se entiende una enzima del Grupo de Clasificación EC 3.2.1.39. En principio, es posible determinar la actividad de esta enzima mediante los métodos estándar usuales para la persona experta. En el siguiente capítulo de los métodos se indica un método empleado conforme a la invención. Es preferible que la relación entre la actividad de la pectinerasa y la actividad de la laminarinasa sea al menos 20, preferentemente al menos 30.

De acuerdo con otra forma de realización preferida conforme a la invención, la mezcla de enzimas empleada contiene además al menos una celulasa, en especial una celulasa C1. Por celulasa C1 se entiende conforme a la invención una enzima del Grupo de Clasificación EC 3.2.1.91. En principio, es posible determinar la actividad de esta enzima mediante los métodos estándar usuales para la persona experta. En el siguiente capítulo de los métodos se indica un método empleado conforme a la invención. Es especialmente preferible que la relación entre la actividad de la PEasa y la actividad de la celulasa C1 sea de al menos 20, preferentemente de al menos 30.

Conforme a una forma de realización especialmente preferida, la mezcla de enzimas abarca por ello al menos seis actividades individuales distintas, teniendo las relaciones preferidas de las actividades individuales de manera sorprendente un efecto positivo sobre el rendimiento en aceite obtenido y sobre la separabilidad de las fases. A continuación se da nuevamente una lista de las actividades enzimáticas preferentemente contenidas:

<i>Exo</i> -poligalacturonasa	(EC 3.2.1.67)
<i>Endo</i> -poligalacturonasa	(EC 3.2.1.15)
Pectina liasa	(EC 4.2.2.10)
Pectina esterasa	(EC 3.1.1.11)
Celulasa-C1	(EC 3.2.1.91)
Laminarinasa	(EC 3.2.1.39)

Sin embargo, puede haber también otros componentes contenidos en la mezcla de enzimas conforme a la invención. En relación a los componentes enzimáticos de la mezcla de enzimas puede haber por ejemplo otras enzimas contenidas que degradan las estructuras de las células, o las estructuras de las paredes celulares, como por ejemplo, pero no a título limitativo, las xilanasas (EC 3.2.1.8), o también las enzimas proteolíticas (cfr. la introducción a la memoria descriptiva y el listado de enzimas de la capítulo de los métodos; de acuerdo con una forma de realización conforme a la invención, no contenidas en la mezcla de enzimas). Tampoco se excluyen otros componentes en la mezcla de la masa de aceitunas y de la mezcla de enzimas. Tales aditivos son usuales para la persona experta en la especialidad, y abarcan por ejemplo sales, cofactores, inhibidores o activadores para enzimas, agentes de estabilización como glicerina, etc.

Como ya se mencionó, la mezcla de enzimas utilizadas conformes a la invención es especialmente ventajosa para la elevación del rendimiento en la obtención de aceite de oliva a partir de frutos de olivo o de sus partes componentes, en especial en los procesos de producción mecánico-físicos.

ES 2 282 889 T3

Conforme a la invención, se prefieren especialmente las siguientes actividades de enzima, que pueden determinarse como se indica en el siguiente capítulo de métodos:

a.- pectina esterasa: más de 300 U/ml, en especial, más de 320 U/ml

b.- *exo*-poligalacturonasa: menos de 1.000 U/ml

c.- *endo*-poligalacturonasa: entre 1.500 y 2.500 U/ml

d.- laminarinasa: menos de 15 U/ml, en especial, menos de 12 U/ml

e.- celulasa-C1: menos de 3,3 U/ml

f.- pectina liasa: entre aproximadamente 25.000 y 150.000 U/ml.

Las enzimas individuales pueden obtenerse en el comercio (por ejemplo, las provistas por la Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Alemania). A continuación, antes del capítulo de los métodos, se indican a título de ejemplo, fuentes de enzimas. Sin embargo, es por supuesto también posible emplear enzimas procedentes de otras fuentes, con la condición de que presenten la actividad indicada en lo que antecede. Conforme a una forma de realización preferida, las enzimas se obtienen a partir de cultivos, o del material sobrenadante de cultivos de microorganismos, en especial de bacterias y hongos, levaduras incluidas. Una fuente preferida consiste en cultivos de *Aspergillus Níger*, que presentan varias de las actividades de enzimas contenidas en la mezcla de enzimas conforme a la invención, o aún la totalidad de dichas actividades.

Referido a la masa de aceitunas o de partes componentes de aceitunas, se emplean conforme a la invención de manera especialmente preferida al menos 50 ml, en especial, entre aproximadamente 50 y 400 ml, preferentemente entre 100 y 300 ml; de manera especialmente preferida, entre 125 y 250 ml de la mezcla de enzimas anteriormente mencionada, por tonelada de masa. En muchos casos, son preferentemente ventajosas entre 100 y 175 ml, en especial entre 125 y 150 ml, de la mezcla de enzimas anteriormente descrita, por tonelada de masa. En la presente memoria descriptiva, la expresión “mezcla de enzimas” también debería emplearse en el caso del uso de una sola enzima (PEasa).

En este caso, es preferible que la concentración de proteínas o de enzimas en la mezcla de enzimas empleada sea de aproximadamente 2 a 20 mg/l, preferentemente entre 2 y 12 mg/ml, en especial entre 3 y 10 mg/l. Es posible determinar la concentración de proteínas con la ayuda de procedimientos estándar, por ejemplo, mediante fotometría. A partir de esto es posible calcular de manera sencilla las actividades conjuntas absolutas preferidas de las enzimas individuales contenidas, por tonelada de masa de aceitunas o de partes componentes de aceitunas.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de una mezcla de enzimas como antes definida, para el tratamiento de masas de aceitunas o de componentes de aceitunas, en especial de masas desaceitadas en la producción de aceite. De manera sorprendente, ha resultado ser especialmente ventajosa la utilización en el caso de la producción física o mecánica del aceite. Como se señaló inicialmente, es posible obtener aceites de elevada calidad con estos procedimientos, por lo que el rendimiento en aceite, incrementado conforme a la presente invención, se presenta como especialmente productivo.

En el siguiente método para la determinación de la actividad de la *endo*-PGasa, es también posible emplear como sustrato, pectina en lugar de ácido pectínico (PGA). De esta manera es posible determinar una actividad total de la enzima que degrada la pectina. En este caso, en el marco de una forma de realización alternativa de la presente invención, se ha comprobado que se presentan propiedades especialmente ventajosas en la producción de aceite, cuando en la mezcla de enzimas aplicada la relación entre la PEasa y la actividad total, determinada como antes descrito, de la enzima que degrada la pectina, presente en la mezcla de enzimas, es de al menos 0,035, preferentemente de al menos 0,04, en especial, de al menos 0,05. Conforme a una forma de realización alternativa, por ello la presente invención se refiere también a una composición que contiene una masa de aceitunas o de componentes de aceitunas y una mezcla de enzimas, en donde la relación entre la PEasa y la actividad total, determinada como antes descrito, de la enzima que degrada la pectina, presente en la mezcla de enzimas, es de al menos 0,035, preferentemente de al menos 0,04, en especial, de 0,05.

En este caso, la actividad conjunta de la enzima que degrada la pectina, tiene preferentemente un valor inferior a 8.000 U/ml, en especial, inferior a 7.000 U/ml. Los valores de la actividad de las otras enzimas son como se indicó anteriormente. También las relaciones entre las actividades de la PEasa y de la *exo*-PGasa, de la PEasa y de la laminarinasa, y de la PEasa y de la celulosa C1, son preferentemente como se indicó en lo que precede. Pueden aplicarse las mismas cantidades de mezcla de enzimas como antes descrito.

Otro aspecto conforme a la invención, es el que se refiere a la utilización de una mezcla de enzimas como anteriormente se expuso en uno de los procedimientos descritos en la presente para el tratamiento de masas de aceitunas o de componentes de aceitunas, o en un procedimiento para la producción de aceite. En este caso, conforme a una forma de realización de la invención, es posible mejorar la separación de sólidos/líquidos durante la producción de aceite. Aquí, una utilización preferida es la que se refiere al desaceitado de una masa, previamente desaceitada, de aceitunas o de componentes de aceitunas.

Conforme a una forma de realización especialmente preferida, la separación de sólidos/líquidos tiene exclusivamente lugar con ayuda de al menos un decantador de tres fases.

De acuerdo con otro aspecto de utilización de la presente invención, se eleva el rendimiento en aceite durante la separación de sólidos/líquidos, se reduce el contenido en aceite del desagüe acuoso desde el decantador de tres fases, se eleva la cantidad de agua separada en el desagüe acuoso, y/o se reduce el contenido de aceite y/o de agua de la fase sólida obtenida con la ayuda del decantador de tres fases.

Conforme a otro aspecto de utilización de la presente invención, se hace posible reducir la temperatura del proceso durante la producción de aceite, manteniéndose al menos igual el rendimiento en aceite.

En el proceso de la producción del aceite de oliva también existe el empeño de producir la máxima cantidad posible de aceite de alta calidad, para poder obtener de esta manera un precio lo más elevado posible en el mercado. En el sistema de producción aplicado existe en primera aproximación una correlación entre cantidad de aceite y calidad: si se opera un instalación con una eficiencia de separación la más elevada posible, es decir, si se optimiza la cantidad de aceite, se reduce la calidad, e inversamente. Mediante la utilización de la mezcla de enzimas conforme a la invención es posible lograr de manera sorprendente un aceite de gran calidad junto con un elevado rendimiento.

Uno de los parámetros que define la calidad de un aceite, es por ejemplo el contenido de ácido. Los productores de aceite se esfuerzan en mantener el mismo lo más bajo posible. Además, cabe observar, como descrito arriba, que si bien mediante un centrifugación enérgica se eleva el rendimiento en aceite, de esta manera también ingresan productos secundarios indeseados en el aceite. Estos productos secundarios se depositan lentamente en forma de sedimentos. Puede darse por cierto que los productores de aceite se empeñan en mantener el volumen de este sedimento lo más pequeño posible, la textura lo más uniforme posible, y los colores los más neutros posibles. Con la ayuda de la presente invención se influye de manera positiva sobre los parámetros mencionados.

Por lo tanto, conforme a otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de una mezcla de enzimas como definida en la presente en el procedimiento conforme a la invención descrito en la presente, para la mejora de la calidad del aceite obtenido, en especial la reducción del contenido de ácidos, la reducción de la concentración de dienos o trienos conjugados, la reducción de sustancias peroxídicas, la reducción de esteroides o de ceras y/o la reducción del contenido de ácidos grasos libres en el aceite obtenido. Otra utilización preferida se caracteriza porque debido al tratamiento con la composición de enzimas conforme a la invención, no tiene lugar ninguna influencia negativa sobre el contenido de colesterol, brassicaesterol, estigmaesterol, Δ -estigmaesterol y trilinoleína.

35 Proveedores y Fuentes de Enzimas

- a. EC 3.2.1.15 *endo*-PGasa, por ejemplo, la Firma Sigma-Aldrich, Catálogo- N° P4716, de *A. Níger*
- b. EC 3.2.1.67 *exo*-PGasa (Kobayashi, T., Higaki, N., Yajima, N., Suzumatsu, A., Hagibara, H., Kawai, H., e Ito, S. (2001), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, Págs. 842-848) o de ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel, Alemania, en forma de soluciones de enzimas que contienen *exo*-PGasa.
- c. EC 3.1.1.11 pectina esterasas, por ejemplo, de la Firma Sigma-Aldrich, Catálogo - N° 5400, a partir de cáscaras de naranja.
- d. EC 3.4.23.1 pepsina, por ejemplo de la Firma Sigma-Aldrich, Catálogo N° P7012, a partir de mucosa gástrica de cerdo
- e. EC 3.4.22.2 papaína, por ejemplo, de la Firma Sigma-Aldrich, Catálogo N° P4762, a partir de papaya
- f. EC 3.2.1.4 celulasa, por ejemplo de la Firma Sigma-Aldrich, Catálogo N° C1184, a partir de *A. niger*
- g. EC 3.2.1.1 α -amilasa, por ejemplo de la Firma Sigma-Aldrich, Catálogo N° A6211, a partir de *A. oryzae*
- h. EC 3.4.2x.yz proteasas, por ejemplo pepsina y papaína, arriba mencionadas
- i. EC 3.2.1.21 β -glucosidasa, por ejemplo de la Firma Sigma-Aldrich, Catálogo N° G6906, recombinante
- j. EC 3.2.1. 22 α -galactosidasa, por ejemplo de la Firma Sigma-Aldrich, Catálogo N° G4408, a partir de *A. Níger*
- k. EC 3.2.1.23 β -galactosidasa, por ejemplo de la Firma Sigma-Aldrich, Catalogo N° G3522, a partir de *A. niger*
- l. EC 3.2.1.55 α -arabinosidasa
- m. EC 3.2.1.24 α -mannosidasa, por ejemplo, de la Firma Sigma, Catálogo N° M7257, a partir de habas

- n. EC 3.2.1.37 β -xilosidasa, por ejemplo, de la Firma Sigma, catálogo N° X3501, a partir de *A. Níger*
- o. EC 3.2.1.52 β -N-acetilglucosaminidasa, por ejemplo, de la Firma Sigma, Catálogo N° A2264, a partir de habas.
- p. EC 4.2.2.10 pectina-liasa, por ejemplo, de la Firma Sigma, Catálogo N° PP7052, a partir de *A. niger*
- q. EC 3.2.1.6 laminarinasa, por ejemplo, de la Firma Sigma-Aldrich, Catálogo N° L5272, a partir de *Trichoderma spec.*
- r. EC 3.2.1.8 xilanasa, por ejemplo, de la Firma Sigma-Aldrich, Catálogo N° X3876, de *Trichoderma veride*

Métodos: Determinación de las actividades de las enzimas (según métodos de la Firma ASA Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel, Alemania)

A menos que se indique otra cosa, dentro del marco de la invención se determinan las actividades de las enzimas de acuerdo con los procedimientos indicados en el siguiente Capítulo de Métodos.

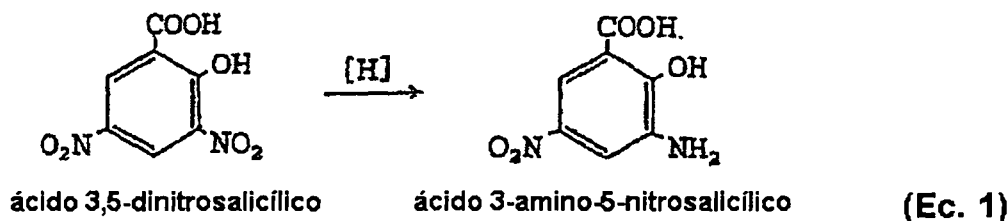
1.- Determinación de la actividad de la *exo*-poligalacturonasa-(*exo*-PGasa)

(Medición del azúcar reductor)

Principio del Ensayo

La *exo*-poligalacturonasa (*exo*-PGasa) se desdobra a partir de unidades ácido galacturónico de pectina de citrus saponificadas, que debido a los grupos aldehído reductores pudieron detectarse por fotometría después de la reacción con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSS).

Al calentarse ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSS) con azúcares reductores en medio alcalino, se forma ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Ecuación 1). En este caso se reduce un grupo nitro en forma de grupo amino, mientras que el grupo aldehído del monosacárido se oxida en forma de grupo carboxilo (Kakác y Vejdelek, 1974).



Diferentes azúcares dan como resultado diversas coloraciones cuya absorción máxima se encuentra entre 500 y 550 nm. De esta manera, con este ensayo es también posible detectar mono-, di-, oligo- y polisacáridos así como metilpentosas y O-metilsacáridos.

Reactivos

Reactivo DNSS-fenol:

- Solución A:

Introducir por pesada 38,55 g de tartrato de K y Na en una copa de vidrio de 200 ml, y disolver en 125 ml de agua destilada; en la solución se disuelven 2,425 g de NaOH (galleta).

- Solución B:

Disolver 1,325 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$; ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico) en una botella de rosca marrón, en 125 ml de agua destilada.

- Solución C:

Disolver 1,05 g de fenol en 12,5 ml de agua destilada. Añadir consecutivamente 0,25 g de NaOH (galleta) y 1,05 g de Na_2SO_4 , y disolver bajo agitación.

ES 2 282 889 T3

- Solución de Uso:

La solución A y la solución B se vierten (sin enjuague ulterior) en la solución C, y se homogeneiza durante 10 min. Dejar la solución en reposo durante al menos una noche antes del uso, y conservar siempre en la oscuridad.

- Solución del sustrato:

Solución de pectina de citrus saponificada al 2,2% en citrato de Na 0,1 M, pH 4,4; método de saponificación: protocolo según Boehringer Ingelheim, Pág. 3.

- Solución estándar:

12,0 g/l de ácido galacturónico (GA) en agua destilada.

Realización

Muestras:

Mezclar 0,9 ml de solución de sustrato con 0,1 ml de solución de enzimas, someter a incubación a 30°C durante 30 min, y a continuación colocar de inmediato en el baño de hielo. Añadir 2,0 ml de reactivo DNSS-fenol y hervir durante 5 min. Enfriar la mezcla durante 5 min en el baño de hielo, y medir la extinción a temperatura ambiente y a 492 nm.

Valores por defecto:

Mezclar 0,9 ml de solución de sustrato con 0,1 ml de agua, añadir 2,0 ml de reactivo DNSS-fenol, y hervir durante 5 min. Enfriar la mezcla durante 5 min en el baño de hielo, y medir la extinción a temperatura ambiente y a 492 nm.

Estándar:

Mezclar 1,0 ml de solución estándar diluida con 2,0 ml de reactivo DNSS-fenol y hervir durante 5 min. Enfriar la mezcla durante 5 min en el baño de hielo, y medir la extinción a temperatura ambiente y a 492 nm.

Calibración

Diluciones de la solución estándar para el trazado de las rectas de calibración:

C (GA) en g/l	Solución estándar en μ l	Agua destilada en μ l
0,6	50	950
1,2	100	900
1,8	150	850
3,0	250	750
4,5	375	625
6,0	500	500

Evaluación

$$\text{Actividad de } \textit{exo}\text{-PGasa [U/ml]} = \frac{\Delta c(\text{GA})}{M(\text{GA})} \cdot \frac{V_{\text{solución reactiva}}}{V_{\text{enzimas}} \cdot t_{\text{reacción}}} \cdot \text{Diluc} \cdot$$

$$M(\text{GA}) = 194 \text{ g/mol}$$

$$T_{\text{reacción}} = 30 \text{ min}$$

Preparación de la solución saponificada de pectina al 2,2% (solución de ácido pectínico)

Se ajusta a 35°C una botella de 250 ml en un baño de agua, y en la misma se instala un agitador con motor de agitación. En esto, 2,2 g de pectina de citrus, esterificado en más de 80% (provisto por Herbstreith und Fox KG, Pektin Classic CF 201, 00302026 de 30.04.03) se humedecen con 4 ml de alcohol puro bajo agitación lenta. Bajo un movimiento de agitación más intensivo, sobre esto se vierten 50 ml de agua destilada en el medio del remolino de agitación, y se continúa la agitación durante otros 20 min. Cabe tener presente que en este caso debe formarse una

ES 2 282 889 T3

solución viscosa lisa sin grumos. Seguidamente, y tomándose nota del tiempo para la saponificación, mediante un embudo de goteo se añade rápidamente gota a gota 20 ml de una lejía de sosa 0,5 N en un intervalo de 5 minutos. Después de un tiempo total de saponificación de exactamente 6 min a 35°C bajo agitación constante, se detiene la reacción mediante la adición de ácido cítrico al 10% desde una pipeta de varilla. Mediante la adición de 3 ml de solución de ácido cítrico se ajusta el pH a 4,4. No puede corregirse posteriormente el valor del pH mediante la adición posterior de lejía.

A continuación se transfiere el contenido de la copa de vidrio bajo enjuague con solución tampón, a una probeta graduada de 100 ml. Después de haber enfriado la solución a 20°C, se completa el volumen con tampón citrato pH 4,4, hasta obtener un volumen total de 100 ml. Antes del uso se filtra la solución terminada de ácido pectínico sobre lana de vidrio.

2.- Determinación de la actividad de *endo*-poligalacturonasa (*endo*-PGasa)

Definición

Una unidad específica de *endo*-PGasa corresponde al valor recíproco, multiplicado con 100 ml, de la cantidad de enzimas en g, que en 30 min reduce la viscosidad (- equivalente en agua) de 1 litro de una solución de ácido pectínico al 2,2% *) en 3/5; (referida a una viscosidad relativa de 0,4), a 30°C y para un pH óptimo de 4,4.

*) Ácido pectínico puro

Fluka AG, Chemische Fabrik, CH-9470 Buchs SG

Principio

Medición de la degradación de la viscosidad de la solución fermentada de ácido pectínico de Fluka en el viscosímetro de Ostwald.

Aparatos

- a) viscosímetro según Ostwald 30 ml; valor de agua aproximadamente 40 seg en baño a 30°C.
- b) termostato-Ultra con baño de agua y dispositivos de suspensión para tubos de ensayo
- c) baño de agua con termostato de suspensión
- d) motor de agitación con agitador de paletas
- e) copas de vidrio de 600 y 800 ml
- f) matraces graduados de 100 y 500 ml
- g) pipetas graduadas de 3, 20 y 30 ml
- h) tubos de ensayo, de 18 x 180 mm
- i) botella de succión, frita de vidrio con manguito de goma y lana de vidrio, probeta graduada de 100 y 250 ml
- j) cronómetros, división 0,1 seg.
- k) aparato de pH y electrodo de vidrio, y
- l) agitador magnético con varillas

Reactivos

- ácido pectínico puro (Fluka AG, Chem. Fabrik, Buchs, SG)
- ácido cítrico monohidratado, DAB 6
- lejía de sosa 1N, 0,5 N, 0,1 N

ES 2 282 889 T3

- ácido clorhídrico 0,1 N
- Alcohol absoluto p.A.

5

Soluciones

a) solución de tampón citrato pH 4,4 (0,1 molar)

10 Solución de base:

Disolver 21,01 g de ácido cítrico monohidratado en un matraz graduado de 1 litro, en aproximadamente 100 ml de agua destilada.

15 A esto añadir mediante pipeta 200 ml de lejía de sosa 1 N y mezclar bien, completar hasta la marca de graduación

Utilización de la solución:

20 De la solución de base se introducen aproximadamente 350 ml en una copa de vidrio de 800 ml, y se sumerge un electrodo de vidrio con un aparato de pH acoplado. Bajo agitación (agitador magnético) se añade ahora lentamente ácido clorhídrico 0,1 N hasta lograr pH = 4,4.

b) solución de ácido pectínico (al 2,2%)

25

Se colocan 11 g de ácido pectínico en una copa de vidrio de 600 ml (forma plana), y se mezcla con 20 ml de alcohol (etanol p.A.). Se deja hinchar durante 30 minutos. Seguidamente se fija la copa de vidrio en un baño de agua con termostato de suspensión regulado a 35°C, y sobre esto se instala un motor de agitación con agitador de paletas de modo tal que el agitador de paletas quede colgado lo más cerca posible arriba del fondo de la copa de vidrio.

30

Bajo un fuerte movimiento de agitación se vierten 240 ml de agua destilada en la copa de vidrio, y seguidamente se continúa la agitación durante exactamente 20 min, manteniéndose una velocidad de agitación constante y fuerte.

35

Cabe tener presente que ha de formarse una solución viscosa lisa sin grumos. Seguidamente se ajusta el valor del pH de la solución con lejía de sosa (primero 0,5 N y después 0,1 N) a exactamente pH = 4,4 (medidor de pH). No se debe sobretitular, ¡ya que con valores de pH superiores a pH = 4,4 se forman grumos por formación de gel! Después del ajuste del pH se transfiere el contenido de la copa de vidrio bajo un buen lavado final con la solución tampón de citrato pH 4,4, a un matraz graduado de 500 ml, y después de enfriamiento a 20°C se completa con tampón citrato hasta la marca.

40

Antes de la utilización se filtra la solución de ácido pectínico terminada, sobre lana de vidrio.

Realización de la determinación

45

De la solución de ácido pectínico recién preparada se introducen mediante pipeta volumétrica, en función de la cantidad de muestras de enzima, cada vez 30 ml en copas de vidrio, y antes de la fermentación en el termostato Ultra para tubos de ensayo regulado a 30°C - se calienta durante aproximadamente 5 min a 30°C. La adición del fermento de en cada caso 3 ml (vaciar por soplado la pipeta volumétrica) a la solución de 30 ml de ácido pectínico templado tiene lugar registrándose los tiempos por opresión de un cronometro. En el caso de haber varias muestras de enzimas se añaden las soluciones de enzima correspondientes a intervalos de en cada caso 4 min. Después de un tiempo de fermentación de al menos de 30 min a 30°C, se retira la muestra de reacción del baño de agua y con la misma se llena el viscosímetro de Ostwald, también templado a 30°C. La solución en el viscosímetro se eleva inmediatamente por succión, específicamente de manera tal que en la salida del líquido pasa por la marca superior exactamente a los 30 min después del inicio de la fermentación. El tiempo de pasada entre las marcas de graduación se toma con un segundo cronometro, y se registra como viscosidad final. En este caso, si hay varias muestras de fermentación, también debe respetarse exactamente la separación de en cada caso 4 min entre cada una de las mediciones.

55

La viscosidad inicial se determina en el mismo viscosímetro, midiéndose el tiempo de pasada de 30 ml de solución de ácido pectínico a 30°C, pero añadiéndose ahora, en lugar de solución de fermento, 3 ml de solución tampón citrato pH 4,4. Debe determinarse la viscosidad inicial inmediatamente antes de la viscosidad final. Si se investiga una serie completa de muestras de enzimas, se determina la viscosidad inicial antes y después de la serie de medición, adoptándose el valor promedio.

65

ES 2 282 889 T3

Evaluación

Medición en el mismo viscosímetro

Valor equivalente en agua

5 Tiempo de pasada de agua destilada → W

Viscosidad inicial

Tiempo de pasada de la solución de ácido pectínico + 3 ml de tampón pH 4,4 → A

Viscosidad final

10 Tiempo de pasada de la solución fermentada → E

La viscosidad relativa de la solución fermentada corresponde a la relación entre la viscosidad final (valor equivalente en agua) y la viscosidad inicial (-valor equivalente en agua).

15

$$\text{Viscosidad relativa} = \frac{E - W}{A - W}$$

20 El valor de la viscosidad relativa debería estar entre 0,36 y 0,45. De no cumplirse este requisito, debe repetirse la medición con una cantidad aplicada de enzima, correspondientemente modificada. Para la determinación de la nueva pasada puede emprenderse una valoración de la actividad con ayuda de la “curva de calibración sobre un amplio intervalo”, y aplicarse las unidades así calculadas como valor normativo.

25 *Calculo de la Actividad*

$$\text{Actividad de la } endo\text{-poligalacturonasa [U/ml]} = \frac{k \cdot x \cdot V_T \cdot x \cdot V_F}{V_E}$$

30 $k = 1.100$; valor de curva de la curva de calibración bajo una viscosidad relativa de 0,40 (obtenida con una enzima estándar)

V_T = volumen de ensayo

35 V_F = factor de dilución

V_E = volumen de la solución de enzima [ml]

40 *Obtención de la curva de calibración*

El ensayo de la viscosidad se lleva a cabo con diversas concentraciones de una enzima estándar (Panzym Combi 285/12, Boehringer Ingelheim). La concentración de la enzima, que conduce a una viscosidad relativa de 0,40, se iguala con el valor de curva 1.100.

De acuerdo con la forma de realización alternativa de la invención, en el protocolo precedente, en lugar de ácido pectínico (PGA) se empleó pectina de manzana (Sigma, N° de Catálogo: P8471). Esto permite una determinación paralela de la viscosidad de las siguientes actividades de enzimas: pectina esterasa, pectina liasa, *endo*- y *exo*- poligalacturonasa.

3.- Determinación de la actividad de la pectina liasa

55 *Principio del Ensayo*

Durante el desdoblamiento de la pectina por la pectina liasa, se forma un enlace doble entre los átomos C -4 y C-5 de la extremidad no reductora, recién formada, de la cadena. El enlace doble conduce a una absorción de la luz a 235 mm. La velocidad, con la cual aumenta la extinción, sirve como medida de la actividad de la liasa.

60

Solución del substrato

65 0,41 g de pectina de manzana B (pectina de citrus, de Herbstreith & Fox KG N° 00302026 del 30.04.03) se disuelven sobre 100 ml con tampón citrato 0,1 n, pH 5,0, y se filtra (por ejemplo, a través de un filtro de vidrio G2).

Realización de la medición

En la cubeta con un espesor de capa de 1 cm se aplican mediante pipeta 2,9 ml de solución de sustrato (templada a 30°C) y 0,1 ml de dilución de enzima a 30°C y a 235 nm. Se mide el incremento de extinción a lo largo del tiempo en comparación con una muestra de cero de 2,9 ml de sustrato y 0,1 ml de dilución de enzima previamente desactivada mediante calor.

En el inicio de la reacción, el incremento de la extinción debería estar en el intervalo de entre 0,005 y 0,05 por minuto; en caso contrario, deberá repetirse la medición con una enzima diluida en mayor o menor grado.

Cálculo de la Actividad

La actividad de la liasa resulta de los valores de incremento medidos de la extinción por minuto ($\Delta Ext.$), al inicio de la reacción:

$$\text{Actividad de la pectina liasa en U/ml} = \frac{\Delta Ext \cdot x \cdot 1.000 \cdot x \cdot 30 \cdot x \cdot V_F}{5,5}$$

V_F = factor de dilución

4.- Determinación de la actividad de la pectina esterasa (PEasa)

Definición

Una unidad específica de pectina esterasa (PEasa-E) corresponde a la cantidad de enzima en g, que en un minuto desdobla a 30°C y con el pH óptimo de 4,4, un microequivalente de grupos éster metílico en una solución de pectina que contiene 550 mg de pectina de citrus altamente esterificado.

Principio

Titulación alcalimétrica de la solución de pectina durante el proceso de enzimación a 30°C y manteniéndose constante el valor de pH de 4,4 con una lejía de sosa 0,02 N. Los primeros 5 minutos después de la adición de la enzima a la solución de pectina, sirven para el ajuste del valor teórico del pH. La titulación propiamente dicha de aproximadamente 20 minutos empieza después de este tiempo.

Aparatos

- a) aparato de pH con electrodo de vidrio y equipo de titulación
- b) baño de agua con termostato de suspensión
- c) motor de agitación con agitador de paletas...
- d) dos microburetas de 10 ml, automáticos
- e) matraces graduados de 100 ml, de 1 litro
- f) pipetas volumétricas de 10 ml, de 100 ml
- g) copas de vidrio de 200 ml, de 1 litro
- h) cronómetro
- i) frasco de aspiración, de 1 litro; frita de vidrio con manguito de goma
- j) lana de vidrio o vellón de filtro de vidrio Microlith de tipo OR 80 N (Vidriería Schuller, Westheim)

Reactivos

- pectina seca de citrus, esterificada en aproximadamente 74% (Pemosin, Frankfurt/M)
- lejía de sosa 0,1 N, Tritisol

ES 2 282 889 T3

Soluciones

a) lejía de sosa 0,01 N

5 2 x 100 ml de lejía de sosa 0,1 N se introducen mediante pipeta en un matraz graduado de 1 litro, y se completa con agua destilada hasta la marca.

b) solución de pectina (al 0,55%)

10

Se fija una copa de vidrio de 100 ml en un baño de agua con termostato de suspensión -ajustado a 30°C-, y sobre el mismo se instala un motor de agitación con agitador de paletas de manera que el agitador de paletas cuelgue lo más cerca posible por encima del fondo de la copa de vidrio.

15 Se introducen aproximadamente 700 ml de agua destilada (H₂O destilada) en la copa de vidrio, y seguidamente se introducen 5,5 g de la pectina seca de citrus altamente esterificada bajo fuerte agitación durante aproximadamente 2 min en el medio del remolino de agitación. A continuación se reduce la velocidad de la agitación, y para todas las investigaciones ulteriores se lleva a cabo una agitación adicional bajo un r.p.m. constante durante exactamente 30 min.

20 Cabe observar que en este caso debe formarse una solución viscosa lisa sin grumos.

El contenido de la copa de vidrio se transfiere bajo lavado final junto con una pequeña cantidad de agua destilada en un matraz graduado de 1 litro, y se completa a 20°C hasta la marca.

25 Antes del uso se filtra sobre lana de vidrio la solución terminada de pectina.

Realización de la determinación

30 En un baño de agua con termostato de suspensión - ajustado a 30°C - se fija una copa de vidrio (de 200 ml) de manera que queda sumergida en el mismo hasta la mitad. Se añaden 20 ml de la solución de pectina en la copa de vidrio, y se temple durante exactamente 15 min.

35 Dentro de este intervalo de tiempo se fija un electrodo de vidrio, acoplado a un medidor de pH con equipo de titulación, de modo que quede sumergido en la solución de pectina en la copa de vidrio. También se instalan un agitador de paletas y las dos tuberías de alimentación de las autoburetas con NaOH 0,1N y 0,01 N.

40 Después de transcurrido los 15 minutos se añaden mediante pipeta 2 ml de solución de enzima en la solución de pectina, y se mantienen bajo agitación constante.

Ahora se cambia a la autobureta con NaOH 0,01 N, al mismo tiempo se pone en marcha el cronómetro y además se mantiene constante el valor del pH en pH = 4,4 mediante la adición, gota a gota, del NaOH 0,04 N. Al cabo de exactamente 10 min después de la toma de tiempo, se determina por lectura la cantidad consumida de NaOH 0,01 N.

45 La cantidad consumida de NaOH 0,01 N debería estar situada entre 1,6 y 4 ml. Si éste no es el caso, debe repetirse la medición con una cantidad correspondientemente modificada de la cantidad, o de la dilución, de la enzima.

Evaluación

50

$$\text{Actividad de la pectina esterasa [U/ml]} = \frac{A \cdot x \cdot M \cdot x \cdot V_F}{V_E \cdot x \cdot t}$$

55 A = consumo de NaOH 0,01 N [ml]

M = molaridad de la solución de titulación [μ mol/ml]

VF = factor de dilución

60

VE = volumen de la solución de enzima [ml]

t = duración de la reacción [min].

65

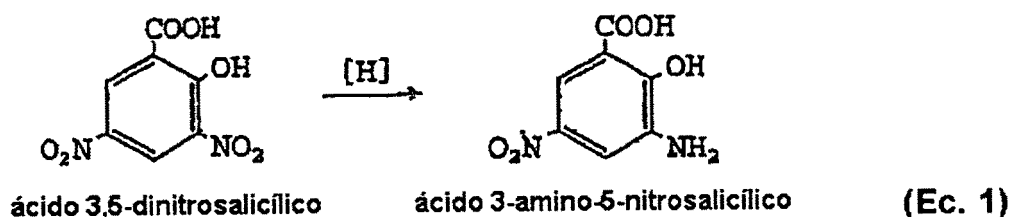
5.- Determinación de la actividad de la celulasa-C1 con Avicel

(Medición del azúcar reductor)

Principio del ensayo

La celulasa desdobla el enlace β -1,4 entre las unidades glucosa dentro de una molécula de almidón. La glucosa que se libera con ello se detecta fotométricamente con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSS).

Durante el calentamiento de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSS) con azúcar reductor en medio alcalino se forma ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Ecuación 1). En este caso se reduce un grupo nitro, obteniéndose un grupo amino, mientras que el grupo aldehído del monosacárido se oxida en forma de grupo carboxilo (Kakác y Vejdelek, 1974).



Distintos azúcares resultan en diversas coloraciones, cuya absorción máxima se encuentra entre 500 y 550 nm. De esta manera, mediante este ensayo, también pueden detectarse mono-, di-, oligo- y polisacáridos, así como metilpentosas y O-metilsacáridos.

Reactivos

Reactivo DNSS-fenol:

- Solución A:

Introducir por pesada 38,55 g de tartrato de K-Na en una copa de vidrio de 200 ml, y disolver en 125 ml de agua destilada. Seguidamente se disuelven 2,425 g de NaOH (galleta).

- Solución B:

Disolver 1,325 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$; ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico) en una botella de rosca, marrón, en 125 ml de agua destilada.

- Solución C:

Disolver 1,05 de fenol en 12,5 ml de agua destilada. Añadir consecutivamente 0,25 g de NaOH (galleta) y 1,05 g de Na_2SO_4 , y disolver bajo agitación.

- Solución de Uso:

La solución A y la solución C se vierten en la solución B, sin enjuague posterior, y se homogeneiza durante 10 min. Dejar en reposo la solución antes de su uso durante al menos una noche, y conservar siempre en la oscuridad.

Substrato: 2,0 g de Avicel en 90 ml de tampón

Tampón: tampón citrato de Na, 0,1 M, pH 4,5

Solución estándar: 2,0 g/l de glucosa en agua destilada.

Realización

Someter a incubación (¡retirar bajo agitación!) 1,5 ml de solución substrato durante 10 min a 50°C, seguidamente añadir 0,5 ml de preparado en enzima líquido (para el valor por defecto tampón 0,5 M). Después de exactamente 20 min de tiempo de reacción se enfría la mezcla en baño de hielo, y se centrifuga durante 20 min a 4.200 rpm. Se mezcla 1,0 ml de material sobrenadante con 2,0 ml de reactivo DNSS-fenol, y se hierve durante 5 min en el baño de agua en ebullición. Enfriar la mezcla durante aproximadamente 5 min en el baño de hielo, y medir la extinción a temperatura ambiente y bajo 546 nm.

ES 2 282 889 T3

Calibración

En lugar de solución de sustrato de enzima, en el ensayo se emplean 2 ml de solución estándar. Diluciones de la solución estándar para el trazado de las rectas de calibración:

C (glucosa) en g/l	Solución estándar en μ l	agua destilada en μ l
0,1	100	1.900
0,125	120	1.880
0,16	160	1.840
0,22	220	1.780
0,24	240	1.760
0,28	280	1.720
0,3	300	1.700

Evaluación

$$\text{Actividad de Celulasa-C1 [U/ml]} = \frac{c(\text{Glucosa})}{M(\text{Glucosa})} \cdot \frac{V_{\text{solución reactiva}}}{V_{\text{enzim}} \cdot t_{\text{reacción}}} \cdot \text{Diluc} \cdot$$

$$M(\text{Glucosa}) = 180 \text{ g/mol}$$

$$T_{\text{reacción}} = 20 \text{ min}$$

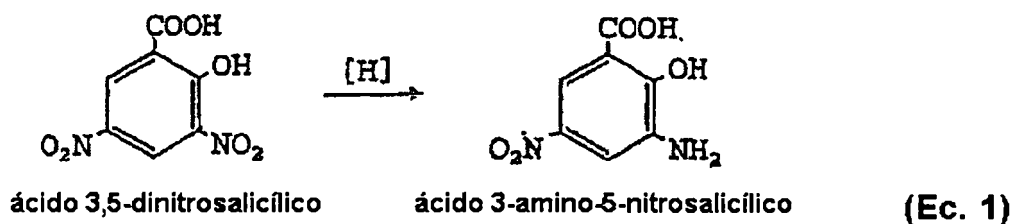
6.- Determinación de la actividad de la laminarinasa-(β -1,3-glucanasa)

(Medición del azúcar reductor)

Principio del ensayo

La laminarinasa desdobra el enlace β -1,3 entre las unidades glucosa dentro de la laminarina. La glucosa que se libera con ello se detecta fotométricamente con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSS).

Durante el calentamiento del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSS) con azúcares reductores en medio alcalino, se forma ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Ecuación 1). En este caso, se reduce un grupo nitro, obteniéndose un grupo amino, mientras que el grupo aldehído del monosacárido se oxida en forma de grupo carboxilo (Kakác y Vejdelek, 1974).



Distintos azúcares dan como resultado diversas coloraciones, cuya absorción máxima se encuentra entre 500 y 550 nm. De esta manera, mediante este ensayo, también pueden detectarse mono-, di-, oligo- y polisacáridos, así como metilpentosas y O-metilsacáridos.

Reactivos

Reactivo DNSS-fenol:

Solución A:

Introducir por pesada 38,55 g de tartrato de K-Na en un vaso de vidrio de 200 ml, y disolver en 125 ml de agua destilada. Seguidamente se disuelven 2,425 g de NaOH (galleta).

ES 2 282 889 T3

Solución B:

Disolver 1,325 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$; ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico) en una botella marrón, de rosca, en 125 ml de agua destilada.

Solución C:

Disolver 1,05 g de fenol en 12,5 ml de agua destilada. Añadir consecutivamente 0,25 g de NaOH (galleta) y 1,05 g de Na_2SO_4 , y disolver bajo agitación.

Solución de Uso:

La solución A y la solución C se vierten en la solución B, sin enjuague posterior, y se homogeneiza durante 10 min. Dejar en reposo la solución antes de su uso durante al menos una noche, y conservar siempre en la oscuridad.

Substrato: laminarina al 0,5% en tampón citrato de sodio 0,1 M, pH 4,5: calentar el tampón a aproximadamente 40°C, añadir laminarina bajo agitación.

Tampón: tampón citrato de Na, 0,1 M, pH 4,5

Solución estándar: 2,0 g/l de glucosa en agua destilada.

Realización

Sondas:

Mezclar 0,8 ml de solución de substrato con 0,1 ml de solución de enzima; someter a incubación a 40°C durante 15 min, colocar seguidamente de inmediato en baño de hielo. Añadir a ello 2,0 ml de reactivo DNSS-fenol y hervir durante 5 min en el baño de agua en ebullición. Enfriar la mezcla durante aproximadamente 5 min en baño de hielo, y medir la extinción a temperatura ambiente y bajo 546 nm.

Valores por defecto:

Mezclar 0,9 ml de solución estándar con 0,1 ml de agua. A ello añadir 2,0 ml de reactivo DNSS - fenol, y hervir durante 5 min en el baño de agua en ebullición. Enfriar la mezcla durante aproximadamente 5 min en el baño de hielo, y medir la extinción a temperatura ambiente y a 546 nm.

Solución estándar:

Mezclar 1,0 ml de solución estándar diluida con 2,0 ml de reactivo DNSS - fenol, y hervir durante 5 min. Enfriar la mezcla durante aproximadamente 5 min en el baño de hielo, y medir la extinción a temperatura ambiente y a 546 nm.

Calibración

Diluciones de la solución estándar para el trazado de la recta de calibración:

C (glucosa) en g/l	Solución estándar en μ l	agua destilada en μ l
0,092	50	950
0,110	60	940
0,147	80	920
0,221	120	880
0,258	140	860
0,294	160	840

Evaluación

$$\text{Actividad de laminarinasa [U/ml]} = \frac{c(\text{Glucosa})}{M(\text{Glucosa})} \cdot \frac{V_{\text{solución reactiva}}}{V_{\text{enzim}} \cdot t_{\text{reacción}}} \cdot \text{Diluc} \cdot$$

M (Glucosa) = 180 g/mol

$T_{\text{reacción}} = 20 \text{ min}$

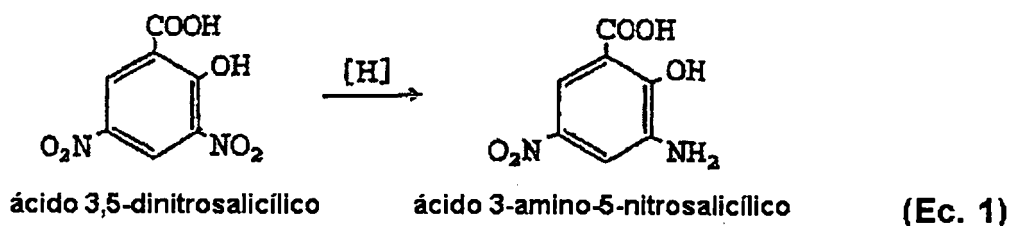
7.- Determinación de la actividad de la xilanasas

(Medición del azúcar reductor)

Principio del ensayo

La xilanasas desdobla el enlace β -1,4 entre las unidades xilosa dentro de una molécula de xilano. La xilosa que se libera con ello se detecta fotométricamente con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSS).

Durante el calentamiento del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSS) con azúcar reductor en medio alcalino se forma ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Ecuación 1). En este caso se reduce un grupo nitro, obteniéndose un grupo amino, mientras que el grupo aldehído del monosacárido se oxida en forma de grupo carboxilo (Kakác y Vejdelek, 1974).



Distintos azúcares resultan en diversas coloraciones, cuya absorción máxima se encuentra entre 500 y 550 nm. De esta manera, mediante este ensayo, también pueden detectarse mono-, di-, oligo- y polisacáridos, así como metilpentosas y O-metilsacáridos.

Reactivos

Reactivo DNSS-fenol:

Solución A:

Introducir por pesada 38,55 g de tartrato de K-Na en una copa de vidrio de 200 ml, y disolver en 125 ml de agua destilada. Seguidamente se disuelven 2,425 g de NaOH (galleta) en la solución.

Solución B:

Disolver 1,325 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$; ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico) en una botella marrón, de rosca, en 125 ml de agua destilada.

Solución C:

Disolver 1,05 g de fenol en 12,5 ml de agua destilada. Añadir consecutivamente 0,25 g de NaOH (galleta) y 1,05 g de Na_2SO_4 , y disolver bajo agitación.

Solución de Uso:

La solución A y la solución C se vierten en la solución B, sin enjuague posterior, y se homogeneiza durante 10 min. Dejar en reposo la solución antes de su uso durante al menos una noche, y conservar siempre en la oscuridad.

Substrato: 2,0 g de xilano en 90 ml de tampón

Tampón: tampón citrato de Na, 0,1 M, pH 4,5

Solución estándar: 2,0 g/l de xilosa en agua destilada.

Realización

Someter a incubación (¡retirar bajo agitación!) 1,5 ml de solución substrato durante 10 min a 50°C, seguidamente añadir 0,5 ml de preparado de enzima líquido (para el valor por default tampón 0,5 ml). Después de exactamente 20 min de tiempo de reacción se enfría la mezcla en el baño de hielo, y se centrifuga durante 20 min a 4.200 rpm. Se mezcla 1,0 ml de material sobrenadante con 2,0 ml de reactivo DNSS-fenol, y se hierva durante 5 min en el baño de agua en ebullición. Enfriar la mezcla durante aproximadamente 5 min en el baño de hielo, y medir la extinción a temperatura ambiente y bajo 546 nm.

ES 2 282 889 T3

Calibración

En lugar de solución de sustrato y enzima, en el ensayo se emplean 2 ml de solución estándar. Diluciones de la solución estándar para el trazado de la recta de calibración:

	C (glucosa) en g/l	Solución estándar en μ l	agua destilada en μ l
	0,1	100	1.900
10	0,125	120	1.880
	0,16	160	1.840
	0,22	220	1.780
	0,24	240	1.760
15	0,28	280	1.720
	0,3	300	1.700

Evaluación

$$\text{Actividad de xilanasas [U/ml]} = \frac{c(\text{xilosa})}{M(\text{xilosa})} \cdot \frac{V_{\text{solución reactiva}}}{V_{\text{enzim}} \cdot t_{\text{reacción}}} \cdot \text{Diluc} \cdot$$

M (Xilosa) = 150 g/mol

T_{reacción} = 20 min

8.- Determinación de la actividad de la lipasa y de la fosfolipasa

La actividad de la lipasa se determina mediante el método pH-Stat. Como sustrato se utiliza trioleína. Se prepara una solución de sustrato (30 ml) consistente en 2% peso/volumen de goma arábica, 5% volumen/volumen de sustrato en agua, y se emulsiona con un homogeneizador. A ello se añade 1 ml de solución de enzimas. El ácido liberado en la reacción se retitula con lejía de sosa 0,01 M, a efectos de mantener el pH constante. Se calcula la cantidad de ácido liberado a partir de la cantidad de NaOH, y a continuación la actividad de la enzima. Para la determinación de la autohidrólisis se reemplaza la solución de enzimas con agua destilada. Las mediciones se llevan a cabo a 37°C y a pH 7,5 en cada caso, tres veces. Los valores de actividad obtenidos en U/ml se convierten matemáticamente para la composición total de aceitunas o de componentes de aceitunas y mezcla de enzimas (es decir, la actividad en la mezcla de enzimas ya empleada para la producción de aceite).

La actividad de la fosfolipasa-C se lleva a cabo con p-nitrofenilfosforilcolina como sustancia de ensayo. A 50 μ l de una solución de N-nitrofenilfosforilcolina (100 mM en bórax-HCl 50 mM, pH 7,5), se añaden 50 μ l de solución de enzima. El p-nitrofenol formado por la hidrólisis de p-nitrofenilfosforilcolina, se mide a 410 nm, mediante fotómetro. Como control negativo se reemplaza la solución de enzimas con agua destilada. Para la calibración se aplica una solución fresca de p-nitrofenol (100 mM en Borax-HCl 50 mM, pH = 7,5). Mediante la preparación de diluciones adecuadas y medición de estas soluciones a 410 nm en el fotómetro, es posible preparar una curva de calibración. En cada caso, cada una de las mediciones se lleva a cabo tres veces. Los valores de actividad obtenidos, expresados en U/ml, se convierten por cálculo en equivalente de la mezcla de enzimas. Partiendo de la base de que la p-nitrofenilfosforilcolina no se desdobra por las soluciones de enzimas, no hay ninguna actividad de fosfolipasa-C presente.

A continuación se explica la invención con mayor detalle con la ayuda de los ejemplos siguientes, que no son limitantes.

Ejemplo 1

Ensayo de laboratorio, para explicación

Se introdujeron por pesada aproximadamente 900 g de masa de aceituna previamente desaceitadas (*Olea europea hojiblanca* cv., segunda etapa de madurez), se mezclaron con 50 ml de agua o de solución acuosa de enzimas, y se sometieron a incubación durante 60 min a 40°C en un vaso de vidrio de 2.000 ml bajo agitación con un agitador en espiral (150 rpm). A continuación se llevó a cabo una separación de sólidos-líquidos mediante centrifugación en una copa de acero inoxidable de 500 ml en un centrifugador Heräus de tipo KS IV (2.000 g, 20°C). La separación de líquidos/sólidos tuvo lugar en un embudo de separación a temperatura ambiente durante la noche. Se drenó la fase acuosa, se secó el material desaguado por enjugado, y se determinó gravimétricamente la cantidad de aceite remanente. El rendimiento relativo en aceite mediante adición exclusiva de agua sin mezcla de enzima (muestra de comparación), fue de 0,41% (peso/peso), en el caso de una adición de 10 μ l de una mezcla de enzimas conforme a la invención (fuentes y procedencias de enzimas, como anteriormente indicadas):

ES 2 282 889 T3

	<i>Exo</i> -PGasa:	900 U/ml
	Pectina liasa:	61.400 U/ml
	<i>Endo</i> -PGasa:	5.500 U/ml
5	(ensayo de viscosidad; substrato: pectina)	
	<i>Endo</i> -PGasa:	2.060 U/ml
	(ensayo de viscosidad; substrato: PGA)	
	Pectina esterasa:	340 U/ml
10	Celulasa-C1 (Avicelasa):	2,8 U/mL
	Laminarinasa:	9,3 U/ml
	Xilanasa:	1.820 U/ml

15 el rendimiento fue de 1,11% (peso/peso), o de 270% de la muestra de comparación; para una adición de 50 μ l de la mezcla de enzimas conforme a la invención, el rendimiento fue de 1,14% (peso/peso), o de 278% de la muestra de comparación; para una adición de 100 μ l de la mezcla de enzimas conforme a la invención, el rendimiento fue de 1,26% (peso/peso), o de 307% de la muestra de comparación, y para una adición de 200 μ l de la mezcla de enzimas conforme a la invención, el rendimiento fue de 1,45% (peso/peso), o de 354% de la muestra de comparación.

20 Ejemplo 2

Ensayo de laboratorio, para explicación

25 Se introdujeron por pesada aproximadamente 600 g de masa de aceituna previamente desaceitada (*Olea europea hojiblanca* cv., tercera etapa de madurez), y se sometieron a incubación sin o con solución acuosa de enzimas durante 60 min a 35°C en un recipiente de acero inoxidable bajo agitación con un agitador en espiral (150 rpm). La separación de sólidos-líquidos tuvo lugar mediante centrifugación a 3.500 g durante 60 segundos. El rendimiento en aceite se determinó volumétricamente en una probeta con pie después de una separación de fases de una hora.

30 El rendimiento relativo en aceite sin adición de enzimas (muestra de comparación) fue de $2,5 \pm 0,1\%$ (peso/peso); para una adición de 150 μ l de la mezcla de enzimas conforme a la invención (cfr. lo que precede), el rendimiento relativo fue de $4,0 \pm 0,2\%$ (peso/peso) o de $163,6 \pm 4,2\%$ de la muestra de comparación; para una adición de 250 μ l de la mezcla de enzimas conforme a la invención, el rendimiento relativo fue de $4,3 \pm 0,2\%$ (peso/peso), o de $177,3 \pm 3,9\%$ (peso/peso) de la muestra de comparación; para una adición de 350 μ l de la mezcla de enzimas conforme a la invención, el rendimiento relativo fue de $4,8 \pm 0,1\%$ (peso/peso), o de $195,5 \pm 2,0\%$ de la muestra de comparación; y para una adición de 450 μ l de la mezcla de enzimas conforme a la invención, el rendimiento relativo fue de $4,9 \pm 0,1\%$ (peso/peso) o de $200,0 \pm 2,0\%$ (peso/peso) de la muestra de comparación.

40 Ejemplo 3

Ensayo industrial, Instituto Politécnico, para explicación

Se pesaron 1.500 kg de aceitunas de la especie *Olea europea hojiblanca* cv., segunda etapa de madurez, se los trituro (molino de martillos), y se sometieron a incubación con 1,5% (peso/peso) de talco (22,2 kg) durante 68 min a 28-30°C en un baño de agitación horizontal (Pieralsi). El caudal de la masa era $Q = 1.100$ kg/h. Se aisló el aceite mediante separación de sólidos-líquidos en un decantador horizontal de dos fases (Modelo M-2 de Pieralsi) y separación de líquidos/líquidos en un centrifugador (en cada caso, de manera continua). Se determinaron el contenido de aceite residual y la humedad de la masa de aceitunas desaceitada (Ensayos 2F0498 y 3F0502). Seguidamente se pesaron 1.250 kg de la masa de aceitunas desaceitada del primer paso del proceso. Se sometió la masa a incubación sin adición de aceitunas (muestra de referencia) o con una adición de 150 ml de la mezcla de enzimas conforme a la invención (cfs con lo que precede) por tonelada, pero en ambos casos sin adición ulterior de talco, durante 50 min a 37-40°C (muestra de referencia), o a 39-40°C (muestra tratada con enzimas) en el baño de agitación horizontal. Se aisló el aceite mediante separación de sólidos-líquidos en un decantador horizontal de dos fases (Modelo M-2 de Pieralsi) y separación de líquidos/líquido en un centrifugador (en cada caso, de manera continua). Nuevamente, el caudal de la masa era de $Q = 1.100$ kg/h. Se determinaron el contenido en aceite residual y la humedad en la muestra de referencia (Ensayo 3F0500) y en la muestra tratada (3F0504). Para las fases dobles, véase la descripción.

Se emprendió la determinación del contenido residual en aceite mediante extracción de Soxhlet (Norma Española Unificada, UNE 55030), y la determinación del contenido de humedad se efectuó por secado a 110°C hasta peso constante.

ES 2 282 889 T3

Ensayo 3F0498 (pulpa de aceituna después del primer prensado de la muestra de referencia)

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación estándar
Humedad (peso/peso)	53,35 %	53,34 %	52,93 %	53,21 %	0,24 %
Aceite residual en MS (peso/peso)	7,71 %	7,78 %	7,75 %	7,75 %	0,04 %
Aceite residual en masa sin procesar (peso/peso)	3,59 %	3,63 %	3,65 %	3,62 %	0,03 %

MS = masa seca

Ensayo 3F0500 (pulpa de aceituna después del segundo prensado de la muestra de referencia)

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación estándar
Humedad (peso/peso)	57,84 %	57,75 %	57,92 %	57,84 %	0,09 %
Aceite residual en MS (peso/peso)	5,05 %	5,07 %	4,94 %	5,02 %	0,07 %
Aceite residual en masa sin procesar (peso/peso)	2,13 %	2,14 %	2,08 %	2,12 %	0,03 %

ES 2 282 889 T3

Ensayo 3F0502 (pulpa de aceituna después del primer prensado de la muestra tratada)

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación estándar
Humedad (peso/peso)	53,87 %	53,89 %	52,56 %	53,77 %	0,19 %
Aceite residual en MS (peso/peso)	7,98 %	7,82 %	7,83 %	7,88 %	0,09 %
Aceite residual en masa sin procesar (peso/peso)	3,68 %	3,61 %	3,63 %	3,64 %	0,04 %

Ensayo 3F054 (pulpa de aceituna después del segundo prensado de la muestra tratada)

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desviación estándar
Humedad (peso/peso)	58,01 %	57,89 %	58,16 %	58,03 %	0,14 %
Aceite residual en TM (peso/peso)	4,63 %	4,60 %	4,62 %	4,62 %	0,02 %
Aceite residual en masa bruta (peso/peso)	1,95 %	1,94 %	1,93 %	1,94 %	0,01 %

El rendimiento relativo en aceite, del segundo prensado, resulta del cálculo de la diferencia entre el contenido residual en aceite en la masa bruta después del primer paso y el contenido equivalente residual en aceite después del segundo paso, dividido por el contenido residual de aceite del primer paso.

Para la muestra de referencia 3F0500, esto significa que en relación con la muestra 3F0498 se obtuvo un rendimiento relativo en aceite de $1,50 \pm 0,40\%$; $3,62 \pm 0,03\%$, correspondiente a $41,44\% \pm 1,42\%$ referido a la masa bruta. Referido a la masa seca, resultó un rendimiento relativo en aceite, de $2,73\% \pm 0,08\%$; $7,75\% \pm 0,04\%$, correspondiente a $35,22 \pm 1,21\%$.

ES 2 282 889 T3

Para la muestra 3F0504 tratada con la mezcla de enzimas conforme a la invención, esto significa que en relación con la muestra 2F0502 se logró un rendimiento relativo en aceite de $1,70\% \pm 0,04\%$; $3,64\% \pm 0,04\%$; correspondiente a $46,70\% \pm 1,21\%$, referido a la masa bruta. Referido a la masa seca, resultó un rendimiento relativo en aceite de $3,26\% \pm 0,09\%$; $7,88\% \pm 0,09\%$, correspondiente a $41,37\% \pm 1,62\%$.

En este ensayo, para una adición de 150 ml de la mezcla de enzimas conforme a la invención, y por tonelada de la masa de aceitunas previamente desaceitada, pudo lograrse un rendimiento adicional medio de $17,5\%$, referido a la masa seca.

Ejemplo 4

Ensayo industrial, instalación industrial, "almacenado", para fines de explicación

Un total de 31.000 kg de masa de aceitunas predesaceitadas, obtenida de la especie *Olea europea picual* cv, que había estado almacenada bajo refrigeración durante 24 días al abrigo del aire, se empleó como material de partida para el ensayo descrito a continuación. En un preparado semiparalelo se sometieron en primer lugar a incubación en cada caso 15.500 kg de esta masa de aceitunas, sin o con adición de la mezcla de enzimas conforme a la invención (en total 250 g/t, incorporado en 1,5 l de agua) durante 60 min. a $33-35^{\circ}\text{C}$ en baños de agitación horizontal con dos planos (Pieralisi). El aceite se aisló mediante separación de sólidos/líquidos en un decantador horizontal de dos fases (Modelo SPI7 de Pieralisi, caudal 2.500-2.725 kg/h) y separación de líquidos/líquidos en un centrifugador (Modelo P2000 de Pieralisi) bajo adición de 300 l/h de agua a una temperatura de 38°C . Seguidamente se almacenó el aceite aislado, y se determinó el rendimiento mediante lectura de un indicador de nivel en los recipientes de almacenamiento, en los que una diferencia de nivel de 1 cm correspondía a una cantidad de aceite de 95,26 kg.

Especificaciones

	Humedad (peso/peso)	Aceite (residual) en MS (peso/peso)	Aceite (residual) en la masa bruta (peso/peso)
Masa de partida para referencia	73,58%	12,54%	3,31%
Masa después del proceso de referencia	74,62%	4,69%	1,19%
Masa de partida para el tratamiento	73,14%	12,99%	3,49%
Masa después del proceso con tratamiento de enzimas	75,33%	0,50%	0,12%

	Diferencia de niveles	Cantidad de aceite	Rendimiento relativo
Referencia (sin mezcla de enzimas conforme a la invención)	3,5 cm	333,41 kg	2,15%
Muestra tratada (mezcla de enzimas conforme a la invención)	5,5 cm	523,93 kg	3,38 %

En este ensayo, para una adición de 250 gramos de mezcla de enzimas conforme a la invención por tonelada de aceitunas predeseñadas bajo las condiciones dadas, pudo lograrse un rendimiento del 63%, referido a la masa seca (MS) determinada, en comparación con la muestra de referencia no tratada. El contenido residual, mínimo, de aceite en la masa de aceitunas tratada, hace que sea superflua una elaboración ulterior en un procedimiento químico-extractivo.

Ejemplo 5

Verificación de las relaciones ideales entre las enzimas (para fines de explicación)

En las investigaciones se involucró el producto Olivex® (designado en lo que sigue, como KP1) de la firma Nozymes A/S, DK, obtenible en el comercio. Para los experimentos descritos a continuación se determinaron todas las actividades de las enzimas conforme al procedimiento indicado en el capítulo precedente referido a los métodos. En este caso pudieron determinarse las actividades individuales señaladas en la siguiente tabla:

Actividad de enzima	KP1 (U/ml)
exo-PGasa	1.710
endo-PGasa (*)	2.720
Pectina esterasa	270
Celulasa-C1	4
Laminarinasa	21

(*) Determinado de acuerdo con el capítulo de métodos, con PGA (ácido pectínico) como sustrato

Para las mediciones comparativas se pesaron en cada caso 600 g de masa de aceitunas desaceitada (Olea europea hojiblanca, cv., tercera etapa de madurez) y se la sometió a incubación sin o con solución acuosa de enzimas (150 µl del producto de cooperación, eventualmente más la adición de pectina esterasa) durante 60 min. a 35°C en un recipiente de acero inoxidable bajo agitación con un agitador de espiral 150 rpm). La separación de sólidos y líquidos tuvo lugar mediante centrifugación a 3.500 g durante 60 segundos. El rendimiento en aceite se determinó volumétricamente después de una separación de fases durante una hora en una probeta con pie.

Se ajustaron relaciones diversas entre pectina esterasa y las otras enzimas en los ensayos mediante la adición de cantidades definidas de una pectina esterasa de cáscara de naranja (Sigma/Aldrich, Catálogo No. P5400). Para ello se recogió la enzima liofilizada en un tampón ((NH₄)₂SO₄ 3,2 M y NaCl 0,1 M, pH = 7,0), y se ajustó a una actividad de 75 U/ml. La adición se llevó a cabo en incrementos de en cada caso 7,5 U; se efectuó una determinación doble. Se han resumido los resultados experimentales en la tabla siguiente. El rendimiento en aceite sin ningún tipo de adición de enzima, fue de 14,7% ± 0,6 ml, el rendimiento en aceite bajo adición de 150 µl de la mezcla de enzimas conforme a la invención, fue de 24,5 ± 0,4 ml.

Adición de PEasa [U]	KP1 (adición 150 µl)		
	Rendimiento en aceite 1 [ml]	Rendimiento en aceite 2 [ml]	Valor medio [ml]
0	17,0	17,4	17,2 ± 0,3
50	18,7	17,7	18,2 ± 0,7
100	18,7	20,1	19,4 ± 1,0
150	20,2	20,0	20,1 ± 0,1
200	20,8	21,4	21,1 ± 0,4
250	23,3	22,3	22,8 ± 0,7
300	23,1	22,9	23,0 ± 0,1
350	22,1	22,9	22,5 ± 0,6
400	22,3	21,7	22,0 ± 0,4
450	21,0	22,6	21,8 ± 1,1
500	22,2	21,0	21,6 ± 0,8
550	22,0	21,8	21,9 ± 0,1
600	21,0	21,0	21,0 ± 0,0

En la Figura 1 puede encontrarse una evaluación gráfica de ambos análisis. Es evidente que la modificación de las relaciones entre las actividades de las enzimas mediante la adición de pectina esterasa al producto KP1 conduce a una manifiesta mejoría del rendimiento en aceite.

Las modificaciones entre las relaciones de las actividades, resultantes de la adición de pectina esterasa, han sido representadas en las tablas siguientes. En este caso no se tuvieron en cuenta efectos de volumen. De las tablas se desprende que el ajuste de las relaciones entre las actividades de las enzimas en los intervalos conformes a la intervención está correlacionado con una fuerte elevación de rendimiento en aceite en caso de KP1.

Ajuste de las actividades de enzima KP1

Adición de PEasa [U]	Actividad de PEasa [U]	PEasa: <i>exo</i> -PGasa	PEasa: <i>endo</i> - PGasa
0,0	40,5	0,158	0,099
7,5	48,0	0,187	0,118
15,0	55,5	0,216	0,136

22,5	63,0	0,246	0,154
30,0	70,5	0,275	0,173
37,5	78,0	0,304	0,191
45,0	85,5	0,333	0,210
52,5	93,0	0,363	0,228
60,0	100,5	0,392	0,246
67,5	108,0	0,421	0,265
75,0	115,5	0,450	0,283
82,5	123,0	0,480	0,301
90,0	130,5	0,509	0,320

Los siguientes Ejemplos 6 y 7 se llevaron a cabo para la comprobación de la optimización biotecnológica del proceso en la producción de aceite bajo utilización de la mezcla de enzimas conforme a la invención.

Ejemplo 6

Reducción del contenido de aceite en la descarga acuosa del decantador en función de la temperatura de proceso; aumento del rendimiento en aceite

Desde un piletón de reserva se aportó de manera continua pulpa de aceituna, predesaceitada, a un recipiente de mezclado con varillas de agitación verticales. El rendimiento de este recipiente de mezclado fue de 25 tm/h, con un tiempo medio de permanencia de 60 min. En este caso, se calentó la pulpa a una temperatura de 45°C. Desde este recipiente de mezcla se transportó la pulpa de aceituna a un recipiente de mezclado con varillas de agitación horizontales (de tipo Amasador Peralisi 900 4 piletones). Con un tiempo de permanencia medio de 40 min, el rendimiento de esta unidad de procesamiento fue de 11 t/h. La pulpa de aceituna fue transportada desde este baño horizontal de mezclado hacia dos decantadores de tres fases de Tipo Peralisi Giant 2. Estos decantadores tenían un rendimiento nominal de aproximadamente 7 tm de pulpa de aceite por hora, pero habían sido regulados al flujo de masa preestablecido por el proceso. Los resultados que se describen a continuación provienen del análisis de muestras que se extrajeron del desagüe acuoso (*papilla*) de ambos decantadores.

Para la investigación del efecto de la mezcla de enzimas conforme a la invención de acuerdo con el Ejemplo 1, se añadieron a la pulpa de aceitunas conducida al recipiente horizontal de mezclado, directamente en la abertura de ingreso y a lo largo de un intervalo de tiempo de 12 horas, 80, 160 ó 240 ml/tm de la mezcla de enzimas conforme a la invención de acuerdo con el Ejemplo 1, mediante una bomba. La temperatura del baño era de 45°C, 37°C y 41°C, respectivamente. Las muestras correspondientes para el análisis del funcionamiento de la composición de enzimas conforme a la invención se extrajeron a las 6 h después del inicio de la adición de enzimas, de la *papilla* en los decantadores. A las 6 horas después de la terminación de la adición de enzima se tomaron muestras de comparación en los mismos lugares de extracción. De esta manera fue posible una comparación directa entre los resultados del proceso, con adición de la mezcla de enzimas conforme a la invención, y sin dicha adición.

Durante el análisis de las muestras se determinaron los resultados para los siguientes parámetros: contenido de agua en la papilla, y contenido de aceite en la papilla. Los resultados para la adición de 80, 160 y de 160 ml/tm, de la mezcla de enzimas conforme a la invención se han resumido en las siguientes Tablas 1, 2 y 3.

ES 2 282 889 T3

TABLA 1

Resultados experimentales en caso de adición de 80 ml/tm de la mezcla de enzima conforme a la invención
(T = 45°C)

	Decantador 3			Decantador 4		
	Contenido de agua en la papilla [%] [peso/peso]	Contenido de aceite en la papilla [%] [peso/peso]	Rendimiento en aceite [%] [peso/peso]	Contenido de agua en la papilla [%] [peso/peso]	Contenido de aceite en la papilla [%] [peso/peso]	Rendimiento en aceite [%] [peso/peso]
Con adición de enzima	80,43	1,48	1,59	81,37	2,34	1,49
Sin adición de enzima	79,71	1,82	1,15	79,30	3,27	1,25

TABLA 2

Resultados experimentales en caso de adición de 160 ml/tm de la mezcla de enzima conforme a la invención
(T = 37°C)

	Decantador 3			Decantador 4		
	Contenido de agua en la papilla [%] [peso/peso]	Contenido de aceite en la papilla [%] [peso/peso]	Rendimiento en aceite [%] [peso/peso]	Contenido de agua en la papilla [%] [peso/peso]	Contenido de aceite en la papilla [%] [peso/peso]	Rendimiento en aceite [%] [peso/peso]
Con adición de enzima	82,96	1,16	1,20	83,52	1,50	1,22
Sin adición de enzima	80,72	1,88	0,93	81,56	1,99	1,01

La evaluación adicional de estos datos de análisis arrojó los siguientes resultados:

1.- La adición de 80 ml de la mezcla de enzimas conforme a la invención por tonelada de pulpa de aceitunas bajo las condiciones de proceso dadas (T = 45°C) conduce, en comparación con la pulpa de aceitunas sin tratar, a una elevación del contenido de agua en la papilla, de hasta 2,61%, y a una reducción del contenido de aceite en la papilla, de hasta 28,44%. En este paso del proceso, el rendimiento en aceite subió hasta 38,26%.

2.- La adición de 160 ml de la mezcla de enzimas conforme a la invención por tonelada de pulpa de aceitunas bajo las condiciones de proceso dadas ($T = 37^{\circ}\text{C}$) conduce, en comparación con la pulpa de aceitunas sin tratar, a una elevación del contenido de agua en la papilla, de hasta 2,78%, y a una reducción del contenido de aceite en la papilla, de hasta 38,30%. En este paso del proceso, el rendimiento en aceite subió hasta 29,03%.

Bajo las condiciones dadas, la adición de 160 ml de la mezcla de enzimas conforme a la invención por tonelada de aceitunas, mostró un efecto especialmente ventajoso en cuanto al contenido de agua y de aceite en la papilla, así como en el rendimiento en aceite. También se logró un efecto positivo, referido a los parámetros mencionados, mediante la adición de 80 ml de la mezcla de enzimas conforme a la invención, si bien en este caso se llevó a cabo una elevación de la temperatura de 8°C , en comparación con el ensayo con 160 ml/t.

También puede comprobarse que la adición de 160 ml de la mezcla de enzimas conforme a la invención por tonelada de pulpa de aceitunas a una temperatura de aproximadamente 37°C tiene un efecto especialmente ventajoso sobre la capacidad de separación, así como sobre el rendimiento en aceite en el proceso considerado, pero del análisis de los otros resultados se concluye también que es posible observar otros efectos ventajosos con otras temperaturas y con otras concentraciones de enzimas.

Ejemplo 7

Economía del Proceso Global

Desde un piletón de reserva se aportó de manera continua pulpa de aceitunas, desaceitada de antemano, a un recipiente de mezclado provisto de barras verticales de agitación. El rendimiento de este recipiente de mezclado era de 25 tm/h con un tiempo medio de permanencia de 60 min. Desde este recipiente de mezclado se transportó la pulpa de aceite de manera directa, es decir sin interposición de un recipiente de mezclado con barra horizontal de agitación, hacia decantadores de tres fases (Pieralisi, Tipo Giant 2). Estos decantadores tenían un capacidad nominal de aproximadamente 7 tm de pulpa de aceituna por hora, pero habían sido regulados al flujo de masa prefijado por el proceso. Los resultados que se describen a continuación, provienen del análisis de muestras que se extrajeron directamente de un decantador elegido arbitrariamente. La temperatura de la pulpa de aceituna en el proceso era de 32°C .

Para la investigación de la acción de la mezcla de enzimas conforme a la invención de acuerdo con el Ejemplo 1, se añadió a la pulpa de aceitunas introducida al recipiente de mezclado vertical, directamente en la abertura de entrada a lo largo de un intervalo de tiempo de 12 horas, 160 ó 240 ml/tm, respectivamente, de la mezcla de enzimas conforme a la invención, mediante una bomba. Las muestras correspondientes para el análisis del funcionamiento de la composición de enzimas conforme a la invención a partir de las corrientes de proceso de los decantadores (pulpa de aceitunas, procesada (*Alperujo*), fase acuosa (*papilla*)) se extrajo 6 horas después del inicio de la adición de las enzimas. La cantidad de aceite producida se determinó de manera continua mediante la técnica de medición disponible en el lado de la instalación. Después de 12 h se detuvo la adición de enzimas. A las 6 horas después de terminado la adición de enzimas se extrajeron muestras de comparación de los mismos lugares de extracción. De esta manera fue posible una comparación directa entre los resultados del proceso, con adición o sin adición, de la mezcla de enzimas conforme a la invención.

Durante el análisis se determinaron los resultados para los siguientes parámetros: contenido de agua en el alperujo, contenido de aceite en el alperujo, contenido de agua en la papilla, y contenido de aceite en la papilla. Además, se determinó la eficiencia del proceso, referido al rendimiento en aceite, en el momento de la correspondiente extracción de muestras. En las siguientes Tablas 3 y 4 se han resumido los resultados para la adición de 160 o de 240 ml/tm de la mezcla de enzimas conforme a la invención.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 282 889 T3

TABLA 3

Resultados experimentales en caso de adición de 160 ml/tm de la mezcla de enzimas conforme a la invención

	Contenido de agua en el alperujo [%] [peso/peso]	Contenido de aceite en el alperujo [%] [peso/peso]	Contenido de agua en la papilla [%] [peso/peso]	Contenido de aceite en la papilla [%] [peso/peso]	Rendimiento en aceite [%] [peso/peso]
Con adición de enzimas	63,69	1,34	84,42	1,15	0,88
Sin adición de enzimas	61,10	1,53	83,53	1,26	0,90

TABLA 4

Resultados experimentales en caso de adición de 240 ml/tm de la mezcla de enzimas conforme a la invención

	Contenido de agua en el alperujo [%] [peso/peso]	Contenido de aceite en el alperujo [%] [peso/peso]	Contenido de agua en la papilla [%] [peso/peso]	Contenido de aceite en la papilla [%] [peso/peso]	Rendimiento en aceite [%] [peso/peso]
Con adición de enzimas	58,35	1,31	84,09	1,22	0,85
Sin adición de enzimas	67,73	1,51	83,98	1,27	0,81

ES 2 282 889 T3

La evaluación ulterior de estos datos de análisis aportó los siguientes resultados:

- 5 1.- La adición de 240 ml de la mezcla de enzimas conforme a la invención por tonelada de pulpa de aceitunas bajo las condiciones de proceso dadas, conduce, en comparación con la pulpa de aceitunas sin tratar, a una elevación del contenido de agua en el alperujo, de 4,24%, a una reducción del contenido de aceite en el alperujo de 12,42%, a una elevación del contenido de agua en la papilla, de 1,07%, y a una reducción del contenido de aceite en la papilla, de 8,73%. En este paso del proceso, el rendimiento en aceite cayó en 2,22%.
- 10 2.- La adición de 160 ml de la mezcla de enzimas conforme a la invención por tonelada de pulpa de aceitunas bajo las condiciones de proceso dadas, conduce, en comparación con la pulpa de aceitunas sin tratar, a una reducción del contenido de agua en el alperujo de 13,85%, a una reducción del contenido de aceite en el alperujo de 13,25%, a una elevación del contenido de agua en la papilla de 0,13%, y a una reducción del contenido de aceite en la papilla de 3,94%. En este paso del proceso, el rendimiento en aceite aumentó cayó en 4,94%.
- 15 Bajo las condiciones dadas, la adición de 160 ml de la mezcla de enzimas conforme a la invención por tonelada de aceitunas, muestra una acción especialmente ventajosa con respecto a la economía del conjunto del proceso. Una acción positiva, referida a la economía global del proceso, también se logra mediante la adición de 240 ml de la mezcla de enzimas conforme a la invención, si bien no tan acentuada, como en el caso de la adición de 160 ml.
- 20 Es de especial importancia que estos experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de proceso de 32°C. También en el caso de esta temperatura, comparativamente baja, el empleo de la mezcla de enzimas conforme a la invención tuvo un fuerte efecto positivo sobre la economía del proceso.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de aceite a partir de masas de aceitunas y/o de componentes de aceitunas, que abarca los pasos siguientes:

a.- puesta a disposición de una masa de aceitunas y/o de componentes de aceitunas, sin la separación de los huesos de las aceitunas;

b.- adición de una enzima o de una mezcla de enzimas que contiene por lo menos una pectina esterasa, en forma líquida o sólida;

c.- mezclado conjunto de la masa y de la mezcla de enzimas;

d.- separación de la fase de aceite de la masa, con ayuda de un decantador de tres fases.

2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, que además abarca el siguiente paso: incubación de la mezcla de la reivindicación 1c, en especial a una temperatura entre 20 y 60°C, y en especial durante 5 a 120 min.

3. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, en el que como masa de aceitunas y/o de componentes de aceitunas se emplea una masa previamente desaceitada.

4. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, en el que en por lo menos un paso se aporta en un decantador de tres fases, pulpa de aceitunas desaceitada de antemano sin interposición de un recipiente de mezclado con barras de agitación horizontales (amasador), ni de un recipiente de mezclado con barras de agitación verticales.

5. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, en el que la mezcla de enzimas contiene por lo menos una pectina esterasa, por lo menos una *endo*-poligalacturonasa y por lo menos una *exo*-poligalacturonasa, y en el que la relación entre la actividad de la pectina esterasa y la actividad de la *endo*-poligalacturonasa es preferentemente de por lo menos 0,13, y en el que la relación entre la actividad de la pectina esterasa y la actividad de la *exo*-poligalacturonasa es preferentemente de 0,3.

6. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la relación entre la actividad de la pectina esterasa y la actividad de la *endo*-poligalacturonasa es de por lo menos 0,15, preferentemente de por lo menos 0,16.

7. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la relación entre la actividad de la pectina esterasa y la actividad de la *exo*-poligalacturonasa es de por lo menos 0,33.

8. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque en la mezcla de enzimas conforme a la invención se halla contenida por lo menos una laminarinasa, y porque la relación entre la actividad de la pectina esterasa y la actividad de la laminarinasa es de por lo menos 20, preferentemente de al menos 30.

9. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque en la mezcla de enzimas conforme a la invención se halla contenida por lo menos una celulasa-C1 y porque la relación entre la actividad de la pectina esterasa y la actividad de la celulasa-C1 es de por lo menos 75, preferentemente de por lo menos 100.

10. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque en la mezcla de enzimas conforme a la invención se hallan contenidas las siguientes actividades de enzima:

a.- pectina esterasa: más de 300 U/ml, en especial, más de 320 U/ml;

b.- *exo*-poligalacturonasa: menos de 1.000 U/ml;

c.- *endo*-poligalacturonasa: entre 1.500 y 2.500 U/ml,

d.- laminarinasa: menos de 15 U/ml, en especial menos de 12 U/ml;

e.- celulasa-C1: menos de 3,3 U/ml;

f.- pectina liasa: entre aproximadamente 25.000 y 150.000 U/ml.

11. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque en el mismo, se encuentran contenidos por tonelada de masa, en especial entre 50 y 400 ml, preferentemente entre 100 y 300 ml, de manera especialmente preferida entre 125 y 250 ml de la mezcla de enzimas.

ES 2 282 889 T3

12. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque en la mezcla de enzimas la concentración de proteínas es de entre 2 y 20 mg/ml, preferentemente entre 2 y 12 mg/ml, en especial entre 3 y 10 mg/ml.

5 13. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se trata de un procedimiento para la producción de aceite a partir de masas previamente desaceitadas de aceitunas y/o de componentes de aceitunas.

10 14. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque se trata de un procedimiento físico o mecánico-físico para la producción de aceite.

15 15. Uso de una mezcla de enzimas conforme a una de las reivindicaciones precedentes, definido en un procedimiento conforme a una de las reivindicaciones precedentes para la mejora de la separación entre sólidos y líquidos para la producción de aceite, en especial en el desaceitado de una masa previamente desaceitada de aceitunas o de componentes de aceitunas.

16. Uso conforme a la reivindicación 15, **caracterizado** porque la separación de sólidos/líquidos tiene lugar exclusivamente con ayuda de por lo menos un decantador de tres fases.

20 17. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 15 ó 16, **caracterizado** porque se eleva el rendimiento en aceite en la separación de sólidos/líquidos.

25 18. Uso conforme a una de las reivindicaciones 15 a 17, **caracterizado** porque se reduce el contenido de aceite en la descarga acuosa del decantador de tres fases y/o porque se eleva la cantidad de agua separada en la descarga acuosa.

19. Uso conforme a una de las reivindicaciones 15 a 18, **caracterizado** porque se reduce el contenido en aceite y/o en agua de la fase sólida obtenida con ayuda del decantador de tres fases.

30 20. Uso conforme a una de las reivindicaciones 15 a 19, para poder reducir la temperatura del proceso manteniéndose por lo menos constante el rendimiento en aceite.

35

40

45

50

55

60

65

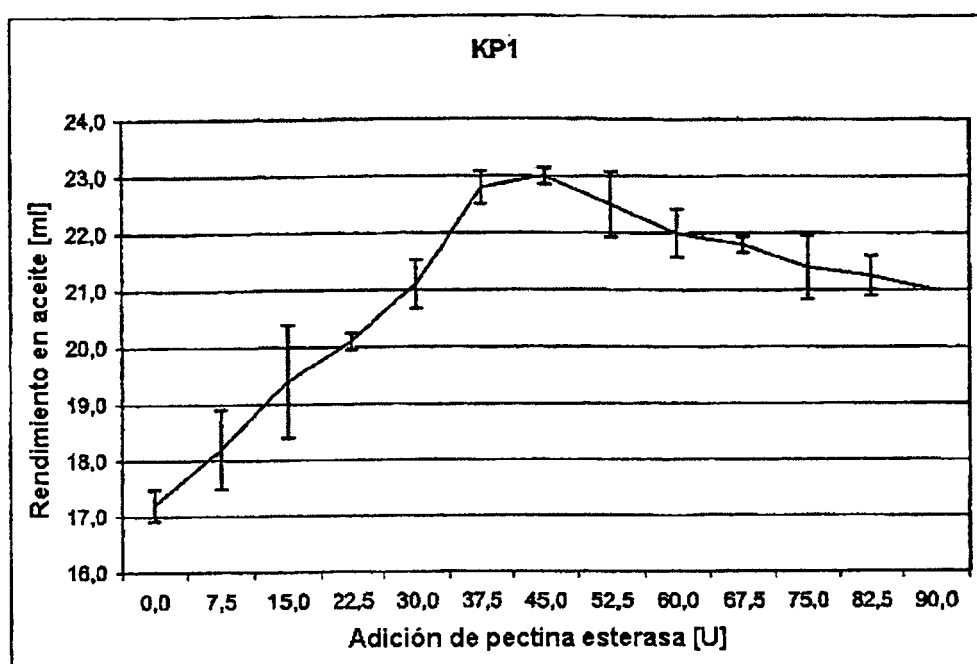


Fig. 1