



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en

Ciencia y Tecnología de los alimentos

Uso de enzimas como coadyuvantes en la extracción de aceite de oliva

Enzymes as adjuvants in olive oil extraction

Autor/es

Alejandro Zabal Gemas

Director/es

Ana Cristina Sánchez Gimeno

Facultad de Veterinaria

2021

INDICE

Agradecimientos.....	2
1. Resumen.....	3
Abstract.....	4
2. Introducción.....	5
2.1. Procesado del aceite de oliva.....	5
2.2. Calidad del aceite de oliva.....	8
3. Objetivos y justificación.....	12
4. Materiales y métodos.....	13
4.1 Materiales.....	13
4.1.1 Materia prima.....	13
4.1.2 Enzimas.....	14
4.2 Métodos.....	15
4.2.1 Revisión bibliográfica.....	15
4.2.2 Ensayo experimental.....	16
4.2.2.1 <i>Diseño experimental</i>	16
4.2.2.2 <i>Extracción de aceite de oliva</i>	17
4.2.2.3 <i>Determinación del rendimiento graso sobre materia húmeda</i>	18
4.2.2.4 <i>Determinación de la materia seca</i>	19
4.2.2.5 <i>Determinación del rendimiento graso sobre materia seca mediante el método Soxhlet</i>	20
4.2.2.6 <i>Determinación del contenido graso y humedad mediante el método NIR</i>	21
5. Resultados y discusión.....	22
5.1 Revisión bibliográfica.....	22
5.2 Ensayo experimental.....	30
6. Conclusiones.....	37
English conclusion.....	38
7. Aportaciones de la asignatura.....	39
8. Evaluación y sugerencias de mejora de la asignatura.....	39
9. Bibliografía.....	40

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi tutora, Cristina Sánchez, la realización del presente Trabajo Fin de Grado, por el seguimiento y la ayuda con la redacción y con el ensayo experimental, tanto por la planificación del mismo como por la asistencia a la hora de realizar las extracciones de aceite de oliva.

Por otro lado, me gustaría agradecer a Ana y Antonio, quienes trabajan como técnicos en la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria, por su colaboración y ayuda con el método Soxhlet.

Por último, querría agradecer a la empresa 3G-Since 2000 S.L. y a la empresa Agrinarsa por el suministro de los enzimas y las aceitunas que permitieron llevar a cabo el ensayo experimental.

1. Resumen

En la actualidad, los únicos coadyuvantes autorizados en España para la extracción de aceite de oliva son el microtalco y las arcillas caoliníticas. El uso de enzimas que rompen la estructura vegetal facilitando la extracción de aceite y, mejorando el rendimiento de la extracción se está investigando. Por ello resulta necesario realizar una revisión bibliográfica para conocer el efecto tanto en la extracción, como en la calidad de los aceites, así como comprobar en la práctica estos aspectos.

El objetivo de este trabajo fue conocer la influencia de la aplicación de los enzimas pectolíticos y celulósicos en el proceso de obtención de aceite de oliva.

Para ello, se realizó una revisión bibliográfica con el fin de obtener información del efecto en el rendimiento de extracción, en la calidad y la situación actual de estos enzimas.

En cuanto al ensayo experimental, se analizó el efecto en el rendimiento de extracción de aceites de oliva al incorporar enzimas pectolíticos y celulósicos a diferentes concentraciones frente a controles con ausencia de enzima. Se realizaron extracciones de aceite con un equipo Abencor y determinaciones de humedad y grasa con una estufa y un equipo Soxhlet, respectivamente. Además, se determinó el rendimiento industrial o rendimiento graso sobre materia húmeda.

Con todo ello se comprobó que el uso de enzimas pectolíticos y celulósicos como coadyuvante de extracción de aceite de oliva incrementa los rendimientos de extracción. Por otra parte, los aceites obtenidos al añadir una mezcla de enzimas hidrolíticos aumentan la calidad, tanto nutricional como organoléptica. En algunos casos se observa una disminución del % de acidez y del índice de peróxidos y un aumento en el contenido de compuestos fenólicos, en la estabilidad oxidativa y de los atributos sensoriales picantes o afrutados. También se observó un aumento del rendimiento de extracción en el ensayo experimental.

Abstract

Currently, the unique adjuvants authorized in Spain for the olive oil extraction are microtalc and kaolinitic clays. The use of enzymes that break the fruit structure easing the oil extraction and improving the extraction yield is being investigated. For this reason, it is necessary to carry out a bibliographic review to know the effect in the extraction and quality of oil, as well as to verify these aspects in practice.

The objective of this work was to know the influence of the application of pectolytic and cellulosic enzymes in the process of olive oil extraction.

A bibliographic review was carried out in order to obtain information of the effect on the extraction yield, the quality and the current situation of these enzymes.

Moreover, in the experimental test the effect on the olive oil extraction was analyzed by adding pectolytic and cellulosic enzymes at different concentrations compared to controls with no enzyme. Oil extractions were carried out with Abencor equipment, moisture and fat content which were determined with a stove and Soxhlet equipment, respectively. In addition, the industrial yield or fat yield on wet matter was determined.

In brief, it was found that the use of pectolytic and cellulosic enzymes as adjuvants in olive oil extraction increase the extraction yield. On the other hand, the oils obtained by adding a mixture of hydrolytic enzymes increase the quality, both nutritional and organoleptic. In some scientific publication, a decrease in the % of acidity and peroxide index and an increase in the content of phenolic compounds, oxidative stability and spicy or fruity sensory attributes are observed. An increase in extraction yield was observed in the experimental test too.

2. Introducción

La aceituna es una drupa, un fruto con pulpa carnosa y un único hueso. Su estructura está formada por tres tejidos: epicarpio (piel), mesocarpio (pulpa) y endocarpio (pared del hueso). En el mesocarpio se encuentran las vacuolas, donde se almacena más del 90 % del aceite total del fruto en forma de gotas de diferente tamaño. La semilla y el hueso también contienen aceite.

Respecto a la composición de la aceituna, principalmente contiene un 40-50% de agua, un 25-35% de extracto seco (proteína e hidratos de carbono) y un 15-25 % de aceite.

Las aceitunas son recolectadas del olivo (*Olea europae*) y el aceite resultante tras la extracción difiere debido a sus características dando aceites de oliva de mayor o menor calidad, los cuales se engloban en diferentes categorías comerciales y deben cumplir unos estrictos parámetros.

El aceite de oliva es en estricto el zumo de la aceituna, poseedor de una gran calidad nutritiva, organoléptica y comercial y verdadero protagonista de la dieta mediterránea (Benito, Oria y Sánchez-Gimeno, 2009).

El aceite de oliva virgen es el obtenido a partir de la aceituna exclusivamente por procedimientos mecánicos en condiciones térmicas que no produzcan la alteración del aceite, que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado (Aparicio y Harwood, 2003). Además, el aceite de oliva de mayor calidad es el virgen extra: este debe cumplir con unas características químicas y sensoriales estrictas, las cuales definen la calidad del producto. La composición química del aceite aporta un alto valor nutritivo, principalmente por ser una fuente saludable de ácidos grasos monoinsaturados y antioxidantes, como los compuestos fenólicos, vitamina E (α -tocoferol) y carotenoides (Fitó, 2008).

2.1. Procesado del aceite de oliva

En la actualidad, la extracción del aceite de oliva se realiza mediante un procesado continuo en una almazara. En estas instalaciones hay una zona sucia, en donde se reciben las aceitunas y se realizan las operaciones preliminares y una zona limpia, en la cual se elabora

el aceite y se almacena.

Inicialmente, las aceitunas son descargadas en una tolva de recepción de acero inoxidable. Tras ello, se realiza una limpieza de las mismas (deshojado, despallado y lavado) en la cual se quitan las hojas, ramas, piedras, tierra y cualquier objeto extraño presente; seguidamente se clasifican según la variedad, procedencia, estado sanitario, momento de maduración y se realiza un pesaje de la materia prima. Con objeto de caracterizar el producto, se aprovecha este momento para realizar la toma de muestras para el posterior análisis físico-químico (humedad, aceite, rendimiento y acidez). La materia prima es almacenada y procesada en menos de 24 – 48 horas en un depósito pulmón (Figura 1).

Para conseguir la extracción del aceite es necesaria la molienda del fruto. La pasta de la aceituna se obtiene tras dicha etapa, cuyo objetivo es romper la estructura de las aceitunas usando molinos mecánicos (de distintos tipos: de martillos, de discos dentados, de cilindros estriados). La molturación de la aceituna favorece la rotura celular y la salida de la grasa de las vacuolas del mesocarpio.

Tras la molienda se realiza el batido de la pasta de aceituna molida. Esta etapa se realiza en una termobatidora que funciona aproximadamente a 20-30 rpm (velocidad de agitación de las paletas) y con un binomio de temperatura/tiempo determinado (20-40 °C / 1-2 horas). Este binomio se caracteriza por ser el factor de mayor importancia de calidad y rendimiento del aceite de oliva. En la industria oleica se utilizan batidoras de uno o dos cuerpos y las hay que funcionan a vacío.

El objetivo de la etapa de batido es favorecer la coalescencia de las gotas dispersas de aceite liberadas de las vacuolas del endocarpio de la aceituna. Consecuentemente, las gotas de aceite aumentan de tamaño al juntarse y se separan de la fase continua acuosa por diferencia de densidades.

Esta pasta está formada por una fase líquida que contiene gotitas de aceite emulsionadas y trozos de pulpa y hueso en suspensión. Es necesario separar el agua y la materia sólida para obtener el aceite de oliva. Esta separación de fases se puede realizar principalmente mediante una centrifugación horizontal con un decánter de 2 o 3 fases.

La masa de aceituna molida y termobatida se separa en aceite, alpechín (fase rica en agua) y orujo (fase rica en sólidos) al salir de un decánter de tres fases. Sin embargo, debido al ahorro energético que este causa, se introdujeron posteriormente los de dos fases (Espínola, 1996). En este caso los productos obtenidos son la fase rica en aceite y el alpeorujo (mezcla de agua y materia sólida). Esta separación de fases por densidades se regula con el diafragma del decánter, de manera que se ajuste la salida de parte de la interfase, con el objetivo de evitar pérdidas de aceite asegurándose que este salga ligeramente sucio.

Por último, el aceite pasa por un proceso de decantación (decantadores pre-bodega) y posterior almacenaje en depósitos de acero inoxidable.

Las etapas finales son el filtrado del aceite y envasado. Normalmente esto se realiza a través de tuberías de acero inoxidable directamente desde los depósitos.

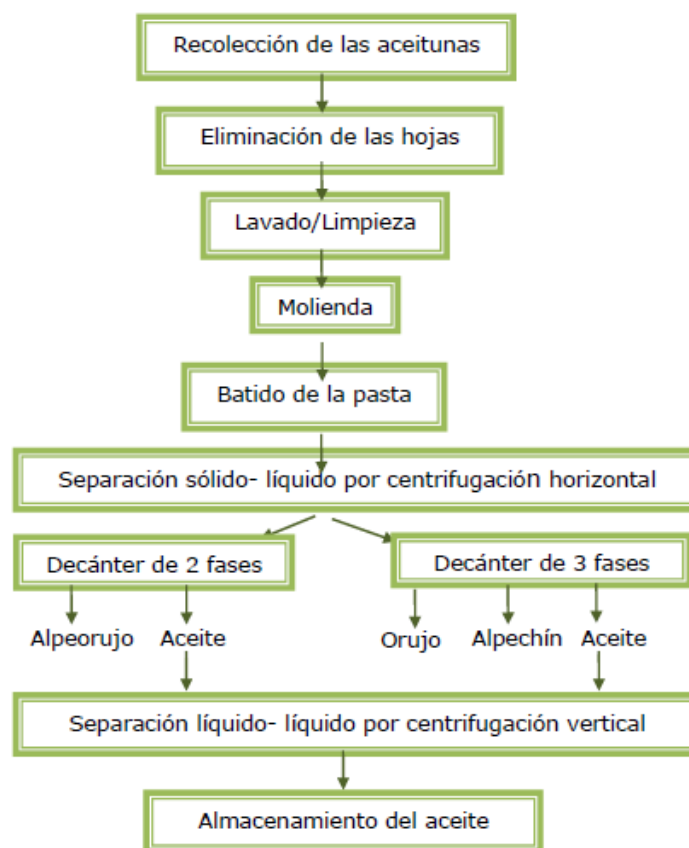


Figura 1. Esquema de la elaboración del aceite de oliva (Fuente: Abenoza, 2009).

2.2. Calidad del aceite de oliva

La calidad es el conjunto de propiedades y características de un producto que le confieren aptitud para satisfacer unas necesidades expresadas o implícitas (UNE-EN ISO 9000:2015).

En el aceite de oliva se clasifica en calidad nutricional, reglamentada, culinaria, comercial y sensorial; todas ellas son afectadas por los factores de calidad en mayor o menor medida.

La calidad nutricional deriva de la composición química del aceite. El aceite de oliva está constituido por una fracción saponificable (98-99%) formada principalmente por triglicéridos, diglicéridos, ceras, ésteres de esteroides, alcoholes terpénicos y algunos ácidos grasos libres; y una fracción insaponificable (1,5%).

Los principales ácidos grasos que conforman los triglicéridos son el ácido oleico, seguido del palmítico, linoleico y en menor proporción el ácido esteárico, palmitoleico y linolénico.

Las propiedades hipocolesterolémicas del aceite de oliva se deben a su contenido en ácidos grasos monoinsaturados, y en particular a su contenido en ácido oleico (Mattson y Grundy, 1995).

En cuanto a la fracción insaponificable, está compuesta por esteroides, dialcoholes terpénicos, alcoholes triterpénicos, alcoholes alifáticos, tocoferoles (α , β , γ y δ), compuestos fenólicos y pigmentos (clorofilas y carotenoides). Los compuestos fenólicos y los tocoferoles aportan resistencia a la oxidación del aceite y son beneficiosos para la salud humana debido a sus propiedades antioxidantes (vitamina E) y preventivas de enfermedades cardiovasculares.

La composición química del aceite de oliva puede variar y consecuentemente su calidad, por lo tanto los aceites deben clasificarse según la vigente legislación europea (calidad reglamentada) y se engloba en distintas denominaciones de origen protegidas o indicaciones geográficas protegidas a nivel nacional (calidad comercial).

En la actualidad, la legislación europea define claramente dichas categorías y los parámetros a cumplir (Tabla 1) mediante la aplicación del Reglamento (CE) nº 2568/91 de la Comisión, de 11 de julio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de

orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, y modificaciones.

CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES DE OLIVA

Categoría	Acidez (%) ^(*)	Índice de peróxidos meq O ₂ /kg ^(*)	Ceras mg/kg ^(**)	Ácidos saturados en posición 2 de los triglicéridos (%)	Estigmastadieno mg/kg ^(*)	Diferencia entre ECN42 HPLC y ECN42 (cálculo teórico)	K ₂₃₂ (°)	K ₂₇₀ (°)	Delta-K (°)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) ^(*)	Evaluación organoléptica Mediana del atributo frutado (Mf) ^(*)
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 1,5	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Aceite de oliva virgen	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 1,5	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Aceite de oliva lampante	> 2,0	—	≤ 300 ^(*)	≤ 1,5	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 ^(*)	—
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 1,8	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Aceite de oliva compuesto exclusivamente por aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 1,8	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Aceite de orujo de oliva crudo	—	—	> 350 ^(*)	≤ 2,2	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 2,2	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 2,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(*) Suma de isómeros que podrían separarse (o no) mediante columna capilar.

(*) O cuando la mediana de los defectos es inferior o igual a 2,5 y la mediana del atributo frutado es igual a 0.

(*) Los aceites con un contenido de ceras comprendido entre 300 y 350 mg/kg se consideran aceite de oliva lampante si el contenido de alcoholes alifáticos totales es inferior o igual a 350 mg/kg o si el porcentaje de eritrodil y uvaol es inferior o igual a 3,5.

(*) Los aceites con un contenido de ceras comprendido entre 300 y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva crudo si el contenido de alcoholes alifáticos totales es superior a 350 mg/kg y si el porcentaje de eritrodil y uvaol es superior a 3,5.

Tabla 1. Características de los aceites de oliva (Fuente: Reglamento (CEE) nº 2568/91).

El aceite sufre un control de calidad estricto para cumplir con las características especificadas en el Reglamento (CE) 2568/91 y los requisitos del Consejo Oleícola Internacional. Los parámetros físico-químicos y sensoriales estipulan la clasificación comercial de los aceites. Oficialmente es necesario la medida de la acidez (% de ácido oleico), índice de peróxidos (miliequivalentes de O₂ activo/kg. de aceite), K₂₃₂ (absorbancia a 232 nm), K₂₇₀ (abs a 270nm), ésteres etílicos de ácidos grasos (mg/kg).

Además de los criterios de calidad relativos a la composición química, ésta afecta a la calidad sensorial del aceite y es necesario realizar una evaluación organoléptica por un panel oficial de cata con el objetivo de clasificar los aceites de oliva. Los compuestos fenólicos y volátiles aportan los principales atributos positivos del aceite de oliva: frutado, amargo y picante. En el caso del aceite de oliva virgen extra debe tener aromas frutados y ausencia de defectos. En el contexto del aceite de oliva, resulta indispensable destacar los distintos factores de calidad que causan que un aceite de oliva sea virgen extra, virgen, lampante o debe refinarse.

Estos factores son genéticos (dependen de la variedad de aceituna), agronómicos (suelo, tipo de cultivo, control de plagas, condiciones climáticas, grado de maduración, método de recolección, etc), de procesado y de conservación (problemas de oxidación durante un almacenamiento inadecuado del aceite, etc).

En lo que respecta a los factores de procesado, afectan a la calidad del aceite de oliva, pero

también al rendimiento de extracción. El sistema tradicional empeora la calidad del aceite porque pueden darse fermentaciones entre los capachos usados en el prensado. En cuanto al sistema moderno continuo, los parámetros seleccionados en la etapa de batido (binomio temperatura/tiempo) son los factores que más influyen en la calidad y rendimiento obtenidos. A mayor tiempo y temperatura se obtienen mayores rendimientos de extracción; sin embargo no se opta por temperaturas muy elevadas porque se degradan los polifenoles y aumenta la acidez en % de ácido graso oleico libre (disminuye la calidad nutricional y sensorial). Alargar el tiempo de batido es perjudicial debido a la disminución de vitamina E y aumento progresivo de la oxidación lipídica.

Otro de los factores de procesado que afecta al rendimiento de extracción de aceite es el uso de coadyuvantes. Por «coadyuvante tecnológico» se entiende, toda sustancia que pueda dar lugar a la presencia involuntaria, pero técnicamente inevitable, en el producto final de residuos de la propia sustancia o de sus derivados, a condición de que no presenten ningún riesgo para la salud y no tengan ningún efecto tecnológico en el producto final, lo que hace que la preocupación sanitaria sea baja (artículo 3, apartado 2, letra b) del Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo).

Para mejorar el rendimiento de extracción de aceite de oliva, actualmente en España pueden utilizarse el microtalco natural (MTN: silicato de magnesio hidratado) y las arcillas caoliníticas. Forman parte de los coadyuvantes tecnológicos utilizados en la industria alimentaria. La legislación europea solo permite el uso de MTN para mejorar el rendimiento de extracción; y a partir del 2015 de las arcillas caoliníticas (Reglamento (CEE) nº 1333/2008). En concreto, el MTN se adiciona al 0,5-2% y absorbe el agua de la pasta de aceituna favoreciendo la coalescencia de las gotitas de aceite aumentando el rendimiento de extracción de aceite de oliva.

La normativa europea prohíbe el uso de coadyuvantes tecnológicos con acción química o bioquímica en la obtención de aceites de oliva vírgenes (CE, 2001). Sin embargo, no existe prohibición legal en otras zonas oleícolas (Argentina, Australia, Marruecos, Siria, Túnez o Turquía) (Civantos, 2008).

Por otra parte, se han realizado numerosos estudios científicos, no sólo de la aplicación de complejos enzimáticos o químicos (cloruro sódico o carbonato cálcico) en la pasta de

aceituna antes de la etapa de batido, sino también de otras tecnologías emergentes como los ultrasonidos, microondas, atmósferas protectoras o pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV), con el fin de aumentar el rendimiento de extracción (Sari y Ekinci, 2017; Tamborrino et al., 2018). La adición de enzimas pectolíticos o celulósicos puede sustituir al MTN para mejorar la extracción de aceite, ya que degrada las envolturas celulares, facilitando la extracción de estas gotas de aceite presentes en la pasta.

3. Objetivos y justificación

En la actualidad, los coadyuvantes que mejoran el rendimiento de extracción del aceite de oliva permitidos por la reglamentación europea no incluyen a los enzimas pectolíticos y celulósicos. Sin embargo, se han realizado ensayos experimentales de carácter científico que estudian la adición de estos enzimas a la pasta de aceituna molida antes o durante la etapa de batido. Por otra parte, algunas empresas producen y exportan este tipo de pectinasas y celulasas fuera de la Unión Europea para su aplicación en la industria oleica.

Consecuentemente, parece necesario investigar más sobre este tipo de enzimas y su efecto como coadyuvante en la extracción del aceite de oliva.

El objetivo fundamental de este trabajo fue:

- Conocer la influencia de la aplicación de los enzimas pectolíticos y celulósicos en el proceso de obtención de aceite de oliva.

Para lograr este objetivo se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Realizar una revisión bibliográfica para conocer el efecto de los enzimas en la extracción de aceite de oliva, la mejora del rendimiento de extracción, su efecto en la calidad y su situación actual (legislación y enzimas comerciales).
- Realizar un trabajo experimental que permita acompañar dicha revisión con resultados propios, analizando el efecto en el rendimiento de extracción de aceites de oliva de la incorporación de enzimas a diferentes concentraciones frente a controles con ausencia de enzima.

4. Materiales y métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Materia prima

Para este trabajo, fue proporcionado un lote de aceitunas de la variedad *Arbosana* por parte de la empresa Agrinarsa, ubicada en Fuentes de Ebro (Zaragoza). Estas aceitunas fueron recolectadas el 15 de diciembre de 2020 (Figura 2).



Figura 2. Aceitunas de la variedad Arbosana utilizadas en la extracción del aceite de oliva (Imagen propia).

Se determinó el índice de madurez ($IM=3,2$), para lo cual, se tomaron 100 aceitunas según la metodología descrita por la estación de Olivicultura y Elaiotecnia de Jaén (Hermoso et al., 1991).

Se evaluó la pigmentación del epicarpio y mesocarpio de los frutos mediante una escala basada en 7 niveles de pigmentación (Tabla 2) , estas categorías dependen del color del fruto en el momento de recolección.

Nivel de pigmentación	Color del epicarpio y mesocarpio
0	Epicarpio verde intenso
1	Epicarpio verde-amarillento
2	Epicarpio con manchas rojizas en menos de la mitad del fruto
3	Epicarpio con manchas rojizas por todo el fruto
4	Epicarpio negro sin color en el mesocarpio
5	Epicarpio negro con color en el mesocarpio sin llegar a la mitad
6	Epicarpio negro con color en el mesocarpio sin llegar al hueso
7	Epicarpio negro y mesocarpio morado hasta el hueso

Tabla 2. Descripción de los niveles del índice de madurez (Fuente: elaboración propia).

El índice de madurez se calculó con la fórmula:

$$IM = \frac{A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3 + E \times 4 + F \times 5 + G \times 6 + H \times 7}{\text{Número total de frutos}}$$

Siendo:

A: número de frutos de nivel de pigmentación 0

B: número de frutos de nivel de pigmentación 1

C: número de frutos de nivel de pigmentación 2

D: número de frutos de nivel de pigmentación 3

E: número de frutos de nivel de pigmentación 4

F: número de frutos de nivel de pigmentación 5

G: número de frutos de nivel de pigmentación 6

H: número de frutos de nivel de pigmentación 7

4.1.2 Enzimas

Los enzimas celulósicos / pectolíticos utilizados fueron suministrados por la empresa 3G-Since 2000 S.L. Se usaron cuatro complejos enzimáticos diferentes en presentación líquida referenciados de esta manera: NV (muestra 1), AE (muestra 2), EAO (muestra 3) y ACR (muestra 4).



Figura 3. Enzimas suministrados para el ensayo experimental (Imagen propia).

Para la mejor dosificación del enzima, se procedió a diluir en agua el producto original en un matraz aforado mediante una dilución al 10% (5 ml del producto y 45 ml de agua destilada).



Figura 4. Enzimas diluidas al 10% (Imagen propia).

Según la empresa proveedora, el enzima debía adicionarse a razón de 400 ml enzima / 1000 kg de aceitunas.

4.2 Métodos

4.2.1 Revisión bibliográfica

Para conseguir estos objetivos se realizó una revisión bibliográfica mediante la consulta de artículos y revisiones en las principales bases de datos de información científica en ciencia y tecnología de los alimentos (Web of Science, Science Direct, Pubmed, entre otras). Se consultaron libros y otras publicaciones como tesis doctorales o informes de proyectos de investigación. Se definieron los criterios de búsqueda y filtrado de información en función de

su calidad científica. El rango de tiempo para la búsqueda bibliográfica fue entre los años 2010 y 2021. Las palabras clave utilizadas fueron las siguientes, en español y en inglés: pectinasas, celulasas, enzimas, pectinasas y aceite de oliva, enzimas y aceite de oliva, pectinases, celulasas, enzymes, pectin and olive oil, enzymes and olive oil.

4.2.2 Ensayo experimental

El ensayo experimental comprendió una serie de extracciones de aceite de oliva a escala de laboratorio utilizando cuatro complejos enzimáticos comerciales (pectinasas y celulasas) a dos concentraciones diferentes y extracciones de muestras control (ausencia de enzima). Posteriormente, se determinó el rendimiento graso sobre materia húmeda (rendimiento industrial) y el rendimiento graso sobre materia seca mediante el método Soxhlet, en cada una de las condiciones de extracción. A su vez, se utilizó un equipo de espectrofotometría NIR que también permite medir el contenido graso y la humedad de las muestras.

4.2.2.1 Diseño experimental

Se estudiaron distintas condiciones de extracción en lo que respecta al tipo de enzima y concentración de la misma según se muestra en la Tabla 3. Se realizaron 4 controles en los cuales no se adicionó enzima. Todas las extracciones de aceite con adición de enzima se realizaron por duplicado y las determinaciones del rendimiento graso se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como las medias de las réplicas \pm desviación estándar.

Tipo de muestra	Condiciones de batido	Código de las muestras
Con enzima en concentración más alta	26 ± 1 °C / 30 minutos	NV1/ AE1/ EAO1/ ACR1
Con enzima en concentración más baja	26 ± 1 °C / 30 minutos	NV3/ AE3/ EAO3/ ACR3
Control (sin adición de enzima)	26 ± 1 °C / 30 minutos	C1/ C2/ C3 / C4.

Tabla 3. Condiciones del diseño experimental establecidas para cada enzima (Fuente: elaboración propia).

4.2.2.1 Extracción de aceite de oliva

La extracción de aceite de las muestras fue realizada mediante una analizador de rendimiento de aceitunas Abencor (MC2 Ingenierías y Sistemas, Sevilla, España) siguiendo el procedimiento descrito por Martínez-Suárez et al., (1975). Este método reproduce, a escala de laboratorio, el proceso industrial de obtención de aceite de oliva (Figura 5 y 6).



Figura 5. Molino de martillos, termobatidora y centrífuga vertical (Fuente: MC2 Ingenierías y Sistemas).

La primera etapa es la molienda de las aceitunas. Las aceitunas de la variedad *Arbosana* se introducen manualmente en la parte superior del molino de martillos accionado por un motor de 2 CV a 3000 rpm. Tras esta etapa se almacena pasta de aceituna molida para una posterior determinación del contenido graso sobre materia seca de la materia prima.

A continuación, la pasta resultante se distribuye en cada uno de los seis pocillos del equipo de extracción Abencor (600 g de pasta/ pocillo). Realizando la proporción respecto al peso de pasta molida que puede contener un pocillo del equipo de extracción Abencor (600 g) se adicionarán 2,4 ml del enzima / 600 g aceituna (concentración 1). Además, se plantea una concentración menor con el objetivo de evitar una posible saturación de estas pectinasas y celulasas: 1,5 ml del enzima / 600 g aceituna (concentración 2). En todos los casos los enzimas se adicionaron al inicio de la fase de batido de la pasta de aceituna obtenida tras la molienda, mediante una pipeta desde las diluciones anteriores.

Según el diseño experimental, se adiciona o no el enzima, pipeteando un volumen de 2,4 ml (concentración 1) o 1,5 ml (concentración 2) por la superficie de la pasta molida en cada pocillo. Para referenciar las extracciones con adición de enzimas se relacionó la referencia del enzima adicionado y la concentración usada.

Una vez colocados los pocillos en el equipo Abencor, las muestras se someten a batido en la termobatidora. Las condiciones del batido son 26 ± 1 °C durante 30 minutos.



Figura 6. Etapa de batido de la pasta de aceituna (Imagen propia).

Posteriormente, se vierte la pasta dentro de una centrífuga vertical de tipo cesta que gira a 3500 rpm, realizándose una extracción para cada muestra durante un minuto. La centrifugación se repite de nuevo para obtener una mayor cantidad.

El mosto oleoso se recoge por el orificio inferior de la centrífuga en una probeta graduada. El alpeorujo situado en la pared de la centrífuga es recogido en un envase para determinar el contenido graso sobre materia seca.

4.2.2.3 Determinación del rendimiento graso sobre materia húmeda

El volumen de aceite de oliva de cada muestra se decanta para realizar una medición aproximada del volumen obtenido de aceite para cada extracción. Estos volúmenes se obtienen mediante la diferencia del volumen total del líquido en la probeta y el residuo de materia sólida (compuesto por trozos de pulpa, piel y hueso) de la sección inferior.

Con el volumen de aceite obtenido se calcula el rendimiento graso sobre materia húmeda o

fresca (rendimiento industrial) con la siguiente fórmula:

$$R = \frac{V \times d}{P} \times 100$$

Siendo:

R: rendimiento de aceite en peso fresco (%)

V: volumen de aceite obtenido (ml)

d: densidad del aceite considerando una temperatura de 20 °C (0,916 g/ml)

p: peso de la pasta (1200g)

4.2.2.4 Determinación de la materia seca

La extracción de grasa se realiza sobre materia seca, por lo tanto el primer paso fue eliminar la humedad de todas las muestras de pastas molidas y alpeorujos recogidas durante el proceso de extracción. Para ello se utilizó una estufa Binder serie ED de secado a convección natural (Tuttlingen, Alemania) a 105 ± 2 °C durante 48 horas. A partir de las muestras de pasta de aceituna molida y alpeorujos recogidas se pesaron 15 g de cada una de ellas en tarrinas de aluminio (peso muestra húmeda). Con el objetivo de realizar por triplicado la determinación del contenido graso sobre materia seca se pesaron 3 submuestras de 15 g para cada referencia. Se realiza un pesado de la tarrina y del contenido de submuestra. Tras 24 horas, se dejan enfriar las tarrinas en un desecador para evitar ganancias de humedad y se pesan en una balanza analítica hasta obtener un peso constante (peso muestra seca). Puede calcularse el % de humedad con la fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso muestra húmeda} - \text{peso muestra seca}}{\text{Peso de la muestra húmeda}} \times 100$$

El % de materia seca (%MS) se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{Materia seca} = 100 - \% \text{Humedad}$$

4.2.2.5 Determinación del rendimiento graso sobre materia seca mediante el método Soxhlet

El rendimiento graso sobre materia seca de cada extracción es el método que permite cuantificar la cantidad de aceite extraído respecto a un mismo peso de materia seca. Es necesario cuantificar el aceite extraído mediante el método Soxhlet, obteniéndose el % de grasa sobre materia seca para cada muestra y posteriormente el rendimiento graso sobre materia seca.

La extracción se realiza con un equipo Soxhlet que presenta seis conjuntos de tres componentes conectados: un vaso colector, el cuerpo de extracción (unido a un cartucho de celulosa donde se coloca la muestra) y una sección refrigerante.

Para facilitar la extracción del contenido graso se trituraron manualmente las submuestra secas en un mortero limpio. El equipo Soxhlet permite realizar 6 extracciones de grasa sobre materia seca en un mismo ciclo. Como disolvente de extracción se utilizaron 40 ml de éter de petróleo, el cual se adiciona en los vasos colectores bajo una campana de extracción.

Para comenzar, el equipo y utensilios se limpian con etanol. En cada vaso colector se añaden seis bolitas de vidrio y se apunta el peso de ambos componentes (tara vaso colector), esto es necesario para calcular posteriormente el peso del residuo graso. En cada cartucho de celulosa se añadió 2 g de las submuestras secas (peso muestra) y en la parte superior un trozo de algodón. Se introducen los vasos colectores y los cartuchos de celulosa en el equipo y se abre el grifo del circuito refrigerante. El proceso está automatizado para la extracción de pastas y orujos de oliva.

Tras apagar el equipo, se introducen los vasos colectores (con las bolitas de vidrio y la grasa extraída) en la estufa a 125 °C durante 30 minutos para eliminar posibles trazas del disolvente. A continuación se enfrían en un desecador durante 30 minutos y se pesan los vasos (peso colector con grasa).

El % de grasa está expresado sobre materia seca y se calcula con la fórmula:

$$\begin{aligned} \% \text{grasa} / \text{materia seca} \\ = \frac{(\text{peso vaso colector con grasa} - \text{tara vaso colector}) \times 100}{\text{peso muestra (g)}} \end{aligned}$$

Para cada muestra y extracción, la diferencia entre el contenido lipídico de la materia prima y el del alpeorujo será el contenido total del aceite extraído. Consecuentemente, el rendimiento graso sobre materia seca se obtiene al comparar el contenido graso de la pasta molida frente al contenido graso de los alpeorujos de las muestras y de los controles, a partir de la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento graso sobre materia seca}(\%) \\ = \% \text{grasa sobre materia seca (pasta oliva)} \\ - \% \text{grasa sobre materia seca (alpeorujo de muestra o control)} \end{aligned}$$

4.2.2.6 Determinación del contenido graso y humedad mediante el método NIR

Se determinó el contenido en grasa y humedad de la pasta de aceituna y del conjunto de alpeorujos de las muestras mediante espectroscopía de infrarrojo cercano en un equipo NIR Foss-Foodscan Lab 78800, perfectamente calibrado del que disponía el Laboratorio Agroambiental de Aragón (Unidad de Grasas y Aceites). Estas calibraciones están realizadas con equipos Soxhlet y estufas, para las determinaciones de grasa y humedad, respectivamente. La muestra debe extenderse en una placa circular del equipo y este realiza el análisis automáticamente. Los resultados los necesitaba la empresa 3G-Since 2000 S.L. con cierta celeridad, por lo tanto se optó por realizar estas determinaciones mediante un equipo NIR, cuyo método es más rápido que el método Soxhlet.

Se obtuvieron los resultados de % de humedad y % de grasa de la pasta de aceituna y las muestras. A partir de la fórmula mencionada anteriormente, se obtuvo el % de materia seca y el % graso sobre materia seca.

5. Resultados

5.1 Revisión bibliográfica

Son numerosos los artículos científicos en los que distintos autores investigan los efectos de adicionar enzimas en la etapa del batido para obtener mejores resultados en la extracción de aceite de oliva. Principalmente se emplean mezclas de enzimas pectolíticos comerciales con actividad pectinasa, celulasa y hemicelulasa, aunque también se han usado enzimas proteolíticas como en la investigación de Moustakime, Hazzoumi, y Amran (2016).

A continuación, se muestran algunos enzimas comerciales usados en los artículos científicos con objeto de investigar las mejoras en la extracción de aceite de oliva:

- Pectinex Ultra SP-Land[®], Olivex, Glucanex, Cellubrix, Vyscozyme L[®] y NovoFerm 12: mezclas enzimáticas con actividad pectinasa, celulasa y hemicelulasa de la empresa Novozymes (Bagsværd, Dinamarca.) Pectinex Ultra SP-Land[®] y Vyscozyme L[®] disponibles en la web:

<https://biosolutions.novozymes.com/en/juice-fruit-vegetables/products/olive-oil/viscozyme-l>

<https://biosolutions.novozymes.com/en/juice-fruit-vegetables/products/olive-oil/pectinex-ultra-olio>.

Muchos enzimas de esta empresa son producidos por la empresa Biocon (Banglore, India).

- Bioliva[®]: preparación enzimática que presenta actividad arabanasa, pectin-liasa, pectinmetilestearasa y poligalacturonasa de la empresa Biotec (Roma, Italia). Disponible en la web: <https://www.biotecroma.it/index.php/es/industria-aceitera/item/296-bioliva>.
- Maxoliva[®]: enzima pectolítico de la empresa DSM Food Specialties (Alemania).
- Cytolase-O: enzima pectolítico resistente a PHs ácidos de la empresa Gist-Brocades, la cual fue posteriormente adquirida por DSM Food Specialties (Alemania).
- Endozym Olea[®]: mezcla enzimática que presenta actividad pectinasa, celulasa y hemicelulasa desarrollada por AEB Bioquímica Portuguesa (Vigueo, Portugal). Disponible en <https://www.aeb-group.com/ar/food/biotecnologia/enzimas>.

Además de estos complejos enzimáticos, en algunos estudios (Ortiz et al., 2017) se ha investigado la producción de enzimas propias, que se comparan, una vez obtenidas, con enzimas comerciales. En este estudio se expone la necesidad de investigar cepas de microorganismos (concretamente mohos del género *Aspergillus*), con el fin de obtener cepas más productivas de enzimas pectolíticas y con actividades enzimáticas de mayor estabilidad (mayores rangos de temperatura, tiempo y PH), debido al alto coste económico que el proceso de producción actual conlleva. Se demuestra la eficacia de la adición de enzimas con actividad pectinasa en la extracción de aceite de oliva, mejorando el rendimiento un 15% y las propiedades reológicas sin alterar la composición química del aceite obtenido. Debido a la disminución de la viscosidad de la pasta de oliva se podrían emplear para pastas difíciles, que presentan un menor contenido de aceite.

La mejora de las propiedades reológicas de la pasta de aceituna al adicionar enzimas hidrolíticos es observada en otros estudios científicos, los cuales observan cambios reológicos en la pasta de aceituna producidos por aumentos de la degradación de la pared celular (Iconomou, Arapoglou y Israilides, 2010; Chih et al., 2012; Peres, Martins y Ferreira-Dias, 2014). Se ha observado una imagen microscópica de la pasta de aceituna molida más heterogénea, en la cual se había producido una coalescencia de las gotas de aceite y había aumentado el tamaño (Acar y Arslan, 2018).

Numerosos estudios que han investigado la aplicación de enzimas con actividades hidrolíticas en el proceso de extracción de aceite han observado un aumento del rendimiento de extracción o aceite obtenido (Iconomou, Arapoglou y Israilides, 2010; Hadj-Taieb et al., 2012; Chih et al., 2012; Peres, Martins y Ferreira-Dias, 2014; Sharma et al., 2015; Moustakime, Hazzoumi, y Amran, 2016; Ortiz et al., 2017; Acar y Arslan, 2018; Polari y Wang, 2020).

Una investigación indicó mejoras en el rendimiento de extracción de aceite de oliva de entre 0,9-2,4% respecto al control sin enzimas al usar este tipo de enzimas hidrolíticos como coadyuvantes, con un máximo para un mayor índice de madurez de las aceitunas (Najafian et al., 2009). Hadj-Taieb et al., (2012) constató este resultado en su investigación, obteniendo una mejoría del rendimiento de extracción del 1,5%, concretamente en la extracción de aceitunas maduras.

La adición de enzimas pectolíticos en la pasta de aceituna molida causa la ruptura de la pared celular y recupera el aceite del tejido que no se había degradado en la etapa de molienda (Acar y Arslan, 2018). En este estudio se consiguen rendimientos de extracción de 28% frente al 14 % sin adición de enzimas.

El efecto de las enzimas es degradar la pared celular de las células de la pasta de aceituna molida y deshacer las emulsiones formadas (líquido/sólido y líquido/líquido). Consecuentemente las gotas de aceite se acaban juntado y aumentado su tamaño, siendo más fácil su posterior extracción (Iconomou, Arapoglou y Israilides, 2010).

Además de conseguir una mayor cantidad de aceite, también puede aumentar la cantidad de agua y sólidos solubles de la fase oleica (Polari y Wang, 2020). La recuperación de agua al salir del citoplasma celular está relacionada con el aumento de la ruptura de la pared celular de la aceituna. En este reciente estudio demuestran que la etapa de molienda no consigue degradar todas las células y por lo tanto, no consigue liberar todo el aceite presente de la aceituna. Se sugiere el potencial de la adición de enzimas para obtener aceite de oliva más allá de las posibilidades del proceso de extracción tradicional mecánico.

También se ha demostrado un aumento del rendimiento de extracción al usar una mezcla de enzimas comerciales a 30 g/ml por cada kilogramo de pasta de aceituna en la variedad *Frantoio* (Chih et al., 2012). Estos autores exponen la necesidad de utilizar los enzimas para degradar las capas de la pared celular de la aceituna que no se rompen mediante la molienda. La pared celular está formada por pectinas, celulosa y hemicelulosa, que deben romperse para liberar las vacuolas que contienen el aceite.

Se observó un aumento del rendimiento de extracción de aceite del 34% en la variedad de aceituna *Galega Vulgar* con adición de la mezcla enzimática Endozym Olea® (actividad pectolítica, celulósica y hemicelulósica) al 0,1%, frente al control sin enzimas (Peres, Martins y Ferreira-Dias, 2014). Sin embargo, para la variedad *Cobrancosa* solo observaron aumentos de rendimiento similares adicionando talco al 0,1%. Por lo tanto los autores concluyen que los efectos de una adición de enzimas como coadyuvante dependen del cultivo, del índice de madurez y del contenido presente de humedad de aceituna empleada.

Como ya se ha descrito anteriormente, se usan mezclas de varios enzimas en un mix de enzimas comerciales. Se ha investigado la adición de enzimas pectolíticos y celulósicos individualmente o como mezcla y se ha observado mayores rendimientos de extracción al usar la mezcla de pectinasa+celulasa en proporción (1:1) (Sharma et al., 2015). En concreto se adicionó cada enzima al 0,05% y se obtuvo un aumento del rendimiento de extracción de aceite de oliva de alrededor del 11% frente al control.

Esta mejora significativa del aceite recuperado al usar mezclas de enzimas con diferentes actividades enzimáticas en vez de un enzima particular la defienden numerosas investigaciones científicas (Hadj-Taieb et al., 2012; Peres, Martins y Ferreira-Dias, 2014; Sharma et al., 2015; Moustakime, Hazzoumi, y Amran, 2016; Acar y Arslan, 2018).

Se han observado mejoras muy significativas en la degradación de la pared celular y consecuentemente en los rendimientos de extracción al adicionar una mezcla de pectinasas y proteasas en la pasta de aceituna molida (Moustakime, Hazzoumi, y Amran, 2016). Sin embargo, el uso de proteasas individualmente no mejoró el rendimiento de extracción. Estos autores afirman que la extracción de aceite de oliva por métodos mecánicos no es efectiva, sobretudo cuando las aceitunas presentan bajos índices de madurez. Por lo tanto, sugieren la necesidad de degradar en mayor medida la pared celular, las membranas celulares y las membranas de las vacuolas presentes en las células de las aceitunas utilizando enzimas exógenos. Durante la extracción de aceite de oliva, parte de este queda atrapado en las células. El aceite se encuentra principalmente en el mesocarpio y en menor medida en el endocarpio y epicarpio de la aceituna. Las principales estructuras que previenen la extracción del contenido celular graso son las vacuolas, aunque también hay gotas de aceite en el citoplasma.

Tras adicionar esta mezcla de enzimas pudieron determinar los rendimientos de extracción y el contenido fenólico de los aceites obtenidos. Obtuvieron una mayor difusión de aceite y mayor riqueza en compuestos fenólicos del mismo, con un máximo en aceitunas antes de llegar a la madurez total.

El tratamiento con el enzima proteolítico degradó los componentes proteicos de las membranas celulares, liberando polifenoles asociados a estas estructuras y aumentando la

difusión de aceite. Por otro lado, la mezcla de enzimas pectolíticos degradó la estructura celular parietal de las aceitunas, permitiendo una mayor difusión del contenido celular y liberando polifenoles asociados a la pared celular.

El efecto de los enzimas de tipo pectinasas en el contenido de compuestos fenólicos, aumentando significativamente en los aceites de oliva extraídos con enzimas, ha sido expuesto en numerosos artículos científicos (Iconomou, Arapoglou y Israilides, 2010; Hadj-Taieb et al., 2012; Chih et al., 2012; Sharma et al., 2015; Moustakime, Hazzoumi, y Amran, 2016; Acar y Arslan, 2018; Polari y Wang, 2020).

Las pectinasas reducen los complejos de polifenoles unidos a los polisacáridos de las pectinas, obteniendo mayores compuestos fenólicos libres en el aceite extraído con dichos enzimas (Vierhuis et al., 2003). Se observaron aumentos del 6% y del 10% en los compuestos fenólicos con adición de pectinasas frente a un control sin enzima, para aceitunas verdes y maduras, respectivamente (Hadj-Taieb et al., 2012). Las pectinasas resultaron más efectivas que otros tipos de enzimas hidrolíticos, además de conseguirse mayores contenidos en aceitunas de mayor índice de madurez. Se observó en general una mejoría en el contenido de compuestos insaponificables.

En otros estudios científicos se determinaron los compuestos fenólicos al adicionar una mezcla de enzimas hidrolíticos al 0,09% y se obtuvieron mayores compuestos fenólicos y una mayor transición de derivados secoiridoides desde la pasta hasta el aceite extraído (Acar y Arslan, 2018). Respecto a los pigmentos, las clorofilas disminuyeron y los carotenoides aumentaron ligeramente.

Anteriormente, se habían determinado resultados parecidos de aumentos de fenoles y orto-difenoles en el aceite extraído con enzimas hidrolíticos (Iconomou, Arapoglou y Israilides, 2010). Estos autores afirmaron que los enzimas rompen las estructuras celulares de la pulpa y degradan los polisacáridos (glicósidos fenólicos), liberando los antioxidantes fenólicos en el aceite extraído. La mayor parte de los polifenoles se encuentran unidos a los coloides de las gotas de aceite. Se determinó un incremento del contenido total de fenoles, de los alcoholes fenólicos (hidroxitirosol y tirosol) y de derivados secoiridoides. Incluso observaron un mayor aumento de estos compuestos y de los orto-difenoles al usar la mezcla enzimática a doble

concentración.

Otros estudios han demostrado que suceden cambios en la composición de la pared celular durante el proceso de maduración de las aceitunas (Polari y Wang, 2020). Es por ello que obtuvieron mayores aumentos del contenido fenólico en aceitunas de bajo índice de madurez, aumentando también los derivados ligstrosidos al adicionar la mezcla de enzimas hidrolíticos.

En otras investigaciones no se encontraron aumentos significativos del contenido fenólico total ni del contenido de pigmentos, sin embargo, sugirieron que la mayoría de los estudios científicos sí los obtuvieron usando mayores dosis de enzima (0,5-1,5%) (Peres, Martins y Ferreira-Dias, 2014).

Los compuestos fenólicos totales del aceite de oliva son beneficiosos para la salud (antioxidantes), aumentan la estabilidad del aceite durante su almacenamiento y aportan atributos sensoriales positivos (Chih et al., 2012). Estos compuestos se encuentran en las vacuolas o en la superficie de la bicapa fosfolípida, una vez que los enzimas hidrolizan los polisacáridos pasan a la fase grasa. Según la investigación de estos autores, observaron incrementos del 142% respecto al control sin enzima, adicionando enzimas a una concentración superior a 0,15 g/ml por cada kilogramo de aceituna de la variedad *Frantoio*. Adicionando la mezcla de pectinasas y celulasas se observa un incremento del contenido de compuestos fenólicos totales de 20 mg/kg de aceite (Sharma et al., 2015).

Respecto al índice de madurez, con pectinasas se observó un mayor aumento del contenido fenólico en aceitunas verdes. Adicionando la mezcla de pectinasas y proteasas, se obtuvieron mayores rendimientos tanto desde el envero hasta la madurez de la aceituna (aumentos del 53% hasta 84%, respectivamente) (Moustakime, Hazzoumi, y Amran, 2016).

Respecto al contenido de pigmentos, algunos estudios han observado aumentos en el aceite al adicionar enzimas a la pasta de aceituna, aunque el efecto no está tan claro.

Hay investigaciones que han observado aumentos en el contenido de ambos pigmentos (Hadj-Taieb et al., 2012) o bien solo de las clorofilas (Iconomou, Arapoglou y Israilides, 2010) o de los carotenoides (Acar y Arslan, 2018).

La proporción de ácidos grasos no aumenta significativamente con adición de enzimas. Sin embargo, algunas investigaciones han observado ligeros aumentos del contenido de ácido palmitoleico en aceitunas maduras (Hadj-Taieb et al., 2012), del ácido oleico (Iconomou, Arapoglou y Israilides, 2010) y del ácido oleico y palmítico (Sharma et al., 2015).

La estabilidad oxidativa o resistencia a la oxidación la aportan los compuestos antioxidantes del aceite de oliva, principalmente los compuestos fenólicos, seguido de los ácidos grasos monoinsaturados y los carotenoides (Hachicha Hbaieb et al., 2015). Por lo tanto, los estudios científicos que determinaron la resistencia a la oxidación de los aceites extraídos utilizando enzimas hidrolíticos obtuvieron mayores tiempos de estabilidad de los aceites frente a la oxidación.

Se obtuvo mayor estabilidad oxidativa (3,5 horas mayor que el control con ausencia de enzima) usando una mezcla de celulasas y xilanasas en aceitunas verdes (Hadj-Taieb et al., 2012). Se relaciona el aumento de los compuestos fenólicos con el incremento de la actividad antioxidante (Iconomou, Arapoglou y Israilides, 2010; Acar y Arslan, 2018). Además, se sugiere que hay compuestos fenólicos más efectivos que otros, como los o-difenoles (Chih et al., 2012). En dicha investigación determinaron un aumento del 53% de la actividad antiradical del aceite de oliva extraído adicionando enzimas hidrolíticos para la variedad *Frantoio*.

En cuanto a la calidad organoléptica del aceite de oliva, los atributos sensoriales positivos se deben a la presencia de compuestos volátiles (aldehídos, ésteres, alcoholes y compuestos fenólicos). En diversas investigaciones que realizaron una evaluación sensorial de los aceites obtenidos con enzimas observaron mejoras de la calidad sensorial, relacionada principalmente con el incremento de compuestos fenólicos (Iconomou, Arapoglou y Israilides, 2010; Chih et al., 2012; Sharma et al., 2015). En general, mejoran las características deseables como la intensidad de los aromas afrutados, debido a la mayor extracción de compuestos volátiles adicionando enzimas exógenos.

En algunos casos, se observó una mejora en el aspecto visual de los aceites extraídos con enzimas pectolíticos y celulósicos, aumentando la claridad de los mismos (Sharma et al., 2015). Se ha demostrado el efecto clarificador de las pectinasas, disminuyendo un 70 % la turbidez

del aceite de oliva una vez decantado (Ortiz et al., 2017).

Diversos estudios reflejan que el uso de enzimas como coadyuvante en la extracción de aceite de oliva resulta no afecta a la calidad del mismo, sin alterar significativamente las propiedades químicas o principales criterios de calidad del aceite (Peres, Martins y Ferreira-Dias, 2014; Sharma et al., 2015; Ortiz et al., 2017; Polari y Wang, 2020). Estos autores no observaron cambios en el % de acidez (% ácido oleico libre), el índice de peróxidos ni en los índices de absorbancia (K_{232} y K_{270}).

Sin embargo, algunos autores manifestaron una mejora en las propiedades químicas de los aceites extraídos adicionando enzimas, relacionados con el aumento de los compuestos fenólicos y la estabilidad oxidativa. El % de acidez e índice de peróxidos disminuyeron, con valores semejantes al aceite de oliva virgen extra (Iconomou, Arapoglou y Israilides, 2010). Se obtuvo una disminución del % de acidez y del índice de peróxidos con enzimas pectolíticas usados a una concentración inferior a 0,25% (Hadj-Taieb et al., 2012). En el caso de adicionar enzimas al 0,09% se consigue un % de acidez inferior que el control sin enzima, aunque aumenta ligeramente el índice de peróxidos (Acar y Arslan, 2018). En este último estudio observaron que el índice de peróxidos disminuía al aplicar simultáneamente al tratamiento enzimático un tratamiento por microondas y/o ultrasonidos.

Por último, es necesario comentar que la producción de enzimas podría ser sostenible debido al aprovechamiento de residuos de agricultura como sustrato, pudiendo obtenerse enzimas de manera eco-friendly a partir de salvados de cereales y piel de diversas frutas (Ortiz et al., 2017).

Respecto a la legislación europea, la producción de aceite de oliva debe cumplir con la normativa del Codex Alimentarius (CX-33-1981) y la reglamentación europea del Reglamento (CEE) nº 2568/91 de la Comisión, de 11 de julio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis (modificado por el Reglamento (CE) nº 1989/2003 de la Comisión, de 6 de noviembre de 2003; por el Reglamento (CE) nº 640/2008 de la Comisión, de 4 de julio de 2008; por el Reglamento Delegado (UE) nº 2015/1830 de la Comisión, de 8 de julio de 2015; por el Reglamento de Ejecución (UE) nº 2015/1833 de la Comisión, de 12 de octubre de 2015 y por otras

modificaciones) y el Reglamento (UE) nº 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de diciembre de 2013, por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) nº 922/72, (CEE) nº 234/79, (CE) nº 1037/2001 y (CE) nº 1234/2007. Además, recientemente se ha publicado el Real Decreto 760/2021, de 31 de agosto, por el que se aprueba la norma de calidad de los aceites de oliva y de orujo de oliva. En ellos se establecen las denominaciones, las definiciones, las características fisicoquímicas y organolépticas, y los métodos de muestreo y análisis de dichos productos.

Por otra parte, se deben seguir las directrices del Consejo Oleícola Internacional (COI), un ejemplo es la Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva (COI, 2012).

En dicha legislación se define el aceite de oliva como el aceite procedente únicamente del fruto del olivo (*Olea europaea* L.), con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza (COI, 2012). Además, los aceites de oliva vírgenes son los aceites obtenidos del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos o por otros medios físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado.

El uso de enzimas como coadyuvantes no se incluye en estas condiciones, por lo tanto, por el momento el uso de enzimas hidrolíticos no está permitido para la producción de aceite de oliva en la Unión Europea.

5.2 Ensayo experimental

Tras la extracción de los distintos aceites con el equipo Abencor se determinó el rendimiento graso sobre materia húmeda o rendimiento industrial. Como se puede observar en las distintas fotografías (Figuras 7 a 10), la adición de los enzimas en las dos concentraciones durante el batido de la pasta generó aceites con una mayor cantidad de agua y residuo sólido al compararlo con su control. EL enzima ACR generó la menor cantidad de agua y residuo sólido respecto a los demás enzimas.

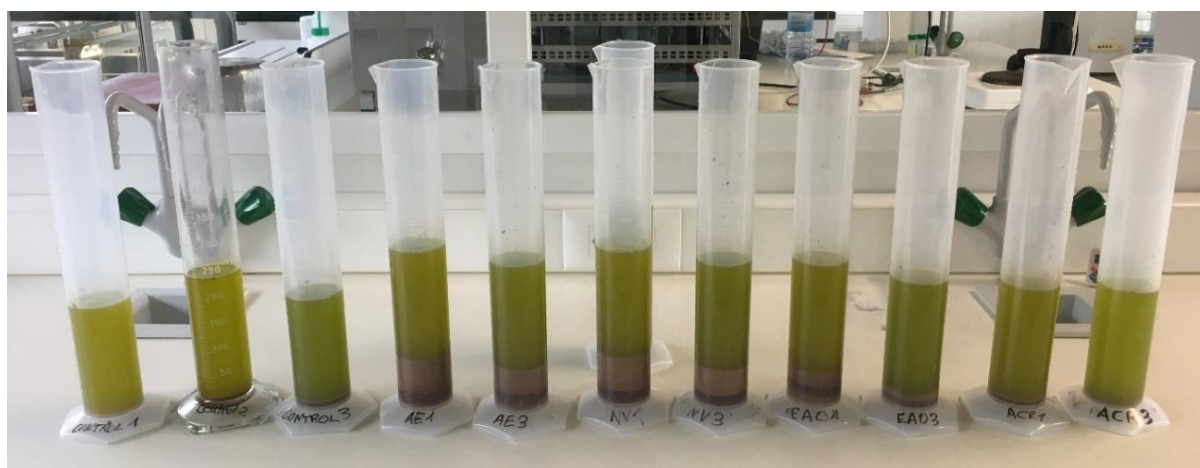


Figura 7. Aceites obtenidos con los diferentes enzimas y en las muestras control tras la centrifugación (réplica 1) (Imagen propia).

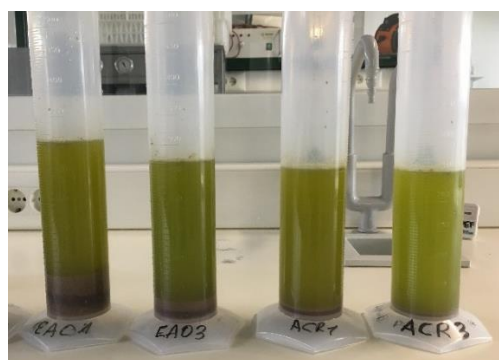
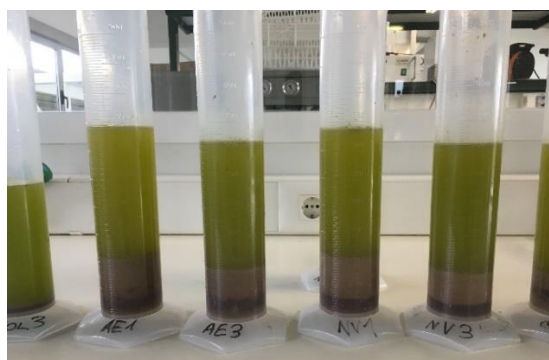


Figura 8 y 9. Detalle de los aceites obtenidos con los diferentes enzimas y en la muestra control tras la centrifugación (réplica 1) (Imágenes propias).

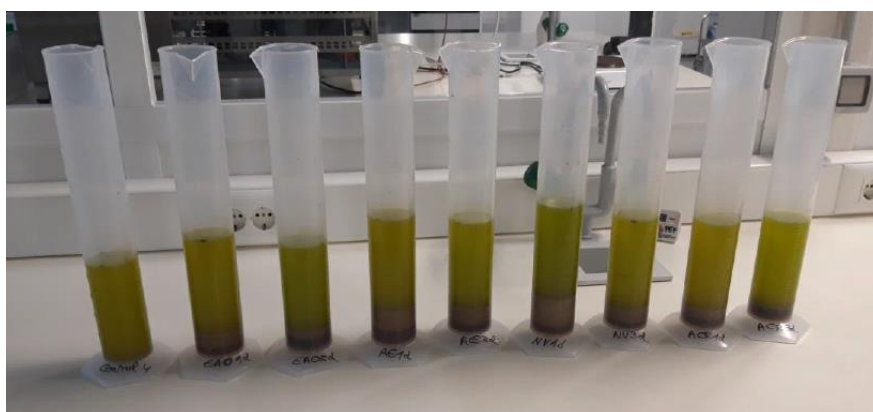


Figura 10. Aceites obtenidos con los diferentes enzimas y en la muestra control tras la centrifugación (réplica 2) (Imagen propia).

En la Tabla 4 se recogen los resultados de rendimiento graso sobre materia húmeda obtenidos para los cuatro enzimas a las dos concentraciones estudiadas, comparados con el aceite control elaborado al mismo tiempo y por tanto, bajo las mismas condiciones.

A las concentraciones más elevadas de enzima utilizado, se observó que los enzimas ACR y AE aumentaron el rendimiento de la extracción cuando se comparó con el control alrededor de un 0,2%. Ese incremento en el rendimiento sólo se observó con la concentración más baja en el enzima ACR.

En cuanto a los enzimas NV y EAO no se observó un aumento significativo del rendimiento de extracción. Los enzimas EAO y AE con la concentración más baja disminuyeron el rendimiento comparado con el control alrededor de un 0,4%. El aumento del rendimiento de aceite con adición de los enzimas ACR y AE1 fue menor que la desviación estándar, por lo que la diferencia no sería significativa. De todos modos expresa una tendencia, aunque el rendimiento verdadero es el que se expresa sobre materia seca, más aún considerando que en los aceites en los que se utilizaron enzimas se extraía más agua y materia orgánica que en el control.

Muestra	Rendimiento graso sobre materia húmeda (% grasa/ materia húmeda)
Control	17,94 ± 0,31
NV1	17,94 ± 0,54
AE1	18,13 ± 0,27
EAO1	17,94 ± 0,54
ACR1	18,13 ± 0,27
NV3	17,94 ± 1,08
AE3	17,56 ± 0,54
EAO3	17,56 ± 0,54
ACR3	18,13 ± 0,27

Tabla 4. Rendimiento graso sobre materia húmeda en la extracción de aceite con los cuatro enzimas en comparación con la extracción sin enzimas (control) (Fuente: elaboración propia).

La Tabla 5 muestra los resultados de grasa, humedad y grasa sobre materia seca determinados por NIR en todos los casos, tanto en las muestras procedentes de la extracción de los aceites con enzimas, como en las muestras control.

Si se compara el contenido en grasa sobre materia seca en la pasta y en los alpeorujos de las muestras control y con enzimas, puede verse que, en la muestra ACR 1 el contenido en grasa sobre materia seca es inferior en 2% al del alpeorujo control, por lo que la extracción de aceite ha sido mayor. En el caso de EAO1 esta diferencia con respecto al control es de 1,1% y para AE1 la diferencia es de 0,4% respecto al control. La muestra NV1 tendría más grasa en el alpeorujo que la muestra control, por lo que el rendimiento de la extracción en este caso habría sido menor.

En las muestras en las que se utilizó una menor concentración de enzima el comportamiento no fue el mismo. Para las muestras ACR3 y NV3 no se observaron diferencias significativas frente al control. En la muestra EAO3 el comportamiento fue igual que a mayor concentración

y en la muestra AE3 el rendimiento fue un 1,5 % mayor que el control (en este caso el efecto fue mayor que con mayor concentración de enzima).

Muestra (Pasta ó alpeorujo)	Grasa sobre materia seca (% grasa / materia seca)	% Grasa	% Humedad	% Materia seca (100-%Humedad)
Pasta	47,2 ± 3,3	24,4 ± 1,2	48,4 ± 1,2	51,6 ± 1,2
Control	15,7 ± 1,7	6,5 ± 0,6	58,3 ± 1,2	41,7 ± 1,2
NV1	17,1 ± 0,5	7,2 ± 0,2	58,1 ± 0,1	41,9 ± 0,1
AE1	15,3 ± 0,6	6,1 ± 0,2	59,8 ± 0,5	40,2 ± 0,5
EAO1	14,6 ± 0,3	5,9 ± 0,1	59,4 ± 0,2	40,6 ± 0,2
ACR1	13,7 ± 0,7	5,3 ± 0,1	61 ± 1,5	39,0 ± 1,5
NV3	15,7 ± 0,2	6,4 ± 0,4	59 ± 3,2	41,0 ± 3,2
AE3	14,2 ± 0,2	5,9 ± 0,1	58,4 ± 1,0	41,6 ± 1,0
EAO3	14,6 ± 0,4	5,8 ± 0,1	60 ± 1,7	40,0 ± 1,7
ACR3	15,6 ± 0,4	6,1 ± 0,3	61 ± 1,2	39,0 ± 1,2

Tabla 5. Grasa, humedad, grasa sobre materia seca y rendimiento sobre materia seca determinados por NIR en la extracción de aceite con los cuatro enzimas en comparación con la extracción sin enzimas (control) (Fuente: elaboración propia).

La Tabla 6 muestra los resultados del % de humedad determinado con la estufa de la materia prima (pasta de aceituna tras la molienda por Abencor) y de los alpeorujos recogidos de la pared de la centrífuga vertical del Abencor para cada extracción. El contenido de humedad de las aceitunas es alrededor del 47%. Debido a este elevado contenido de agua de las aceitunas se debe considerar los rendimientos sobre materia seca, que son más exactos que el rendimiento industrial (sobre materia húmeda).

A partir de los % de humedad se calculó el % de materia seca de la pasta y alpeorujos.

	% Humedad
Pasta	46,9 ± 1,21
Control	58,0 ± 2,58
NV1	56,2 ± 2,44
AE1	55,5 ± 0,83
EAO1	56,6 ± 1,27
ACR1	57,3 ± 1,54
NV3	55,3 ± 1,18
AE3	53,8 ± 0,80
EAO3	55,6 ± 1,76
ACR3	56,4 ± 1,44

Tabla 6. Humedad determinada por estufa de la pasta de aceituna molida y de los alpeorujos de las muestras extraídas con Abencor (Fuente: elaboración propia).

Muestra (pasta ó alpeorujo)	Rendimiento graso sobre materia seca (%)	Grasa sobre materia seca (% grasa/ materia seca)	% Materia Seca (100-%Humedad)
Pasta		37,18 ± 4,54	53,12 ± 1,21
Control	18,7 ± 2,00	18,45 ± 2,00	41,98 ± 2,58
NV1	16,5 ± 1,54	20,64 ± 1,54	43,82 ± 2,44
AE1	20,2 ± 1,30	16,94 ± 1,30	44,52 ± 0,83
EAO1	20,3 ± 1,43	16,91 ± 1,43	43,42 ± 1,27
ACR1	20,3 ± 1,24	16,88 ± 1,24	42,7 ± 1,54
NV3	18,6 ± 1,97	18,58 ± 1,97	44,72 ± 1,18
AE3	20,6 ± 1,27	16,57 ± 1,27	46,17 ± 0,80
EAO3	21 ± 1,00	16,17 ± 1,00	44,44 ± 1,76
ACR3	19,9 ± 1,17	17,25 ± 1,17	43,6 ± 1,44

Tabla 7. Grasa sobre materia seca y rendimiento sobre materia seca determinados por Soxhlet en la extracción de aceite con los cuatro enzimas en comparación con la extracción sin enzimas (control) (Fuente: elaboración propia).

La Tabla 7 muestra los resultados de grasa sobre materia seca determinados por Soxhlet en todos los casos, tanto en las muestras procedentes de la extracción de los aceites con enzimas, como en las muestras control. Si se compara el contenido en grasa sobre materia seca en la pasta y en los alpeorujos de las muestras control y con enzimas, puede verse que, en la muestra ACR 1 el contenido en grasa sobre materia seca es inferior aproximadamente en 1,6% al del alpeorujo control, por lo que la extracción de aceite ha sido mayor. En el caso de EAO1 y AE1 esta diferencia con respecto al control es de 1,5%. La muestra NV1 tendría más grasa en el alpeorujo que la muestra control, por lo que el rendimiento de la extracción en este caso habría sido menor.

En las muestras en las que se utilizó una menor concentración de enzima el comportamiento no fue el mismo. La muestra NV3 presentó un menor rendimiento que la muestra control. En este caso la muestra que presentó el mejor rendimiento fue la EAO3, con un incremento del rendimiento del 2,3% respecto al control sin enzima.

Debido a la gran cantidad de agua de las muestras elaboradas con el enzima, resultan más fiables los resultados obtenidos sobre materia seca ya que en ese caso, se ha eliminado la humedad y todas las muestras están en igualdad de condiciones.

Como puede verse hay una relación entre los resultados obtenidos por NIR y por Soxhlet (excepto en EAO3 y AE3). En realidad los equipos NIR realizan sus calibraciones basándose en el contenido de grasa por Soxhlet.

A la vista de los resultados podría establecerse el siguiente ranking por orden de mayor a menor efectividad en la mejora del rendimiento de extracción:

ACR1> EAO1> AE1> NV1

En el caso de la menor concentración de enzima el ranking no está claro.

No obstante, se confirmaría que el enzima menos eficaz es el NV a cualquiera de las concentraciones, obteniéndose incluso menores rendimientos de extracción con adición de este enzima respecto al control sin enzima.

Podría asumirse una mejoría de los enzimas EAO y AE al disminuir la concentración de la dosis adicionada a la pasta de aceituna, siendo más eficaces en este caso que el enzima ACR (EAO3>AE3>ACR1>EAO1). Por otro lado, el enzima ACR podría disminuir su eficacia al disminuir la concentración de enzima, respecto a la mayor concentración.

En cualquier caso, para poder confirmar estos resultados sería preciso realizar más ensayos experimentales y se debería trabajar con otras concentraciones de enzimas, con objeto de escoger la concentración más idónea.

Además sería deseable, en futuras cosechas, poder realizar los trabajos con aceitunas con menor contenido de agua para poder corroborar los resultados.

Otros autores también encontraron una mejora en el rendimiento de la extracción de aceite de oliva al añadir antes de la etapa de batido enzimas pectolíticos, las cuales presentaban principalmente actividades pectinasas, celulasas y hemicelulasas (Iconomou, Arapoglou y Israilides, 2010; Hadj-Taieb et al., 2012; Chih et al., 2012; Peres, Martins y Ferreira-Dias, 2014; Sharma et al., 2015; Acar y Arslan, 2018; Polari y Wang, 2020).

6. Conclusiones

Las conclusiones que se derivan de la revisión bibliográfica y el ensayo experimental realizado respecto al uso de enzimas como coadyuvantes en la extracción de aceite de oliva son las siguientes:

- El rendimiento de extracción de aceite de oliva aumenta al adicionar los enzimas pectolíticos antes de la etapa de batido, tanto para algunos enzimas usados en el ensayo experimental como con enzimas comerciales mencionados en los estudios científicos.
- La mezcla de diversos enzimas hidrolíticos con actividades pectinasas, celulasas y hemicelulasas resulta más eficaz en dichos aumentos de rendimientos de extracción que el uso de un solo enzima.
- En numerosos estudios científicos se observan aumentos de la calidad del aceite de oliva (aumento de compuestos fenólicos, de la resistencia oxidativa y disminución del % acidez y del índice de peróxidos) al adicionar enzimas pectolíticos.
- Algunos estudios científicos defienden la mejora de la calidad organoléptica de los aceites de oliva extraídos con enzimas pectolíticos (mayor intensidad de atributos sensoriales como afrutado y amargo, debido a incrementos de compuestos fenólicos y volátiles).
- El efecto de los enzimas exógenos en la extracción del aceite de oliva depende de la dosis empleada y del índice de madurez, del contenido en humedad y en enzimas endógenos de las aceitunas empleadas.
- Es necesario realizar más investigaciones al respecto, con el fin de reevaluar la legislación vigente y entender en mayor profundidad los efectos del uso de enzimas como coadyuvantes en la extracción de aceite de oliva.

English conclusión

Originated conclusions from the bibliographic review and the experimental test about the use of enzymes as adjuvants in olive oil extraction are:

- Olive oil extraction yield increases by adding pectolytic enzymes before the malaxation for some enzymes used in the experimental test and also for the commercial enzymes mentioned in the scientific studies.
- The mixture of hydrolytic enzymes that has pectinase, cellulase and hemicellulase activities is more effective in the increase of the extraction yields than the use of a single enzyme.
- In numerous scientific studies, increases of the quality of olive oil are observed (increase in phenolic compounds, oxidative resistance and decrease in % of acidity and peroxide index) by adding pectolytic enzymes.
- Some scientific studies defend the improvement of the organoleptic quality of olive oil extracted with pectolytic enzymes (greater intensity of sensory attributes such as fruity and bitter, due to the increase in phenolic and volatile compounds).
- The effect of exogenous enzymes in the extraction of olive oil depends on the dose used and the maturity index, the moisture content and endogenous enzymes of the olives.
- It is necessary to carry out more scientific research, in order to re-evaluate the current legislation and understand better the effects of the use of enzymes as adjuvants in olive oil extraction.

7. Aportaciones de la asignatura

Durante la realización del Trabajo Fin de Grado, he podido conocer en mayor profundidad los efectos de los enzimas en la extracción de aceite de oliva, gracias al ensayo experimental realizado en la Planta Piloto de la Universidad de Veterinaria de Zaragoza.

Respecto al ensayo experimental, me ha parecido muy interesante tener la posibilidad de estudiar el efecto de este tipo de enzimas, debido a que no suelen usarse en la Unión Europea más que para proyectos de investigación.

El trabajo individual me ha ayudado a ganar práctica y ser más independiente a la hora de realizar las extracciones de aceite o las determinaciones de grasa y humedad.

Además, la búsqueda bibliográfica me ha permitido desarrollar mis capacidades en la búsqueda de información científica y perfeccionar mi nivel de inglés.

8. Evaluación y sugerencias de mejora de la asignatura

La elaboración del Trabajo Fin de Grado requiere una capacidad de organización por parte del estudiante con objeto de planificar eficazmente la realización del mismo, lo que resulta beneficioso para las habilidades de cada uno. Por otra parte, se mejoran las capacidades adquiridas a lo largo del grado, como la capacidad de búsqueda de información y síntesis de la misma o el trabajo práctico en diversas áreas de análisis de los alimentos.

En mi opinión, trabajar y coordinarte con un tutor resulta muy positivo para el estudiante, debido a la orientación del mismo que es necesaria y sirve para adquirir nuevas capacidades en la resolución de problemas y búsqueda de mejores soluciones.

Como punto para mejorar, se podría organizar mejor la parte administrativa del reparto de trabajos para cada estudiante.

9. Bibliografía

Abenoza Giménez, M. (2009). Influencia del grado de maduración en la calidad del aceite de oliva de un cultivo superintensivo. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.

Acar, A. y Arslan, D. (2018). "Investigation of combined ultrasound and microwave pretreatments and enzyme addition on the main phenolics and some quality parameters of olive oil". *Acta Alimentaria (Budapest)*, 47(4), pp. 402-409 DOI: 10.1556/066.2018.47.4.2.

Aparicio, R., Harwood, J. (2003). Manual del aceite de oliva. AMV Ediciones MundiPrensa.

Benito, M., Oria, R. y Sánchez-Gimeno, A.C. (2009). "Effect of the delay in olive processing after harvesting on some physicochemical and nutritional parameters of olive oil from the Racimilla variety". *Grasas y Aceites*, 60(4), pp. 382-387. DOI: 10.3989/gya.010209.

Chih, H.J., James, A.P., Jayasena, V. y Dhaliwal, S.S. (2012). "Addition of enzymes complex during olive oil extraction improves oil recovery and bioactivity of Western Australian Frantoio olive oil". *International Journal of Food Science & Technology*, 47(6), pp. 1222-1228 DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.02962.

Civantos, L. (2008). Obtención del aceite de oliva virgen. Editorial Agrícola Española S.A. 3ª edición.

Consejo Oleícola Internacional (2012). *Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva*. T.15, NC nº 3, Rev. 7. Madrid: COI.

Diario Oficial de las Comunidades Europeas (1991). Reglamento (CEE) nº 2568/1991 de la Comisión, de 11 de Julio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

Diario Oficial de la Unión Europea (2008) Reglamento (CE) nº 640/2008 de la Comisión, de 4 de Julio de 2008, que modifica el Reglamento (CE) nº 2568/1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

Espínola, F. (1996). "Cambios tecnológicos en la extracción del aceite de oliva virgen". *Alimentación, Equipos y Tecnología*. Linares, Jaén. Disponible en: <http://www.ujen.es/huesped/aceite/articulos/cambiote.htm> [Consultado 11-10-2021].

Fitó, M. (2008). "Efecto del aceite de oliva y sus compuestos fenólicos en la reducción del estrés oxidativo y los factores de riesgo cardiovascular". *Endocrinología y Nutrición*, 55(6), pp. 239-242 DOI: 10.1016/S1575-0922(08)70676-4.

Gibson, R.A., Muhlhausler, B. y Makrides, M. (2011). "Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life". *Maternal & Child Nutrition*, 7, pp. 17-26. DOI: 10.1111/j.1740-8709.2011.00299.

Hachicha Hbaieb, R., Kotti, F., García-Rodríguez, R., Gargouri, M., Sanz, C. y Pérez, A.G. (2015). "Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: Correlation with virgin olive oil phenolic profiles". *Food Chemistry*, 174, pp. 240-247 DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.033.

Hadj-Taieb, N., Grati, N., Ayadi, M., Attia, I., Bensalem, H. y Gargouri, A. (2012). "Optimisation of olive oil extraction and minor compounds content of Tunisian olive oil using enzymatic formulations during malaxation". *Biochemical Engineering Journal*, 62, pp. 79-85 DOI: 10.1016/j.bej.2011.04.003

Hermoso, M., Uceda, M., García, A., Morales, B., Frías, M.L., Fernández, A. (1991). *Elaboración del aceite de oliva de calidad*. Consejería de Agricultura y Pesca, Serie Apuntes 5/92. Sevilla, España.

Iconomou, D., Arapoglou, D. y Israilides, C. (2010). "Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing". *Grasas y Aceites*, 61(3), pp. 303-311 DOI: 10.3989/gya.064809.

Martínez-Suárez, J.M., Muñoz, E., Alba, J., Lanzón, A. (1975). Informe sobre utilización del Analizador de Rendimientos Abencor. *Grasas y Aceites*, 26 (6), pp. 379-385.

Moustakime, Y., Hazzoumi, Z. y Amrani Joutei, K. (2016). "Effect of proteolytic activities in

combination with the pectolytic activities on extractability of the fat and phenolic compounds from olives". *SpringerPlus*, 5(1), pp. 1-9 DOI: 10.1186/s40064-016-2367-2.

Najafian, L., Ghodsvali, A., Haddad Khodaparast, M.H. y Diosady, L.L. (2009). "Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes". *Food Research International*, 42(1), pp. 171-175 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.10.002>.

Norma Española UNE-EN ISO 9000:2015. Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario (ISO 9000:2015).

Ortiz, G., Ponce-Mora, M., Nosedá, D., Cazabat, G., Saravalli, C., López, M., Gil, G., Blasco, M. y Albertó, E. (2017). "Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44(2), pp. 197-211 DOI: 10.1007/s10295-016-1873-0.

Peres, F., Martins, L.L. y Ferreira-Dias, S. (2014). "Laboratory-scale optimization of olive oil extraction: Simultaneous addition of enzymes and microtalc improves the yield". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(8), pp. 1054-1062 DOI: 10.1002/ejlt.201400060.

Polari, J.J. y Wang, S.C. (2020). "Comparative Effect of Hammer Mill Screen Size and Cell Wall-Degrading Enzymes During Olive Oil Extraction". *ACS Omega*, 5(11), pp. 6074-6081 DOI: 10.1021/acsomega.0c00036.

Sari, H. y Ekinici, R. (2017). "The effect of ultrasound application and addition of leaves in the malaxation of olive oil extraction on the olive oil yield, oxidative stability and organoleptic quality". *Food Science and Technology (Campinas)*, 37 DOI: 10.1590/1678-457x.22916.

Sharma, R., Sharma, P.C., Rana, J.C. y Joshi, V.K. (2015). "Improving the Olive Oil Yield and Quality Through Enzyme-Assisted Mechanical Extraction, Antioxidants and Packaging". *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(2), pp. 157-166 DOI: 10.1111/jfpp.12216.

Tamborrino, A., Romaniello, R., Caponio, F., Squeo, G. y Leone, A. (2018). "Combined industrial olive oil extraction plant using ultrasounds, microwave, and heat exchange: Impact on olive oil quality and yield". *Journal of Food Engineering*, 245 DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2018.10.019.

Vierhuis, E., Korver, M., Schols, H.A. y Voragen, A. (2003). "Structural characteristics of pectic polysaccharides from olive fruit (*Olea europaea* cv moraiolo) in relation to processing for oil extraction". *Carbohydrate Polymers*, 51, pp. 135-148 DOI: 10.1016/S0144-8617(02)00158-3.

Páginas webs

MC2 Ingeniería y Sistemas S.L. (2021). MC2 Ingeniería y Sistemas S.L. Disponible en: <https://mc2insiste.com/esp/> [Consultado 14-11-2021].