

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 006**

51 Int. Cl.:

**A23L 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2013 PCT/EP2013/074834**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14083042**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2013 E 13818675 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2925158**

54 Título: **Pasta de oliva y polvo de oliva**

30 Prioridad:

**27.11.2012 DE 102012023136**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.05.2017**

73 Titular/es:

**PUR'OLIV GBR (100.0%)  
Rathausplatz 6  
74177 Bad Friedrichshall, DE**

72 Inventor/es:

**CARLE, REINHOLD;  
KUHN, ROLF y  
RODEMEYER, GÜNTHER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 611 006 T3**

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

Pasta de oliva y polvo de oliva

**Campo técnico**

5 La invención se refiere a un método para fabricar una pasta de oliva o un polvo de oliva que comprende tratar un orujo de oliva con al menos una enzima que reduce la viscosidad del orujo en al menos un factor 2 y tamizar el producto obtenido mediante un tamiz con un tamaño de malla adecuado para eliminar al menos el 98 % en peso de las partículas de hueso de oliva del producto. Se divulga la utilización de la pasta de oliva o del polvo de oliva como alimento, como suplemento alimenticio o como ingrediente para alimentos, particularmente para productos de panadería, cremas para untar o productos de pasta, así como en alimentos para animales.

**Estado de la técnica**

10 El aceite de oliva es un componente principal de la conocida como dieta mediterránea y es valorado por su alto contenido en ácido oleico, que se asocia con la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardíacas. En el año 2010 se produjeron más de 3,2 millones de toneladas de aceite de oliva, principalmente en países bañados por el Mar Mediterráneo, como España, que es el mayor productor. Sin embargo, la fabricación de aceite de oliva trae consigo grandes cantidades de materiales de desecho sólidos y líquidos. La cantidad de materiales de desecho y sus propiedades físico-químicas dependen principalmente del proceso de extracción del aceite utilizado para obtener el aceite de oliva (Vlyssides et al., 1998). Mientras que la extracción del aceite utilizando presas hidrostáticas con pequeñas cantidades de oliva es limitada, los procesos de decantación en dos fases y en tres fases permiten una extracción del aceite continua y posibilitan mejores rendimientos del aceite.

20 Roig et al. (2006) realizaron un compendio de las tecnologías utilizadas en los molinos de aceite de oliva en Europa. En el proceso de decantación en tres fases se obtienen una fracción sólida (orujo) y dos fracciones líquidas (aceite de oliva y el denominado alpechín, es decir, el fluido residual que procede de la adición previa de agua y del agua del fruto). En la tecnología perfeccionada del proceso de decantación en dos fases solo se obtienen dos fracciones: por un lado, el alpeorujo y, por otro lado, el aceite de oliva como fracción líquida.

25 Los fluidos residuales de la oliva que se producen después del prensado tradicional de las olivas trituradas y de la decantación de una emulsión compuesta por agua del fruto y aceite de oliva, así como de la fase líquida (alpechín) que se obtiene de la decantación en tres fases de un macerado de oliva contienen grandes cantidades de materiales orgánicos y compuestos de baja masa molecular que presentan propiedades fitotóxicas y, por ello, se asocian a importantes daños medioambientales. Aunque el proceso de decantación en dos fases se considera respetuoso con el medio ambiente en su conjunto, puesto que no se añade agua, el proceso de secado previo a una segunda extracción del aceite con disolventes orgánicos da lugar a unos costes de producción significativamente altos en comparación con el método de decantación en tres fases.

35 Además de la cara eliminación del agua por evaporación o tratamientos físico-químicos de los materiales de desecho, se propuso la fermentación microbiológica, una digestión anaeróbica para producir biogás, y el compostaje como tratamiento de los residuos (Azabar et al., 2004).

40 Puesto que las fracciones sólidas y líquidas de los residuos de las olivas son ricas en polifenoles con actividad antioxidante se propuso su extracción para distintas aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética (Roig et al., 2006). Además, después de una segunda extracción del aceite y de un secado del orujo de oliva restante, se pueden utilizar para la combustión. Sin embargo, el rendimiento energético absoluto de este proceso es relativamente bajo, puesto que la mayor parte de la energía obtenida mediante la combustión se tiene que utilizar para el secado. Así, este proceso prácticamente no resulta económico.

En US-A-5.801.127 se describe la utilización de un polvo formado por subproductos del aceite de oliva para aplicaciones en pozos petrolíferos.

45 Según KR-A-2002-040930 se muelen las olivas enteras y se mezclan con harina de maíz y almidón, seguidamente se liofilizan y se muelen. De esta forma se obtiene un polvo con propiedades alimenticias.

50 En el último caso nombrado, el producto contiene tanto las partes de las olivas aptas para el consumo (mesocarpio) como las partes de la oliva lignificadas y no aptas para el consumo (endocarpio), particularmente, los huesos de oliva. Por ello, el impedimento principal a la hora de hacer accesible el orujo de oliva al consumo humano se encuentra en la contaminación del orujo con los huesos de oliva molidos y/o las partículas de los huesos de oliva que se producen mediante la molienda de todo el fruto de la oliva (drupa de la oliva) antes de la extracción del aceite por centrifugado o prensado. En este aspecto, la proporción de hueso de oliva en el orujo puede ser de entre el 35 y el 70 %, y depende de la variedad de oliva utilizada.

55 EP 1 658 360 B1 describe un método para obtener aceite de oliva y/o de componentes de oliva, en donde los huesos no se eliminan ni se separan. Las olivas y/o los componentes de las olivas se tratan con una enzima o una mezcla enzimática que contiene al menos una pectinesterasa.

WO 2004/110171 describe un proceso de molienda en el que se obtiene un polvo de oliva secando el material de desecho sólido de las olivas (orujo), en donde un orujo secado se muele, se tamiza y, seguidamente, se muele a bajas temperaturas de menos de 10 °C. Debido a que las partículas tienen un tamaño de menos de 0,65 mm, el polvo de oliva obtenido se considera adecuado para el consumo humano y como producto alimenticio, aunque sigue  
 5 conteniendo una proporción significativa de material de hueso de oliva molido y no apto para el consumo. No obstante, no es suficiente para cumplir los requisitos de un alimento para el consumo humano, puesto que, según Engelen et al. (2006), el límite sensorial de las partículas de los huesos de oliva que pueden ser percibidas por el paladar humano es de 25 µm. Otro problema es que el orujo de oliva secado es muy pegajoso. Por ello, es necesario que la molienda se lleve a cabo bajo enfriamiento criogénico, lo que es relativamente complejo desde un  
 10 punto de vista técnico y va asociado con costes energéticos considerables. Además, el tamizado en seco y la fabricación de un polvo requiere más energía para el secado en vacío (10 mmHg = 1,3 kPa), de forma que este proceso en su conjunto resulta menos adecuado para fabricar mayores cantidades de producto.

Puesto que el método descrito en WO 2004/110171 se propone como adecuado para proporcionar polvos de oliva adecuados para el consumo humano, pero sigue conteniendo una proporción elevada de partículas de hueso de  
 15 oliva, que además se sitúan claramente por encima del tamaño de partícula aceptable a nivel sensorial de 0,025 mm, existe una necesidad de procesos mejorados y perfeccionados con los que sea posible reducir significativamente la cantidad del material del hueso de la oliva no apto para el consumo en el producto y alcanzar un tamaño de partícula de < 0,025 mm en las partículas del resto de hueso de oliva residual. Además, este método se debería poder obtener sin etapas que requieran mucha energía, como por ejemplo un secado en vacío antes del  
 20 tamizado del material secado para eliminar los huesos de las olivas y/o las partículas de los huesos de las olivas y una posterior molienda criogénica para triturar los componentes sin tratar de los huesos de las olivas y, aún así, proporcionar productos con, al menos, propiedades comparables. Ello se debe particularmente al alto consumo de energía de este proceso y al gran incremento de los costes energéticos.

WO 2006/005986 divulga un método para fabricar un polvo de oliva utilizando una etapa de ultrafiltración.

#### 25 **Explicación de la invención**

Según la invención, estas tareas se resuelven mediante un método para fabricar una pasta de oliva o un polvo de oliva que comprende tratar un orujo de oliva con al menos una enzima que reduce la viscosidad del orujo en al menos un factor 2 y tamizar el producto obtenido mediante un tamiz con un tamaño de malla adecuado para eliminar  
 30 al menos el 98 % en peso de las partículas de hueso de oliva del producto. La pasta de oliva obtenida o el polvo de oliva obtenido se encuentran prácticamente exentos de partículas de hueso de oliva, de forma que se garantiza que el producto presente un contenido fiablemente reducido de material de hueso de oliva y se pueda utilizar como alimento, suplemento alimenticio o como ingrediente para un alimento. «Prácticamente exento de partículas de hueso de oliva» significa que se elimina al menos el 98 % en peso de las partículas de hueso de oliva y la proporción  
 35 restante del < 2 % de partículas de hueso de oliva tiene un tamaño de partícula de < 0,4 mm, preferiblemente, de < 0,075 a 0,2 mm, más preferiblemente, de < 0,025 a 0,075 mm, y lo más preferiblemente, de < 0,025 mm. La pasta de oliva obtenida o el polvo de oliva obtenido de esta forma se distinguen por una excelente sensación en la boca cuando se consume directamente o en productos alimenticios, como productos de panadería, cremas para untar o productos de pasta, así como en alimentos para animales.

Las enzimas que reducen la viscosidad del orujo son, por ejemplo las celulasas o las hemicelulasas que comprenden una actividad de degradación de la pectina o enzimas con otras denominaciones que, además de las actividades propias de la celulasa o de la hemicelulasa, presenten propiedades de degradación de la pectina. Estas enzimas son preferibles en el marco de la presente invención. Además de las celulasas o las hemicelulasas, o las enzimas con otras denominaciones que presenten además una actividad propia de la celulasa o de la hemicelulasa, se pueden utilizar pectinasas o enzimas con otras denominaciones (p. ej., poligalacturonasas y pectato liasas,  
 40 también combinadas con pectinmetilesterasas, así como pectinliasas), que presenten una actividad pectinolítica adicional para reducir la viscosidad del orujo. Como parte del tratamiento enzimático se puede llevar a cabo además un desamargado de manera conveniente. Para ello, el orujo se trata con enzimas o formulaciones enzimáticas que presentan actividades secundarias desamargantes, particularmente, con β-glucosidasas y/o esterases.

Además, la presente invención se refiere a una pasta de oliva o a un polvo de oliva que se pueden obtener según este método.  
 50

También se divulga una pasta de oliva o un polvo de oliva que están prácticamente exentos de partículas de hueso de oliva y que presentan un contenido fenólico total (CFT) de al menos 10 mmol de equivalentes de ácido gálico/kg de materia seca (mmol EAG/kg MS).

Además, se divulga la utilización de la pasta de oliva descrita o del polvo de oliva descrito anteriormente como alimento, como suplemento alimenticio o como ingrediente para alimentos, particularmente para productos de panadería, cremas para untar o productos de pasta, así como en alimentos para animales.  
 55

Se deducen otras configuraciones ventajosas de la invención de las reivindicaciones dependientes.

En una forma de realización preferida, el preparado enzimático consiste en una celulasa o una hemicelulasa que comprende actividades enzimáticas de degradación de la pectina o en una mezcla de al menos una celulasa o hemicelulasa con al menos una pectinasa, con lo que la celulosa o la hemicelulosa contenida en el orujo de oliva y las pectinas obtenidas se separan. Las celulosas que se pueden utilizar en el marco de esta invención se pueden obtener, por ejemplo, del hongo *Trichoderma reesei* y se comercializan bajo la denominación Celluclast® 1,5 L, de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). Se pueden obtener pectinasas adecuadas, por ejemplo, del microorganismo *Aspergillus aculeatus* que se distribuyen bajo la denominación Pektinex® Ultra SP-L, de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). Se pueden obtener otras pectinasas adecuadas con las denominaciones Novozym® 33095, de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca), u Oleazym B3, de Erbslöh (Geisenheim, Alemania). Además de su función como pectinasa, estas enzimas presentan una actividad secundaria de hemicelulasa, en donde las actividades pectinolíticas y las actividades (hemi)celulolíticas se deben considerar generalmente complementarias. Para el desamargado simultáneo son adecuadas, por ejemplo, formulaciones enzimáticas como Olivex®, de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca),  $\beta$ -glucosidasa de almendras de Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Alemania), Teazyme C™, de Quest (Birmingham, GB), y Laccase™, de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca).

En el marco de la presente invención, ha resultado ser ventajoso que se incluya, además de la al menos una celulasa o hemicelulasa, al menos una pectinasa en el tratamiento enzimático del orujo. En el marco de la invención, los dos tipos de enzimas nombrados actúan degradando compuestos macromoleculares de la matriz del orujo de oliva, como la celulosa, la hemicelulosa y la pectina, de forma que, seguidamente, puede tener lugar una separación mecánica de los fragmentos de hueso de oliva al pasar la digestión enzimática a través de un tamiz con un tamaño de malla adecuado para eliminar del producto al menos el 98 % en peso de las partículas de hueso de oliva. Mediante el tratamiento con enzimas se disminuye la viscosidad de la masa viscosa de  $> 100$  Pa·s a, preferiblemente,  $< 10$  Pa·s, más preferiblemente, a  $< 5$  Pa·s, y lo más preferiblemente, a  $< 1$  Pa·s. En el marco de esta invención, la viscosidad se determina con un reómetro de Bohlin con geometría de placas paralelas, un diámetro de placa de 40 mm, escala de ajuste de la distancia de 1000, a una temperatura de 25 °C y a una velocidad de cizalla de 10/s. Debido a la elevada viscosidad del orujo, sin un tratamiento enzimático esto no se puede conseguir o solo se puede conseguir con un gasto energético claramente superior además de un rendimiento claramente inferior.

En el marco de la presente invención, el tratamiento del orujo de oliva con al menos una enzima provoca la reducción de la viscosidad de la materia prima en al menos un factor 2, preferentemente, en al menos un factor 5, más preferentemente, en al menos un factor 10, y lo más preferentemente, en al menos un factor 50.

En el marco de la presente invención se prefiere además que el orujo de oliva sea sometido al tratamiento enzimático a una temperatura en el intervalo de 15 a 80 °C, preferiblemente de 20 a 60 °C y más preferiblemente de 40 a 60 °C. En la determinación del intervalo de temperatura óptimo se tiene que considerar, junto con estos datos concretos, la temperatura de actividad óptima de las enzimas empleadas.

Además, es preferible que el orujo de oliva se trate con la al menos una enzima durante un periodo en el intervalo de 0,5 a 5 horas, y preferiblemente, en el intervalo de 1 a 2 horas. En el marco de la presente invención se ha constatado que el periodo del tratamiento enzimático ejerce una influencia significativa en la reducción de la viscosidad del producto. Así, se encuentra que, en un tratamiento de más de 5 horas, si bien se sigue reduciendo la viscosidad del orujo tratado, también tiene lugar una oxidación polifenólica que provoca una pérdida del efecto funcional de estas sustancias. Así pues, en el marco de la presente invención se ha constatado que particularmente un periodo de 1 a 2 horas ofrece una relación óptima entre la reducción de la viscosidad y el alcance de la oxidación polifenólica.

En el marco de la presente invención también se ha constatado que se pueden lograr resultados ventajosos utilizando enzimas en una concentración de 500 a 4000 ppm, preferiblemente, de 700 a 3500 ppm, y lo más preferiblemente, de aproximadamente 1000 ppm en base al peso del orujo de oliva. Añadiendo menos de 500 ppm no es posible aumentar significativamente el rendimiento en polifenoles frente al rendimiento sin enzimas. La reducción de la viscosidad es muy lenta cuando se realizan adiciones de enzimas muy bajas, de forma que aparece una oxidación fenólica muy elevada hasta alcanzar una viscosidad adecuada para el tamizado. Por otro lado, las concentraciones enzimáticas de más de 2500 ppm frente a una adición de aproximadamente 1000 ppm no provocan un aumento significativo del rendimiento en polifenoles que pueda compensar los costes de la enzima adicional. En el marco de la presente invención, la concentración enzimática óptima ha resultado ser una concentración de aproximadamente 1000 ppm.

La materia prima a la que se puede recurrir en el marco de la presente invención para fabricar los productos de oliva correspondientes son distintos tipos de orujos obtenidos del prensado del aceite de oliva (orujo) o que se generan como materiales de desecho sólidos del proceso de decantación en tres fases (orujo y alpeorujo). La humedad de esta materia prima puede situarse en el intervalo de 50 a 80 % en peso, preferiblemente, en el intervalo de 60 a 75 % y, lo más preferiblemente, en el intervalo de 64 a 70 % en peso. La humedad anterior (el contenido en agua) se determina gravimétricamente como la pérdida después del secado de una muestra de 3 g utilizando un analizador automático de humedad por infrarrojos.

Preferiblemente, el contenido de grasa de la materia prima se sitúa en el intervalo de 3 a 20 % en peso. En el marco de la presente invención, este contenido de grasa se determina gravimétricamente según la extracción Soxhlet de los componentes lipofílicos de las muestras utilizando hexano, como se describe en Matissek & Steiner (2006).

5 En el marco de la presente invención se ha constatado que el orujo de oliva utilizado como materia prima es preferiblemente el producto de un proceso de decantación en dos fases. En comparación con los orujos del proceso de decantación en tres fases, con esta materia prima se obtuvieron sustancialmente mayores cantidades de polifenoles. Ello se debe a la menor lixiviación del orujo del proceso de decantación en dos fases.

10 En el marco del método descrito en este documento, también resulta conveniente que el contenido de agua del orujo de oliva se ajuste antes de tratamiento enzimático a entre el 10 y el 35 %, preferiblemente entre el 20 y el 30 %, en base al peso seco del orujo de oliva.

15 Además resulta ventajoso que la pasta de oliva que se obtiene después del tratamiento enzimático, en el marco de la presente invención, sea pasteurizada o esterilizada. Para la pasteurización se puede añadir primero, al producto sin tratar, un ácido, de forma particularmente preferible, ácido acético o vinagre, o un ácido seleccionado de ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico y ácido tartárico o una mezcla de estos. A continuación, el producto se pasteuriza a elevada temperatura, preferiblemente a más de 80 °C y en particular a aproximadamente 90 °C. Esto se puede realizar en un autoclave, de forma especialmente preferida en un autoclave giratorio, o también continuamente, por ejemplo en un pasteurizador tubular. Alternativamente la acidificación puede realizarse también por acidificación biológica, por ejemplo, por fermentación láctica de la pasta de oliva con o sin la adición de cultivos iniciadores, como por ejemplo bacterias del género *Lactobacillus*, para ajustarlo a un pH < 4,5 antes de la pasteurización.

20 No es esencial para la presente invención que la pasteurización se lleve a cabo directamente después del tratamiento enzimático, o sólo después del tamizado por un tamiz con un tamaño de malla adecuado para eliminar del producto al menos el 98 % en peso de las partículas de hueso de oliva, prefiriéndose una pasteurización después del tamizado, ya que en este caso hay menos partículas de hueso de oliva y, por lo tanto, la masa que calentar es menor que antes de la eliminación de las partículas de hueso de oliva. De este modo, también se necesita menos energía.

El experto en la materia deducirá que la cantidad del material de hueso de oliva retenido por el tamiz depende significativamente de su tamaño de partícula. Por lo tanto en la realización de la presente invención, el tamaño de malla del tamiz es tal que elimine al menos el 98 % en peso, preferiblemente al menos el 99% en peso y especialmente preferible al menos el 99,9 % en peso de material de hueso de oliva.

30 Como materia prima se utiliza un orujo de oliva comercial, por lo que el tamaño de malla del tamiz es preferiblemente de unos 0,4 mm o menos, más preferiblemente de unos 0,2 a 0,075 mm, más preferiblemente de unos 0,075 a 0,025 mm, y con mayor preferencia de 0,025 mm.

35 Alternativamente, el producto también puede esterilizarse después del tratamiento enzimático, lo cual se puede llevar a cabo de manera adecuada sin acidificación previa por calentamiento en un autoclave giratorio. Incluso con una esterilización se prefiere, por las razones descritas anteriormente, que esta se realice después del tamizado. En principio, también es posible realizar una esterilización antes del tamizado.

40 Para la fabricación de un polvo de oliva, el producto obtenido después del tamizado se puede secar. Preferiblemente, el secado se realiza a una temperatura en el intervalo de 40 a 100 °C, particularmente a una temperatura en el intervalo de 50 a 80 °C y de forma especialmente preferida a una temperatura de 60 °C. El secado se realiza, preferiblemente, durante un espacio de tiempo hasta que el producto esté esencialmente seco, es decir, en el marco de la presente invención, preferiblemente durante un período de tiempo en el intervalo de 30 minutos a 24 horas y preferiblemente de 2 a 8 h. El secado se realiza, preferiblemente, en un secador de aire circulante o por secado por pulverización.

45 Para que un producto pueda tener una distribución del tamaño de partícula mejor, también puede ser conveniente someter el producto obtenido después del secado a un proceso posterior de molienda.

50 Con el método descrito anteriormente, es posible obtener pastas o polvo de oliva como parte de un método barato con poco gasto en equipos. Como resultado, en el marco de la presente invención, se prefiere que el método no tenga ninguna etapa cara o que requiera un alto consumo de energía. En particular, el método de la invención no tiene, preferiblemente, ninguna etapa en la que se realice una molienda a temperaturas de menos de 23 °C (molienda criogénica) ni ninguna etapa de secado al vacío.

55 La pasta de oliva o el polvo de oliva están sustancialmente exentos de partículas de hueso de oliva que tengan un tamaño de partícula de más de 0,40 mm, preferiblemente de más de 0,075-0,2 mm, más preferiblemente de más de 0,025 hasta 0,075 mm, y lo más preferiblemente de más de 0,025 mm y tiene un contenido fenólico total (CFT) de al menos 10 mmol de equivalentes de ácido gálico/kg de materia seca (mmol EAG/kg MS), preferiblemente al menos 50 mmol EAG/kg MS, incluso más preferiblemente al menos 80 mmol EAG/kg MS y más preferiblemente de al menos 90 mmol EAG/kg MS. Además, esta pasta de oliva se caracteriza, preferiblemente, por un potencial antioxidante, determinado según el ensayo de capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC) de al menos

10 mmol de equivalentes Trolox por kg de materia seca (mmol ET/kg MS), preferiblemente al menos 40 mmol ET/kg MS y más preferentemente al menos 60 mmol ET/kg MS. Aún así, es preferible que la pasta de oliva o el polvo de oliva contengan menos del 2 % en peso, de forma especialmente preferible menos del 1 % en peso, incluso con mayor preferencia menos del 0,1 % en peso de partículas de hueso de oliva, en base al peso seco de la pasta de  
 5 oliva o del polvo de oliva. Lo más preferible es que la pasta de oliva o el polvo de oliva no contengan cantidades detectables de partículas de hueso de oliva.

Se divulga la utilización de una pasta de oliva o polvo de oliva desamargados, como se ha descrito anteriormente, como alimento, como suplemento alimenticio o como ingrediente para alimentos, particularmente para productos de panadería, cremas para untar o productos de pasta, así como en alimentos para animales. En una realización  
 10 particularmente preferida, la utilización es para la inhibición o supresión del crecimiento de bacterias y hongos (Faiza et al (2011)), para que la pasta de oliva o el polvo de oliva puedan usarse en cantidades correspondientes como ingrediente.

#### Literatura:

15 Azabar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglu, A., Sengul, F. & Ozer, A. (2004) Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 34, 209-247.

Benzie I. F.F. & Strain, J.J. (1996) Analytical Biochemistry, 239, 70-76.

Engelen, L., de Wijk, R. A., van der Bilt, A., Prinz, J. F., Janssen, A. M., & Bosmann, F. (2005) Relating particles and texture perception, Physiology & Behaviour, 86, 111-117

20 FAIZA; I; Wahibi; K., Nassira, G., Chahrazed, B. & Atik, B.F. (2011) Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 1, 69-73.

Huang, D., Boxin, O.U. & Prior, R.L. (2005) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1841-1856.

Matissek, R. & Steiner, G. (2006) Lebensmittelanalytik, 3. Aufl., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, S. 28-30

Roig, A., Cayuela, M.L. & Sánchez-Monedero, M.A. (1998) Waste Management, 26, 960-969.

25 Sánchez-Moreno, C. (2002) Food Science and Technology International, 8, 121-137.

Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. (1998) Methods in Enzymology, 299, 152-178.

van den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., van den Berg, H. & Bast, A. (1999), Food Chemistry, 66, 511-517.

Vlyssides, A. G. Loizidou, M. Gimouhopoulos, K. & Zorpas, A. (1998) Fresenius Environmental Bulletin, 7, 308-313.

30 A continuación se ilustra con mayor detalle la presente invención mediante unos ejemplos que no están destinados a afectar el alcance de la protección.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1:

35 Como materia prima, se utilizan dos orujos de oliva diferentes, de los que el primero se obtiene de olivas de la variedad Sevilla y el segundo de olivas de la variedad Grossetto. El orujo obtenido de olivas Sevilla fue el producto de un proceso de decantación en dos fases, mientras que el orujo obtenido de olivas Grossetto es el producto de un proceso de decantación en tres fases. Todo el orujo se trató como sigue:

40 En primer lugar, se ajustó el contenido de humedad de 1.000 g de orujo de oliva hasta aproximadamente el 25 % (orujo de oliva Sevilla) o el 30% (orujo de oliva Grossetto). A continuación, se añadieron 1.000 ppm de una mezcla al 1:1 de Celluclast®, 1,5 L, y Novozym® 33095 y la mezcla se trató durante 2 horas a 40 °C con las enzimas. Posteriormente, la mezcla se pasteurizó a 90 °C durante 5 minutos.

45 El producto obtenido se tamizó a través de un tamiz con un tamaño de malla de 0,025 mm, de lo que se obtuvieron 770 g de una pasta de oliva. Una parte de la pasta de oliva obtenida se calentó a continuación y se secó con un horno de aire circulante durante 3 a 4 horas a 60 °C. Posteriormente, el producto obtenido se molió, obteniéndose unos 130 g (en base a 770 g de pasta de aceitunas) del producto final.

50 Se analizó el contenido de fragmentos de hueso de oliva de los productos obtenidos. El tamaño de partícula se determinó mediante inspección microscópica mediante sondas teñidas con floroglucinol/HCl (3 mg, disuelto en una gota de agua), con las que los componentes de hueso de oliva se tiñeron de color rojo en el producto. Para ello se utilizó una solución de tinción con floroglucinol recién preparada, compuesta de etanol al 16 %, HCl al 10 % (v/v, respectivamente) y 20 mg/ml de floroglucinol. Como parte de la inspección visual de los fragmentos de hueso de oliva no se pudieron detectar fragmentos de hueso de oliva con un tamaño de partícula superior a 0,025 mm en ninguna muestra después del tamizado.

55 Además, las pastas y los polvos de oliva obtenidos se analizaron para determinar su contenido fenólico total. Para ello se utilizó el ensayo de Folin-Ciocalteu siguiendo el procedimiento de Singleton et al. (1998). Para la determinación fotométrica del potencial antioxidante se utilizaron el ensayo FRAP y el ensayo TEAC. El ensayo FRAP se basa en la reducción de un complejo de Fe<sup>3+</sup>-TPTZ-(2,4,6-tris[2-piridil]-s-triazina) en un medio ácido en un complejo de Fe<sup>2+</sup>. Para ello, los antioxidantes contenidos en la sonda actúan como agente reductor. El complejo

resultante es azul y presenta un máximo de absorción de 593 nm. El ensayo se realizó como se describe en Benzie & Strain (1996).

- 5 El ensayo TEAC se basa en la capacidad de neutralizar un ión radical ABTS<sup>•+</sup>-(2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato]) verde, lo que produjo una disminución en la absorción de 734 nm. El ión radical se forma en el intervalo neutro de iones ABTS<sup>2-</sup> en presencia de los antioxidantes que analizar (Sánchez-Moreno, 2002; Huang et al., 2005). El ensayo TEAC se llevó a cabo como se describe en van den Berg et al. (1999).

Los resultados de estas determinaciones se muestran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1:

		Folin-Ciocalteu [mmol EAG/kg MS]	FRAP [mmol ET/kg MS]	TEAC [mmol ET/kg MS]
Sevilla	orujo	62,1 ± 1,6	45,7 ± 0,8	140,5 ± 2,6
	pasta	91,8 ± 5,6	67,4 ± 0,8	202,5 ± 19,9
	contenido de hueso de oliva	11,9 ± 0,6	14,0 ± 0,6	28,9 ± 2,0
	polvo	98,6 ± 9,0	61,1 ± 1,2	195,0 ± 7,0
Grosseto	orujo	3,1 ± 0,4	3,5 ± 0,3	3,1 ± 0,9
	pasta	13,8 ± 2,2	12,9 ± 0,6	17,2 ± 2,1
	contenido de hueso de oliva	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,2	0,6 ± 0,5
	polvo	10,3 ± 2,9	9,6 ± 1,5	13,8 ± 3,0

- 10 Se ha constatado que el contenido fenólico total de las materias primas que son adecuadas para un método según la presente invención varía en el intervalo de 3 a 65 mmol equivalentes de ácido gálico/kg MS, mientras que el contenido fenólico total de la pasta de oliva y el polvo de oliva que se obtiene después de la eliminación de los fragmentos de hueso de oliva es significativamente superior, encontrándose en el intervalo de 10 a 100 mmol para la pasta de oliva y en el intervalo de 10 a 150 mmol para el polvo.
- 15 Las actividades antioxidantes de las materias primas, que se determinaron mediante el ensayo FRAP y el ensayo TEAC se situaron en el intervalo de 3 a 60 equivalentes Trolox (ET)/kg de materia seca (MS) o de 1 a 150 mmol de equivalentes Trolox/kg de materia seca. Después de la separación de los fragmentos de hueso de oliva según la invención, las actividades antioxidantes fueron significativamente superiores, es decir, entre 10 y 80 ET/kg MS para la pasta de aceitunas y entre 20 y 250 ET/kg MS, dependiendo de si se utilizó el ensayo FRAP o el ensayo TEAC para la determinación. Se muestran estos mismos intervalos para el polvo después de secar las pastas de oliva.
- 20 También se ha encontrado que el contenido fenólico total y el potencial antioxidante de la pasta de oliva y el polvo de oliva obtenidos dependen en gran medida de si las materias primas se obtuvieron mediante el proceso en dos fases o en tres fases. Se constataron, en todos los casos, actividades y contenidos fenólicos en los orujos obtenidos por el proceso en dos fases sustancialmente superiores que los orujos correspondientes obtenidos por un proceso en tres fases.
- 25

### Ejemplo 2

- 30 Como materia prima se utilizó el orujo de olivas Sevilla del Ejemplo 1. Se ajustó el contenido de humedad de este orujo al 25 % y se trató con diferentes enzimas y mezclas de enzimas durante un periodo de 2 h a 40 °C. La cantidad de enzima/mezcla de enzimas añadidas llegó a 2500 ppm en todos los casos. El producto resultante se pasó por un tamiz de malla de 0,025 mm y se pesó la cantidad de producto obtenido. Los resultados de esta prueba se muestran en la siguiente Tabla 2. Para su comparación, se utilizó un orujo de oliva Sevilla sin tratar.

Tabla 2

orujo	preparado enzimático	Rendimiento de materia seca exenta de hueso [%]
Sevilla (sin tratar)	-	68,6 ± 0,1
Sevilla	Novozym <sup>®</sup> 33095	82,6 ± 0,5
Sevilla	Oleazym P3	84,4 ± 0,4
Sevilla	Pectinex <sup>®</sup> Ultra SP-L	81,3 ± 0,4
Sevilla	Celluclast <sup>®</sup> 1,5 L+ Novozym <sup>®</sup> 33095	88,2 ± 0,1

Se constató que con todas las enzimas se puede aumentar significativamente el rendimiento de la materia seca exenta de huesos en comparación con el orujo sin tratar. Utilizando una mezcla de Celluclast® 1,5 L y Novozym® 33095 (1: 1) se consiguió, además, el mayor rendimiento.

### Ejemplo 3

- 5 Se ajustó el contenido de humedad de 2500 g de orujo de oliva (obtenido de olivas Sevilla), producido por un proceso de decantación en dos fases, al 25 % y, a continuación, se trató con 500 ppm de Novozym® 33095 (Novozyme, Bagsvaerd, Dinamarca), 500 ppm de Celluclast® 1,5 L (Novozyme, Bagsvaerd, Dinamarca) y 100 ppm de  $\beta$ -glucosidasa de almendras (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) durante 5 horas a 40 °C con agitación (30 rpm). A continuación, se pasó el orujo de oliva por un tamiz con un tamaño de malla de 0,025 mm. Se inactivaron las enzimas añadidas por pasteurización durante 5 min a 90 °C. Se cuantificó el efecto de desamargado mediante la comparación de las áreas de señales relativas de los productos de degradación liberados de la oleuropeína, el hidroxitirosol (HT), y ácido cafeico (AC) en un control no tratado (sin adición de enzima), una muestra de referencia (de Dorridge Solihull, GB), que se trató por el método de WO 2004/110171 y una muestra según la invención. El método según la invención mostró, en comparación con la muestra de referencia y de control, un efecto de desamargado superior, que fue confirmado por evaluación sensorial ("panel de evaluación sensorial").

Tabla 3

	HT	AC
Control	2080	1090
Muestra de referencia	4070	200
Muestra desamargada	11500	4100

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para fabricar una pasta de oliva o polvos de oliva que están esencialmente exentos de partículas de hueso de oliva, que comprende:
- 5       – tratar el orujo de oliva con al menos una enzima que reduce la viscosidad del orujo de oliva en al menos un factor de 2, y
- pasar el producto resultante por un tamiz con un tamaño de malla adecuado para eliminar, al menos, el 98 % en peso de las partículas de hueso de oliva del producto.
- 10   2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la al menos una enzima comprende una celulasa o una hemicelulasa con actividad de degradación de la pectina o una mezcla de al menos una celulasa o una hemicelulasa y al menos una pectinasa.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque**, como parte del tratamiento con enzimas, se usan enzimas adicionales que tienen actividades desamargantes, preferiblemente  $\beta$ -glucosidasas y/o esterases.
- 15   4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el orujo de oliva es sometido al tratamiento enzimático a una temperatura en el intervalo de 15 a 80 °C, preferiblemente de 20 a 60 °C y particularmente de 40 a 60 °C.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el orujo de oliva es tratado con la al menos una enzima durante un periodo de 0,5 a 5 horas, preferiblemente de 1 a 2 horas.
- 20   6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la al menos una enzima se añade al orujo de oliva en una concentración de 500 a 4000 ppm, preferiblemente 700 a 2500 ppm y más preferiblemente de aproximadamente 1000 ppm.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el orujo de oliva usado es preferiblemente el producto de un proceso de decantación de dos fases.
- 25   8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el contenido de agua del orujo de oliva antes del tratamiento enzimático se ajusta a entre el 10 y el 35 %, preferiblemente entre el 20 y el 30 %, basado en el peso en seco del orujo de oliva.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la pasta de oliva se pasteuriza o esteriliza después del tratamiento enzimático.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el producto se seca después del tamizado, preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 40 a 100 °C.
- 30   11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el producto se seca en un secador de aire circulante o mediante secado por pulverización.
12. Procedimiento según las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizado porque** el producto secado se muele si es necesario.