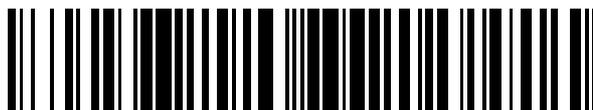


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 992**

51 Int. Cl.:

C12G 1/00 (2006.01)

C12G 3/00 (2006.01)

C12H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2010 E 10790777 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2513283**

54 Título: **Método para filtración de vino**

30 Prioridad:

14.12.2009 IN CH30792009

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

27.05.2014

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (50.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK y
LAFFORT SAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CANAL-LLAUBERES, ROSE-MARIE;
DASGUPTA, AINDRILA y
REYNOU, GAËLLE**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 462 992 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

Método para filtración de vino

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] Esta solicitud se refiere al campo de filtración de vino. Más particularmente, esta solicitud se refiere al uso de enzimas para la mejora de la filtrabilidad del vino.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 [0002] Un paso importante durante la fabricación de vino es la filtración del vino. Los polisacáridos en el vino, debido a su tamaño y naturaleza coloidal, se conocen por complejar con proteínas y polifenoles contribuyendo a la turbidez en el vino y también causan dificultades durante la clarificación y filtración. Los diferentes polisacáridos en el vino incluyen pero de forma no limitativa celulosa, pectina, glucano etc. Estos polisacáridos son derivados del zumo o mosto a partir del que el vino es hecho y son también a veces productos de actividad microbiana.

20 [0003] Muchos procesos y materiales se conocen por ser usados durante la fabricación y filtración de vino para eliminar estos polisacáridos y mejorar filtrabilidad. Por ejemplo, uso de agentes de clarificación, filtros, equipamientos de filtración, enzimas etc. Agentes de clarificación tal como caseína, cola de pescado, albúmina, gelatina, bentonita y otros materiales de poliamida se usan comúnmente antes o durante el proceso de filtración para eliminar las partículas coloidales. También se conocen enzimas como pectinasas y glucanasas que hidrolizan estos polisacáridos, mejorando así la filtrabilidad.

25 [0004] Todavía existe una necesidad de procesos mejorados para filtración de vino.

RESUMEN DE LA INVENCION

30 [0005] En un aspecto, la invención se refiere a un método de mejora de la filtrabilidad en la filtración de vino que comprende:

a) proporcionar una solución de vino crudo;

35 b) poner en contacto la solución de vino crudo con

i. una beta-1,3-glucanasa;

ii. una poligalacturonasa;

40 iii. una pectín liasa;

iv. una pectinesterasa;

45 v. una endoarabinasa;

c) obtener el vino filtrado.

[0006] En un aspecto, la poligalacturonasa i obtenible por fermentación sumergida.

50 [0007] En otro aspecto, la pectín liasa es obtenible por fermentación de superficie.

[0008] En un aspecto, la poligalacturonasa y/o pectín liasa es obtenible de *Aspergillus*.

55 [0009] En otro aspecto, la poligalacturonasa y/o pectín liasa y/o pectinesterasa y/o endoarabinasa es obtenible de *Aspergillus*.

[0010] En un aspecto, el *Aspergillus* es *A. Niger*, mientras en otro aspecto, es *A. japonicus*.

60 [0011] En un aspecto, el proceso comprende además poner en contacto el vino crudo con una pectinesterasa.

[0012] En un aspecto, la concentración de la pectinesterasa es al menos 15 unidades/litro.

[0013] En un aspecto, el proceso comprende además poner en contacto el vino crudo con una endoarabinanasa.

65 [0014] En otro aspecto, la concentración de endoarabinanasa es al menos 0,10 unidades/litro.

[0015] En un aspecto, el método produce filtrabilidad mejorada en al menos un 30 % en comparación con una filtración hecha en ausencia de las enzimas adicionadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0016] Vitivinicultura, o vinificación, es el proceso de producción de vino, partiendo de una selección de las uvas y finalizando con el embotellado del vino final. Vitivinicultura implica diferentes procesos que incluyen, pero de forma no limitativa, la selección de uvas y sus variedades, su cosecha y destallado, trituración y fermentación primarias, fermentación secundaria, maduración, mezcla y clarificación, filtración, estabilización fría y embotellado.

[0017] En resumen, un proceso de fabricación de vino típico puede ser descrito como a continuación:

[0018] Las uvas se cosechan y se seleccionan manualmente o utilizando segadores mecánicos. Las uvas son luego generalmente molidas, destalladas y se permite que experimenten fermentación primaria. Durante la fermentación primaria, levadura, que está normalmente ya presente en las uvas o se añade externamente como un cultivo, se alimenta de los azúcares en el mosto (pulpa de fruta) y se multiplica, produciendo dióxido de carbono y alcohol. Si se desea, azúcar adicional es también adicionado (chaptalización). Durante o después del proceso de fermentación alcohólica, una fermentación maloláctica donde ácido málico se convierte en el ácido láctico por bacterias también puede tener lugar. Después de la fermentación primaria, el producto de vino o vino crudo se somete luego a fermentación secundaria y proceso de maduración, que tarda normalmente alrededor de 3-6 meses o hasta 18 meses para vinos de envejecimiento largo. Durante esta fase, el vino se mantiene en condiciones anaeróbicas o condiciones casi anaeróbicas para prevenir oxidación. Después de la fermentación secundaria, el vino es también trasegado para separarlo del poso. El trasegado es el proceso de sifonaje del vino fuera del poso en un tambor o tanque nuevo, limpio para permitir la clarificación y ayudar a la estabilización. Posos se refiere a depósitos de levadura muerta o levadura residual y otras partículas que precipitan, o se soportan por la acción del "clarificado", al fondo de una artesa de vino después de la fermentación y envejecimiento. El proceso de trasiego se repite varias veces durante el envejecimiento de vino. Durante cualquier tiempo después maduración, el vino se somete al proceso de estabilización fría. Durante el proceso de estabilización fría, la temperatura del vino, se disminuye hasta cerca de la congelación durante 1-2 semanas. Esto causa que los cristales de tartrato se separen del vino y se adhieran a los lados del recipiente de retención. Cuando el vino es drenado de los recipientes, los tartratos se dejan detrás o el vino se filtra para asegurar eliminación. Durante el proceso de estabilización de proteínas, las proteínas inestables se eliminan por adsorción sobre agentes de clarificación como bentonita, impidiendo que estas precipiten en el vino embotellado. Después de la fermentación secundaria, el vino se somete a mezcla y clarificación. Durante el mezclado, los vinos de distintos lotes y/o uvas diferentes se mezclan juntos para conseguir un sabor consistente. Durante la clarificación, agentes denominados agentes de clarificación se utilizan para eliminar taninos, reducir astringencia y eliminar partículas microscópicas que podrían enturbiar los vinos. Agentes de clarificación comúnmente usados incluyen pero de forma no limitativa gelatina, caseinato de potasio, claras de huevo, albúmina de huevo, carbón animal, sangre del toro, cola de pescado (vejiga de esturión), PVPP, leche desnatada en polvo, extracto de yema de huevo, bentonita (un filtro basado en arcilla volcánica) etc. Después de la mezcla y clarificación, el vino se trata con conservantes como dióxido de azufre y sorbato de potasio y se somete a filtración. La filtración es el proceso por el que el material granuloso del vino se elimina por el paso del vino a través de una serie de filtros. Hay diferentes tipos de filtraciones que se realizan incluyendo pero no limitando a filtración de profundidad o filtración de flujo cruzado. Durante la filtración de profundidad, el vino se empuja a través de filtros hechos de celulosa o tierra diatomea. En la filtración de flujo cruzado, el vino se pasa en la superficie de filtros, por ejemplo, en una orientación paralela (flujo transversal). Después de la filtración, el vino es a veces estéril filtrado a través de las membranas de 0.65 o 0.45 micras antes de que el vino sea embotellado y comercializado.

[0019] Es comúnmente supuesto que los polisacáridos presentes en el vino pueden causar complejos con proteínas y taninos y así formar complejos coloidales, que pueden causar problemas durante la filtración del vino. Los polisacáridos comúnmente encontrados en el vino incluyen pero de forma no limitativa celulosa, hemicelulosas y pectinas que son polisacáridos estructurales que surgen de la pared celular vegetal. Otros tipos de polisacáridos incluyen pero de forma no limitativa los glucanos que están presentes en las paredes celulares de los microorganismos que forman parte de la fabricación de vino, principalmente el *Saccharomyces* de levadura, usado durante la fermentación y también el *Botrytis* de hongo, que es un contaminante a veces presente en la superficie de uva, comúnmente denominado mohos gris.

[0020] La presencia de estos polisacáridos en el vino supone dificultades técnicas durante la fabricación del vino por ejemplo, estos pueden atascar el material de filtro y así vinos que contienen una cantidad relativamente grande de polisacáridos son más difíciles de filtrar que aquellos vinos que tienen cantidades menores de estos. De hecho, la filtración toma sustancialmente más tiempo y puede usar de cinco a diez veces más placas de filtro que el caso con un vino normal.

[0021] Se ha supuesto que la dificultad de filtración es principalmente atribuible al glucano presente como un coloide en el vino. El glucano presente en el vino es un beta-glucano con una cadena principal 1,3-beta-glucano y cadenas laterales 1.6-beta-enlazadas (beta 1.3-1.6 glucano) con un peso molecular medio de aproximadamente 1 millón Dalton.

[0022] Varias enzimas han sido usadas para hidrolizar los polisacáridos presentes en el vino de modo que la filtrabilidad del vino es mejorada.

5 [0023] Los inventores han encontrado sorprendentemente que un tratamiento de una preparación de vino crudo con una beta 1,3 glucanasa, una poligalacturonasa y una pectín liasa mejora inmensamente la filtrabilidad cuando se compara con una preparación de vino crudo que no se trata con estas enzimas.

10 [0024] Los inventores han encontrado sorprendentemente también que un tratamiento de una preparación de vino crudo con una beta 1,3- glucanasa, una poligalacturonasa, una pectín liasa, una pectinesterasa y una endoarabinanasa mejora inmensamente la filtrabilidad cuando se compara con una preparación de vino crudo que no se trata con estas enzimas.

[0025] Así la invención se refiere a un método de mejora de la filtrabilidad en la filtración de vino que comprende:

15 a) proporcionar una solución de vino crudo;

b) poner en contacto la solución de vino crudo con

20 i. una beta 1,3 glucanasa;

ii. una poligalacturonasa;

iii. una pectín liasa;

25 iv. una pectinesterasa;

v. una endoarabinanasa;

30 c) obtener el vino filtrado.

[0026] "Vino crudo" según esta invención denota un vino en cualquier fase entre el primer trasiego y antes de la filtración final, antes del embotellado, en el proceso de fabricación de vino.

Beta 1.3 Glucanasa (EC 3.2.1.58)

35 [0027] Beta 1,3 glucanasas catalizan la hidrólisis sucesiva de unidades de beta-D-glucosa de los extremos no reductores de (1->3)beta-D-glucanos, liberando alfa glucosa. Estas enzimas son también alternativamente denominadas glucano 1.3-beta- glucosidasa, exo-1.3-beta-glucanasa o exo-1.3-beta-glucosidasa.

40 [0028] Glucanos se conocen en la técnica. Ellos son polisacáridos de monómeros de D-glucosa enlazados por enlaces O-glicosídicos. En base al tipo de enlaces O-glicosídicos, pueden ser alfa-glucanos y beta-glucanos. Ejemplos de alfa-glucanos incluyen pero no limitado a dextrano, almidón, pululano etc. Ejemplos de beta-glucanos incluyen pero no están limitados a celulosa, laminarín etc. En base a los átomos de carbono que participan en los enlaces, los glucanos pueden tener 1-3,1-4 o 1-6 tipos de enlaces. Por ejemplo, la celulosa contiene enlaces beta 1-4, el dextrano contiene enlaces alfa 1-6, el laminarín contiene tanto enlaces beta 1-3 como beta 1-6.

[0029] Una beta 1.3 glucanasa preferida es Glucanex[®] disponible de Novozymes A/S, Dinamarca

50 [0030] La actividad de glucanasa se determina colorimétricamente al reaccionar con ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico alcalino y luego calefacción a 100°C. El color amarillo-marrón resultante es medido utilizando un espectrofotómetro a 540 nm.

55 [0031] Una unidad de Beta glucanasa (BGXU) corresponde a la cantidad de enzima requerida para producir 1 micromol de azúcares reductores por minuto bajo condiciones estándar (incubación a 30°C durante 10 minutos a pH 4,40).

[0032] Preferiblemente la 1,3 beta glucanasa está presente en el rango de al menos aproximadamente 5 unidades, tal como al menos aproximadamente 10 unidades, tal como al menos aproximadamente 15 unidades, tal como al menos aproximadamente 20 unidades, tal como al menos aproximadamente 25 unidades, tal como al menos aproximadamente 30 unidades, tal como al menos aproximadamente 35 unidades, tal como al menos aproximadamente 40 unidades, tal como al menos aproximadamente 45 unidades, tal como al menos aproximadamente 50 unidades, tal como al menos aproximadamente 55 unidades, tal como al menos aproximadamente 60 unidades, tal como al menos aproximadamente 65 unidades, tal como al menos aproximadamente 70 unidades por litro del vino crudo.

65

Poligalacturonasa (EC 3.2.1.15)

[0033] Las poligalacturonasas son pectinasas que catalizan la hidrólisis aleatoria de enlaces (1,4)-alfa-D-galactosidurónicos en el pectato y otros galacturonanos. Ellos son también denominados pectina depolimerasa.

[0034] Una poligalacturonasa preferida es Pectinex Ultra® disponible de Novozymes A/S.

[0035] La poligalacturonasa hidroliza los enlaces alfa-1,4-glicosídicos en el ácido poligalacturónico con la resultante liberación de ácido galacturónico. Este azúcar reductor reacciona luego con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El cambio de color producido debido a la reducción de DNS es proporcional a la cantidad de ácido galacturónico liberado, que en suma es proporcional a la actividad de poligalacturonasa en la muestra.

[0036] Una unidad de poligalacturonasa (PGNU) es definida como la cantidad de enzima que produce 1 mg de sal de sodio de ácido galacturónico bajo condiciones estándar (tampón acetato, pH 4,5, 40 °C, 10 min tiempo de reacción, 540 nm)

[0037] Preferiblemente, poligalacturonasas están presentes en una cantidad de al menos 20 unidades por litro, tal como al menos 25 unidades por litro, tal como al menos 30 unidades por litro, tal como al menos 35 unidades por litro, tal como al menos 40 unidades o tal como al menos 45 unidades o tal como al menos 50 unidades o tal como al menos 55 unidades tal como al menos 60 unidades por litro de vino crudo.

Pectín liasas (EC 4.2.2.10)

[0038] Las pectín liasas son pectinasas que catalizan la escisión eliminativa del éster metílico (1,4)-alfa-D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-deoxi-6-O-metil-alfa-D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. Ellas son alternativamente denominadas Pectoliasa, Polimetilgalacturónico transeliminasa, pectina metiltranseliminasa, pectina trans- eliminasa etc.

[0039] Una pectín liasa preferida es Neopectinasa PL-1 disponible de Novozymes A/S.

[0040] La reacción enzimática de pectín liasa consiste en romper el enlace alfa 1-4 galacturonosidilo produciendo delta 4,5 urónido insaturado. El enlace doble con función de carbonilo en C6 tiene una absorción en U.V. La densidad óptica a 235 nm ensaya la actividad de pectín liasa.

[0041] Una unidad de pectín liasa (PL) es la cantidad de enzima que cataliza la división de endo alfa 1-4 galacturonosidilo ligado (C6 éster metílico) que forma un micromol de producto delta 4,5 insaturado en un minuto, según condiciones descritas de 45°C y pH 5,5.

[0042] Preferiblemente, pectín liasas están presentes en una cantidad al menos 2,0 unidades por litro de vino crudo tal como al menos 2,5 unidades o tal como al menos 3,0 unidades o tal como al menos 3,5 unidades o tal como al menos 4,0 o tal como al menos 4,5 unidades o tal como al menos 5,0 unidades o tal como al menos 5,5 unidades o tal como al menos 6,0 unidades o tal como al menos 6,5 unidades o tal como al menos 7,0 unidades o tal como al menos 7,5 unidades o tal como al menos 8,0 unidades o tal como al menos 8,5 unidades o tal como al menos 9,0 unidades, tal como al menos 9,5 unidades, tal como al menos 10,0 unidades, tal como al menos 10,5 unidades, tal como al menos 11,0 unidades, tal como al menos 11,5 unidades, tal como al menos 12,0 unidades, tal como al menos 12,5 unidades, tal como al menos 13,0 unidades, tal como al menos 13,5 unidades, tal como al menos 14,0 unidades, tal como al menos 14,5 unidades, tal como al menos 15,0 unidades, tal como al menos 15,5 unidades, tal como al menos 16,0 unidades, tal como al menos 16,5 unidades, tal como al menos 17,0 unidades, tal como al menos 17,5 unidades, tal como al menos 18,0 unidades, tal como al menos 18,5 unidades, tal como al menos 19,0 unidades, tal como al menos 19,5 unidades, tal como al menos 20,0 unidades, tal como al menos 22,0 unidades, tal como al menos 24,0 unidades, tal como al menos 26,0 unidades, tal como al menos 28,0 unidades, tal como al menos 30,0 unidades, tal como al menos 32,0 unidades, tal como al menos 34,0 unidades, tal como al menos 36,0 unidades, tal como al menos 38,0 unidades, tal como al menos 40,0 unidades, tal como al menos 42,0 unidades, tal como al menos 44,0 unidades, tal como al menos 46,0 unidades, tal como al menos 48,0 unidades, tal como al menos 50,0 unidades, tal como al menos 52,0 unidades, tal como al menos 54,0 unidades, tal como al menos 56,0 unidades, tal como al menos 58,0 unidades, tal como al menos 60,0 unidades, tal como al menos 62,0 unidades, tal como al menos 64,0 unidades, tal como al menos 66,0 unidades, tal como al menos 68,0 unidades, tal como al menos 70,0 unidades, tal como al menos 72,0 unidades, tal como al menos 74,0 unidades, tal como al menos 76,0 unidades, tal como al menos 78,0 unidades, tal como al menos 80,0 unidades, tal como al menos 82,0 unidades, tal como al menos 84,0 unidades, tal como al menos 86,0 unidades, tal como al menos 88,0 unidades, tal como al menos 90,0 unidades, tal como al menos 92,0 unidades, tal como al menos 94,0 unidades, tal como al menos 96,0 unidades, tal como al menos 98,0 unidades, tal como al menos 100,0 unidades, tal como al menos 102,0 unidades, tal como al menos 104,0 unidades, tal como al menos 106,0 unidades, tal como al menos 108,0 unidades, tal como al menos 110,0 unidades, tal como al menos 112,0 unidades, tal como al menos 114,0 unidades, tal como al menos 116,0 unidades, tal como al menos 118,0 unidades, tal como al menos 120,0 unidades, tal como al menos 122,0 unidades, tal como al menos 124,0 unidades, tal como al menos 126,0 unidades, tal como al menos 128,0 unidades,

tal como al menos 130,0 unidades, tal como al menos 132,0 unidades, tal como al menos 134,0 unidades, tal como al menos 136,0 unidades, tal como al menos 138,0 unidades, tal como al menos 140,0 unidades, tal como al menos 142,0 unidades, tal como al menos 144,0 unidades, tal como al menos 146,0 unidades, tal como al menos 148,0 unidades, tal como al menos 150,0 unidades, por litro de vino crudo.

5 [0043] En base a la naturaleza de los organismos usados en el proceso de fermentación, las enzimas pueden también tener o no tener otras actividades, normalmente denominadas el "actividades secundarias". Por ejemplo, si el organismo usado es un organismo aislado de origen natural, es muy probable que la fracción de enzimas también contenga otras actividades secundarias que están presentes además de la actividad principal. En el caso de que el organismo usado sea un organismo que es un organismo modificado genéticamente, modificado con el gen que codifica la enzima de interés, es muy probable que la fracción enzimática no contenga ninguna actividad secundaria significativa, además de la actividad principal.

15 [0044] En un aspecto, la poligalacturonasa es obtenible de fermentación sumergida.

[0045] La fermentación sumergida (SmF) se conoce en la técnica e incluye un proceso de crecimiento de un microorganismo en un medio líquido. La fermentación sumergida es también alternativamente denominada fermentación líquida sumergida o fermentación sumergida.

20 [0046] En un aspecto, la pectín liasa es obtenible de fermentación de superficie.

[0047] En otro aspecto, la pectín liasa y/o pectinesterasa y/o endoarabinanasa es obtenible de fermentación de superficie.

25 [0048] La fermentación en estado sólido también llamada fermentación de superficie (SSF) se conoce en la técnica y es un proceso por el cual un sustrato insoluble o matriz sólida se fermenta con humedad suficiente pero sin estar sumergida en el agua. Es decir, implica crecimiento de microorganismos en partículas sólidas húmedas, en situaciones en las que los espacios entre las partículas contienen una fase gaseosa continua y un mínimo de agua visible. Es también conocida como fermentación de sustrato sólido. La mayor parte de los procesos SSF son aeróbicos y así el término fermentación en el contexto de SSF se entiende que significa "cultivo controlado de organismos". Procesos y equipo para fermentación en estado sólido se conocen en la técnica. Por ejemplo, una referencia útil es Mitchell D.A. et al., 2006, Solid-State Fermentation Bioreactors, publicado por Springer Berlin Heidelberg.

35 [0049] Filtración es el proceso de separación del material granuloso no disuelto del resto de la suspensión por paso de la suspensión a través de un filtro o una serie de filtros. La filtración se puede considerar un tipo de proceso de clarificación. Filtrabilidad es una propiedad de una solución o suspensión, que hace que esta sea tratable por filtración.

40 [0050] Organismos de producción de pectinasa se conocen en la técnica. Ellos incluyen microorganismos y plantas más altas. Los microorganismos incluyen bacterias, levadura y hongos. Por ejemplo, el género *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Erwinia* etc son todos conocidos por producir enzimas de pectinasa. El procedimiento para la realización de las fermentaciones de estado sólido y sumergido para muchos de estos organismos es también conocido en la técnica.

45 [0051] En un aspecto de la invención, la poligalacturonasa y/o pectín liasa es obtenible de *Aspergillus*.

[0052] En un aspecto de la invención, la poligalacturonasa y/o pectín liasa y/o pectinesterasa y/o endoarabinanasa es obtenible de *Aspergillus*.

50 [0053] *Aspergillus* se conoce en la técnica. Es un género de hongos que pertenece a la familia Trichocomaceae del orden Eurotiales [Howard, HD, Pathogenic Fungi in Humans and Animals, 2nd edition Pathogenic Fungi in Humans and Animals, pp 240]. *Sterigmatocistis* es un sinónimo obsoleto de este género. Más de 150 especies del género *Aspergillus* se conocen en la técnica. Estos incluyen pero se limitan a *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus japonicus* etc.

55 [0054] En una forma de realización preferida, la poligalacturonasa y/o pectín liasa y/o pectinesterasa y/o endoarabinanasa es obtenible de *Aspergillus niger*. En otra forma de realización preferida, ellos son obtenibles de *Aspergillus japonicus*.

60 [0055] En un aspecto, la invención comprende además poner en contacto el vino crudo con una pectinesterasa.

[0056] En otro aspecto, la invención comprende además poner en contacto el vino crudo con una pectinesterasa y/o una endoarabinanasa.

65

Pectín esterasa (EC 3.1.1.11)

[0057] Pectín esterasas son pectinasas que hidrolizan pectina en metanol y pectato. Ellas son alternativamente también denominadas pectín demetoxilasa, pectín metoxilasa, pectín metilesterasa etc.

5 [0058] Pectín esterasa cataliza la liberación de metanol a partir de pectina con una reducción resultante del pH. Hidróxido sódico se añade para mantener el pH a 4.5. La cantidad de hidróxido sódico consumida es una indicación de la actividad enzimática.

10 [0059] Una pectín esterasa preferida es la pectín esterasa presente en la Neopectinasa PL-1 disponible de Novozymes A/S.

[0060] Una unidad de actividad PE es esa cantidad de enzima que consume 1 micro equivalente de hidróxido sódico por minuto bajo condiciones estándar [30 °C, pH 4,5].

15 [0061] En un aspecto, la pectinesterasa está presente a una concentración de al menos 2 unidades por litro de vino crudo, tal como al menos 5 unidades, o al menos 10 unidades o al menos 15 unidades por litro de la solución de vino. Más preferiblemente está presente a una concentración de al menos 20 unidades, tal como al menos 25 unidades o al menos 30 unidades, o al menos 35 unidades o al menos 40 unidades o al menos 45 unidades o al menos 50 unidades o al menos 55 unidades o al menos 60 unidades o al menos 65 unidades o al menos 70 unidades o al menos 75 unidades, o al menos 80 unidades o al menos 85 unidades o al menos 90 unidades o al menos 95 unidades o al menos 100 unidades o al menos 105 unidades o al menos 110 unidades o al menos 115 unidades o al menos 120 unidades por litro de vino crudo.

25 [0062] En un aspecto, la invención comprende además poner en contacto el vino crudo con una endoarabinanasa.

Endoarabinanasas (EC 3.2.1.99)

30 [0063] Endoarabinanasas son enzimas que catalizan la endohidrólisis de enlaces (1,5)-alfa-arabinofuranosídicos en (1,5)-arabinanos. Ellas son alternativamente también llamadas arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa o Endo-1,5-alfa-L- arabinanasa.

[0064] Endoarabinanasa es evaluada utilizando el sustrato arabinano sin ramificar entrecruzado con azurina (arabinano AZCL), disponible comercialmente como comprimidos de Arabinazyme (disponibles de Megazyme International, Ireland Ltd, Wicklow, Irlanda).

35 [0065] Una endoarabinanasa preferida es la endoarabinanasa presente en la Neopectinasa PL-1 disponible de Novozymes A/S.

40 [0066] Una unidad de actividad de endoarabinanasa es definida como la cantidad de enzima requerida para liberación 1 umol de equivalentes de azúcar reductor de arabinosa de carboxi metil (CM)-arabinano lineal por minuto bajo las condiciones de ensayo definidas [40 °C, pH 4,0].

45 [0067] En un aspecto, la endoarabinanasa está presente a una concentración de al menos 0,1 unidades por litro de la solución de vino crudo. Más preferiblemente está presente a una concentración de al menos 0.15 unidades, tal como al menos 0.2 unidades o al menos 0.25 unidades, o al menos 0.3 unidades o al menos 0.35 unidades por litro de vino crudo.

50 [0068] Las enzimas se pueden adicionar como composiciones enzimáticas. Ellas pueden consistir en una enzima o más de una enzima. La composición enzimática, además de la(s) enzima(s), también puede contener al menos una otra sustancia, por ejemplo pero no limitado a disoluciones tampón, surfactantes etc. Las composiciones enzimáticas pueden estar en cualquier forma reconocida en la técnica, por ejemplo, sólida, líquida, emulsión, gel, o pasta. Tales formas se conocen por el experto en la materia en la técnica. En un aspecto de la invención más de una composición enzimática, cada una conteniendo enzimas diferentes pueden ser adicionadas. En otro aspecto de la invención, una composición enzimática que contiene todas las enzimas necesarias puede ser adicionada. En otro aspecto de la invención, una composición enzimática con un poco de las enzimas y al menos una otra composición que contiene alguna o todas del resto de las enzimas pueden ser adicionadas. Las enzimas se pueden adicionar al vino crudo en cualquier punto de tiempo entre el primer trasiego y la filtración final. Las enzimas se pueden adicionar al mismo tiempo o en la secuencia de una en una o incluso como una combinación de dos enzimas y una enzima separadamente, una después de la otra.

[0069] En un aspecto, la poligalacturonasa y la pectín liasa están presentes como una combinación y la beta glucanasa se añade separadamente.

65 [0070] En otro aspecto, la glucanasa beta y la poligalacturonasa están presentes como una combinación y la pectín liasa se añade separadamente.

[0071] En un aspecto, la poligalacturonasa, la pectín liasa, la pectinesterasa y la endoarabinanasa están presentes como una combinación y la glucanasa beta se añade separadamente.

5 [0072] Es generalmente preferido que las enzimas sean agregadas antes del tratamiento de bentonita, si lo hay, ya que la bentonita puede adsorber las enzimas y así evitar su actividad.

10 [0073] La cantidad de las enzimas que debe ser usada generalmente dependerá de los requisitos específicos y en la enzima específica. Es generalmente visto que 5-75 unidades de beta 1.3 glucanasa y 20-60 unidades de poligalacturonasa y 15- 150 unidades de pectín liasa por 1000 ml de vino crudo son generalmente suficientes. La duración de tratamiento y rango de temperatura del mismo no son críticos pero el tratamiento normalmente sería de 24 horas a una semana, a una temperatura en el rango de 5-15° C. La acción enzimática es dependiente del tiempo de tratamiento y dosificación y, por lo tanto, prolongación del tiempo para tratamiento enzimático a una semana o más permitirá una reducción de dosificación con relación a un tiempo de tratamiento de 24 horas. Además, mientras la actividad enzimática es aceptable, pero no necesariamente óptima sobre todo el rango de pH, el pH del vino o el mosto sí que afecta a la actividad y, por lo tanto, el tratamiento a un pH menor del óptimo requerirá una dosificación aumentada respecto a un tratamiento a pH óptimo. A modo de ejemplo, la enzima a 2 gramos por hectolitro tiene un efecto bueno en una semana, igual que 4 gramos por hectolitro en 48 horas, ambas a temperatura ambiente y el pH natural de los vinos.

20 [0074] En un aspecto de la invención, la filtrabilidad de vino crudo se mejora por al menos 20 % o 25 % o 30 % o 35 % o 40 % o 45 % o 50 % o 55 % o 60 % o 65 % o 70 % o 75 % o 80 % o incluso 85 % o incluso 90 % o incluso 95 % o incluso 100 % en comparación con una filtración hecha en ausencia de las enzimas adicionadas. Hay métodos diferentes de filtración conocidos en la técnica. Ejemplos incluyen pero de forma no limitativa filtración gruesa, filtración en placa y bastidor, filtración de membrana, micro filtración (flujo cruzado), y filtración estéril, etc.

25 [0075] En un aspecto de la invención, la filtración de vino comprende una filtración en diatomita y/o placa y/o bastidor y/o flujo cruzado.

30 [0076] Filtración de diatomita implica uso de tierra diatomacea disponible comercialmente como, por ejemplo, diatomita o celita o dicalite y una pantalla de soporte para eliminar partículas grandes de materia.

[0077] Filtración de placa y bastidor, también llamada filtración de almohadilla u hoja, emplea una hoja de medio de filtro (tela o material de celulosa) entremedias de placas que son luego apretadas por tornillo o métodos hidráulicos.

35 [0078] Filtración de membrana usa membranas hechas de, por ejemplo, policarbonato, polisulfona o incluso polipropileno de tamaños de poros variables para eliminar partículas suspendidas. Filtración de ultra membrana y filtración de membranas estéril utilizan membranas de tamaño de poros muy pequeño para eliminar microorganismos.

40 [0079] Filtración de flujo cruzado es un tipo de filtración en la que el fluido que debe ser filtrado pasa rápidamente a través de la superficie del filtro, con sólo una fracción penetrando a través de la membrana conforme se filtra. Este tipo de filtración es diferente del método de filtración de flujo perpendicular tradicional que implica que todo el fluido pase a través del medio de filtro.

45 EJEMPLOS

Ejemplo 1

50 [0080] Vinos de diferentes colores (rojo, blanco, rosado) y de diferentes procesos de vitivinicultura (maduración corta, maduración larga, termo tratado) fueron evaluados en escala de laboratorio, escala de piloto y gran escala para controlar el rendimiento de diferentes enzimas en la mejora de filtrabilidad. Todos los experimentos a escala laboratorio se llevaron a cabo en matraces de 1.5 litros (mágnun). Cada mágnun se llenó de una muestra de vino bien homogeneizada. Inicialmente la muestra de vino se analiza en cuanto a turbidez (NTU: unidades de turbidez de nefelométrica) y filtrabilidad (CFLA: criterio de filtración Lamote-Abiet) antes de la adición enzimática. El equipamiento usado para medir CFLA es el mismo equipamiento usado para medir el índice de densidad de sedimentos desarrollado por Laurenty en 1972. La turbidez se mide directamente en la muestra de vino que utiliza un turbidímetro Hach y el valor que se lee en el equipamiento se expresa en NTU. Si está muy turbio, el vino se deposita antes de tomar una muestra para medición de turbidez. La filtrabilidad fue medida utilizando un recipiente de filtración bajo 1 bar de presión, filtrando 1000 ml de vino a través de membranas de 5.0, 1.2, o 0.65 micras de 25 mm de diámetro. Las membranas están disponibles de Millipore™. Una prueba de permeabilidad al agua fue realizada para verificar el buen funcionamiento de las membranas (repetibilidad) antes de la filtración de la muestra de vino. Vinos gruesos fueron normalmente filtrados a través de filtros de 5 micras. El volumen de vino filtrado fue monitorizado a lo largo del tiempo de 0 a 5 minutos en una escala de laboratorio que utiliza un cronómetro en segundos. La curva de filtración obtenida fue recuperada como una recta de filtración. La filtrabilidad sigue la ley de filtración de bloque progresivo de los poros. La pendiente de la recta de filtración se refiere a la filtrabilidad de vino. Define el índice de filtrabilidad llamado CFLA. Cuanto más bajo es el valor, mejor es la filtrabilidad. Luego los

mágnums fueron tratados con varias combinaciones de enzimas. Las glucanasas fueron adicionadas en forma de Glucanex®, una combinación de glucanasa y poligalacturonasa se obtuvo usando Vinoflow G®. Las pectín liasas fueron adicionadas como neopectinasa PL-1® (todas las enzimas están disponibles de Novozymes A/S). Un mágnum no fue tratado con enzima (muestra control). Los vinos se mantuvieron a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C) durante una semana. Después de una semana, las muestras de vino fueron cuidadosamente trasegadas de su sedimento (tubo blando de plástico dentro del mágnum y aspiración suave para eliminar el vino sin mezclar el sedimento). Después del tratamiento, los vinos fueron analizados nuevamente en cuanto a turbidez (NTU) y filtrabilidad (CFLA) y filtrados a través de filtro de 0.65, 1.2 o 5 micras (filtro millipore) bajo 1 bar de presión. Durante experimentos de escala piloto, las muestras fueron mantenidas bajo condiciones de vino (es decir, temperaturas de bodega de 5°C a 10-13°C) mientras en los ensayos de gran escala, volúmenes grandes de vinos (300 hl a 1200 hl) fueron usados. Los resultados de una prueba tal se dan en tabla 1.

Tabla 1: Efecto de la combinación de enzimas en la filtración del vino

	CFLA 0.65	CFLA 1.2	CFLA 5.0	NTU % reducción	Glucanasa BGXU/hl	Poligalacturonasa (PGNU / hl ^a)	Pectín liasa (PLU / hl)	Pectín esterasa (PEU / hl)	Endoarabinasa (U/hl de endoarabinasa)
beta 1,3 Glucanasa sola	1.3	1.1	1.9	20	750	0	11	0	7
beta 1,3 Glucanasa + poligalacturonasa	2.4	2.1	3.6	40	750	3 525	187	144	9
beta 1,3 Glucanasa + poligalacturonasa + pectín liasa	4.3	3.0	17.8	49	750	7 481	4 369	16 709	40

^ahl indica hectolitro

[0081] De la tabla es evidente que una combinación de beta-1,3-glucanasa, una poligalacturonasa y una pectín liasa actúa sustancialmente mejor en la filtración de vino que las combinaciones con beta-1,3-glucanasa solas o combinaciones con tanto una beta-1,3-glucanasa como una poligalacturonasa.

- 5 [0082] También es evidente que una combinación de beta-1,3-glucanasa, una poligalacturonasa, una pectín liasa, una pectinesterasa y una endoarabinanasa actúa sustancialmente mejor en la filtración de vino que las combinaciones con beta-1,3-glucanasa sola o combinaciones con tanto una beta-1,3-glucanasa como una poligalacturonasa y/o una pectín liasa.

REIVINDICACIONES

1. Método de mejora de la filtrabilidad en la filtración de vino que comprende:
- 5 a) proporcionar una solución de vino crudo;
- b) poner en contacto la solución de vino crudo con
- 10 i. una beta-1,3-glucanasa;
- ii. una poligalacturonasa;
- iii. una pectín liasa;
- 15 iv. una pectinesterasa;
- v. una endoarabinanasa;
- c) obtener el vino filtrado.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, donde la poligalacturonasa es obtenible a partir de fermentación sumergida.
3. Método según la reivindicación 1, donde la pectín liasa es obtenible a partir de fermentación de superficie.
- 25 4. Método según la reivindicación 1 donde la poligalacturonasa y/o pectín liasa y/o pectinesterasa y/o endoarabinanasa es obtenible de *Aspergillus*.
5. Método según la reivindicación 4, donde *Aspergillus* es *A.niger* o *A. japonicus*.
- 30 6. Método según la reivindicación 1 donde la beta-1,3-glucanasa está presente a una concentración de al menos 5 BGXU/litro.
7. Método según la reivindicación 1 donde la poligalacturonasa está presente a una concentración de al menos 40 PGNU/litro.
- 35 8. Método según la reivindicación 1 donde la pectín liasa está presente a una concentración de al menos 20 PLU/litro.
9. Método según la reivindicación 1 que comprende además poner en contacto con una pectinesterasa a una
- 40 concentración de al menos 2,0 unidades/litro.
10. Método según la reivindicación 1 que comprende además poner en contacto con una endoarabinanasa a una concentración de al menos 0,15 unidades/litro.
- 45 11. Método según la reivindicación 1, donde la filtrabilidad se mejora por al menos 30 % en comparación con una filtración hecha en ausencia de las enzimas adicionadas.
- 50 12. Método según la reivindicación 1, donde la filtración de vino comprende una filtración en diatomita y/o placa y/o bastidor y/o flujo de cruce.