

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 847**

51 Int. Cl.:

C07K 14/395 (2006.01)

C12H 1/14 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2008 E 08736345 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2137212**

54 Título: **Preparación de soluciones de manoproteínas**

30 Prioridad:

20.04.2007 EP 07106635

04.10.2007 EP 07117898

12.11.2007 EP 07120458

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

24.08.2015

73 Titular/es:

RYMCO INTERNATIONAL AG (100.0%)
Bahnhofstrasse 7
6301 Zug, CH

72 Inventor/es:

LANKHORST, PETER PHILIP;
BIJL, HENDRIK LOUIS y
ÖZKAN, IBRAHIM

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 543 847 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

Preparación de soluciones de manoproteínas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una solución de manoproteínas y a su uso en la estabilización de vinos.

Antecedentes de la invención

La presencia de sales tartáricas, tartrato ácido de potasio (KHT) o tartrato de calcio (CaT) es una de las principales causas de la inestabilidad de los vinos.

10 El ácido tartárico es el principal ácido orgánico producido por el fruto de la vid durante su desarrollo. Se disuelve en la forma de sales de potasio y calcio en los mostos de uva durante el procesamiento de los frutos. Durante la fermentación, la solubilidad de las sales de ácido tartárico disminuye con el incremento de la concentración de etanol (debido a la fermentación de azúcares).

15 En vinos jóvenes, el tartrato ácido de potasio (KHT) siempre está presente a concentraciones de sobresaturación y cristaliza espontáneamente. Después del embotellamiento del vino, la inestabilidad del KHT se puede convertir en un problema comercial debido al carácter impredecible de la cristalización. Además, los consumidores a menudo perciben la presencia de cristales en la botella como un signo de calidad inferior del vino. Se pueden emplear tratamientos físicos antes de embotellar el vino para prevenir la cristalización de las sales de tartrato. Estos tratamientos consisten en promover la cristalización por enfriamiento del vino a -4 °C y la subsiguiente separación por filtración o eliminación del potasio y los iones tartáricos por electrodiálisis o mediante el uso de resinas de intercambio iónico. Sin embargo, estos procedimientos que consumen tiempo y energía presumiblemente alteran el equilibrio coloidal de los vinos.

20

La alternativa a los tratamientos físicos de los vinos es el uso de aditivos, que impiden la formación de núcleos y/o el crecimiento de cristales de KHT.

25 La carboximetilcelulosa y el ácido meta-tartárico pertenecen al grupo de aditivos que interfieren con la cristalización de KHT. Sin embargo, la carboximetilcelulosa no está aprobada como un aditivo para vinos según las normas vigentes. Por otro lado, el ácido meta-tartárico es inestable al pH del vino y a la temperatura a la cual se conserva el vino. Con el transcurso del tiempo, el ácido meta-tartárico se hidrolizará y desaparecerá su efecto protector. Por ello, su uso está restringido a los vinos destinados al consumo rápido. Otra desventaja es que idealmente el aditivo debería ser un componente natural del vino. Este definitivamente no es el caso del ácido meta-tartárico ni de la carboximetilcelulosa.

30

Se prefieren los aditivos naturales, que son activos tanto contra la formación de núcleos como contra el índice de crecimiento de los cristales de KHT frente a los aditivos químicos.

35 Un ejemplo de un aditivo natural es la manoproteína. La manoproteína es, junto con el glucano, el principal componente de las paredes celulares en levaduras (Lipke P.N. y col. J. Bacteriol. (1998) 180(15): 3735-3740). La manoproteína se obtiene principalmente de las células de levadura mediante dos tipos de procedimientos: procedimientos físicos y procedimientos enzimáticos. El procedimiento físico más común para obtener manoproteína es el que se describe en Peat S. y col. J. Chem. Soc. London (1961) 28-35, en el que la manoproteína se obtiene mediante extracción por calor de células de levadura a pH neutro. Un procedimiento enzimático para obtener manoproteína a partir de levadura se describe, por ejemplo, en el documento WO 96/13571. Este procedimiento comprende el tratamiento de paredes celulares de levadura aisladas con una preparación de β -glucanasa y aislamiento del producto mediante ultrafiltración.

40

La manoproteína puede tener la desventaja de que, una vez que se añade al vino, da lugar a una turbidez indeseable y, en algunos casos, a la precipitación de productos secundarios.

45 En el documento EP-A-1094117 se describe un procedimiento para producir polvos solubles de manoproteína, en el que se reduce el problema de la turbidez causada por los productos secundarios presentes en las preparaciones de manoproteína. En este procedimiento, se aíslan paredes celulares de levadura después de autólisis y a continuación se las somete a hidrólisis selectiva ya sea a 95-100 °C durante 15-30 horas o a la acción de una β -glucanasa. En ambos casos se solubilizan la manoproteína y otras impurezas. Se necesitan varias etapas para purificar la manoproteína solubilizada.

50 Se puede añadir manoproteína al vino o al mosto de vino en la forma de un polvo o en la forma de una solución. El uso de una formulación de manoproteína en polvo tiene la ventaja de que dicha formulación es microbiológicamente estable con el tiempo. Sin embargo, con el fin de aplicar correctamente la cantidad de la formulación de manoproteína en polvo al vino, se prefiere disolver la manoproteína en agua o vino. Para evitar una dilución excesiva del vino o mosto después de la adición de la solución de manoproteína, dicha solución debería tener una

concentración de manoproteínas de 200-300 g/l aproximadamente. Sin embargo, debido a la disolución lenta de la manoproteína, es necesario una agitación continua durante 1-2 horas de la solución durante la preparación de dicha solución concentrada a partir de un polvo y por ello es engorroso para el vitivinicultor. Además, durante la producción de la solución existe el riesgo de una contaminación microbiológica de la misma lo que por supuesto resulta indeseable.

Por las razones anteriormente mencionadas, sería preferible para el vitivinicultor utilizar una solución de manoproteínas lista para usar en la estabilización del vino. Sin embargo, la producción de una formulación líquida de manoproteínas lista para usar presenta algunos obstáculos. Una solución de manoproteínas lista para usar debería ser una formulación líquida traslúcida a la concentración de uso, es decir, a 100-300 g/l. Además la formulación líquida debería ser estable. En particular, la actividad de la solución de manoproteínas como un estabilizador para vinos contra la precipitación de tartratos en el vino se debería preservar en el período de tiempo entre la producción de la solución por el proveedor de manoproteína y el uso de la misma por el vitivinicultor. Un objetivo de la presente invención es proporcionar una solución a los problemas mencionados anteriormente.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un procedimiento para producir una solución de manoproteínas que comprende a) someter una suspensión de células de levadura a hidrólisis enzimática, preferentemente bajo la acción de enzimas exógenas y después inactivar las enzimas de levadura nativas, por lo que dichas células de levadura se degradan y la manoproteína y otros componentes de la levadura se solubilizan y se liberan de las células de levadura degradadas; b) recuperar la manoproteína solubilizada como una solución, preferentemente utilizando filtración de membrana; y e) inactivar la proteasa sometiendo la solución de manoproteínas obtenida después de la etapa b) a tratamiento térmico a una temperatura de 70 ° C o superior

La solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención tiene una turbidez, medida por nefelometría a una concentración de 200 g/l de manoproteína y a un pH en el intervalo entre pH 4 y pH 8, menor que 70 NTU, preferentemente menor que 60 NTU, más preferentemente menor que 50 NTU, lo más preferentemente menor que 40 NTU.

En el contexto de la presente invención, una "manoproteína" se define de acuerdo con RESOLUTION OENO 26/2004 de la OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) como un producto que se puede extraer de las paredes celulares de células de *Saccharomyces cerevisiae* y/o de levadura mediante procedimientos fisicoquímicos o enzimáticos. Las manoproteínas comprenden estructuras diferentes dependiendo de su peso molecular, su grado y tipo de glicosilación y su tamaño de carga.

El solicitante ha descubierto sorprendentemente que es posible producir una solución muy límpida de manoproteínas, más límpida que cualquiera de las soluciones de manoproteínas descritas en la técnica anterior, a concentraciones de 200-300 g/l. Esta solución de manoproteínas es particularmente adecuada para su uso en vinos, para la estabilización de los mismos contra la precipitación de tartrato, ya que se puede añadir al vino a una concentración alta sin una dilución excesiva del vino. Aún más, la solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención no causa turbidez cuando se añade al vino. Dado que la turbidez de una solución de manoproteínas depende de la concentración y del pH, los valores de la turbidez se miden a una concentración de 200 g/l de la solución. Sin embargo, no se debería interpretar que esto significa que la solución producida mediante el procedimiento de la invención tiene una concentración fija de manoproteína de 200 g/l, sino que la turbidez de la misma se mide a una concentración de 200 g/l. Por ello, dependiendo de su concentración inicial, la solución de manoproteínas se puede diluir o concentrar hasta un valor de 200 g/l antes de medir la turbidez. A un pH de 5,5 la turbidez de la solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención, medida por nefelometría a una concentración de manoproteína de 200 g/l es preferentemente de 100 NTU o menor, más preferentemente 50 NTU o menor, aún más preferentemente 40 NTU o menor, lo más preferentemente 30 NTU o menor.

Las proteasas y β -glucanasas son enzimas que se pueden usar en la producción de manoproteínas a partir de levadura o de paredes celulares de levadura y que (habitualmente) están presentes como impurezas en la manoproteína producida de acuerdo con los procedimientos conocidos. La presencia de estas impurezas no representa un problema cuando la manoproteína se aísla como un polvo. En su lugar, la presencia de incluso pequeñas trazas de actividad proteasa, y opcionalmente actividad β -glucanasa, en la solución causa una disminución rápida de la actividad de la solución de manoproteínas con respecto a la estabilización del vino contra una precipitación de tartratos.

El solicitante ha descubierto sorprendentemente que cuando una solución de manoproteínas está libre de actividad proteasa, por ejemplo, actividad proteasa alcalina, y opcionalmente libre de actividad β -glucanasa, se prolonga el período de validez de la solución y su actividad como un estabilizador de vinos contra la precipitación de tartratos. En su lugar, la presencia de incluso pequeñas trazas de actividad proteasa, y opcionalmente actividad β -glucanasa, en la solución de manoproteínas causa una disminución rápida de la actividad de la solución de manoproteínas con respecto a la estabilización de vinos frente a la precipitación de tartratos.

La solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención está libre de actividad proteasa y opcionalmente libre de actividad β -glucanasa.

Con el término "actividad proteasa" se indica en el presente documento la actividad enzimática total debida a endoproteasas (EC 3.4.21-24). Libre de actividad proteasa significa que la actividad proteasa en la solución de manoproteínas será menor que la actividad mínima detectable con el procedimiento usado para medir dicha actividad proteasa. Según el tipo de proteasas que puede estar presente en la solución, se pueden usar procedimientos específicos para medir la proteasa y se pueden definir unidades específicas de proteasas. Estos procedimientos son conocidos por los expertos en la materia. En la sección de Materiales y Procedimientos se indica el procedimiento usado en la presente invención para determinar la actividad proteasa y se define la unidad de actividad proteasa.

Con el término actividad " β -glucanasa" se indica en el presente documento la actividad enzimática total debida a las β -1,3, β -1,4 y/o β -1,6 endoglucanasas. La actividad beta-glucanasa se puede determinar de acuerdo con el procedimiento que se describe en Materiales y Procedimientos. Libre de actividad β -glucanasa significa que el nivel de actividad β -glucanasa en la solución es menor que la actividad mínima detectable con un procedimiento adecuado para medir la actividad β -glucanasa, tal como el que se describe en Materiales y Procedimientos.

La solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención tiene su uso preferido en la estabilización del vino o del mosto. Por esta razón, es importante la ausencia en la solución de cualquier microorganismo perjudicial. Aún más, la presencia de cualquier microorganismo viable puede afectar a la estabilidad al almacenamiento de la solución y a la conservación de su actividad como estabilizador de vinos. Por estos motivos, en una realización de la invención, la solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención tiene una cantidad total de microorganismos viables en la solución, medida en unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, que es menor que 10, preferentemente menor que 5, más preferentemente la solución de manoproteínas es estéril.

La frase "cantidad total de microorganismos viables" se refiere a la cantidad total de microorganismos psicrófilos aerobios y anaerobios + microorganismos mesófilos aerobios y anaerobios + microorganismos termófilos aerobios y anaerobios presentes en la solución. La cantidad total de microorganismos viables presentes en la solución, medida en unidades formadoras de colonias (UFC)/ml se define en la sección de Materiales y Procedimientos y se establece mediante determinación del recuento total de placas (RTP), un procedimiento que es bien conocido por los expertos en la materia y se describe brevemente en la sección de Materiales y Procedimientos. Lo más preferentemente la solución de manoproteínas es estéril, por ejemplo, la cantidad total de microorganismos viables presentes en la solución, medida en unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de solución, es igual a 0. La solución de manoproteínas se envasa preferentemente en un recipiente estéril que se cierra herméticamente.

La solución de manoproteínas de acuerdo con el procedimiento de la invención es preferentemente una solución acuosa.

La solución producida mediante el procedimiento de la invención es particularmente adecuada para su adición a vinos o mostos de vino con el fin de estabilizar los mismos. Para evitar una dilución excesiva del vino o mosto después de añadir la solución de manoproteínas, la concentración de manoproteínas en la solución comprende preferentemente entre 50 g/l y 500 g/l, más preferentemente entre 100 g/l y 300 g/l, lo más preferentemente 200 g/l.

El pH de la solución preferentemente es tal que se conserva la estabilidad de la manoproteína a lo largo del tiempo y se evita la turbidez de la solución. Por ello, el pH de la solución de manoproteínas está preferentemente comprendido entre 3 y 8, más preferentemente entre 4 y 7, lo más preferentemente entre 5 y 6.

La solución producida mediante el procedimiento de la invención es preferentemente microbiológicamente estable en el tiempo. Por ello, en una realización preferida, se añade al menos un aditivo estabilizante a la solución de manoproteínas. Más preferentemente, el aditivo estabilizante es dióxido de azufre. Más preferentemente se puede añadir dióxido de azufre a la solución en la forma de una sal de bisulfito, más preferentemente como bisulfito de sodio o potasio ($K_2S_2O_5$). La adición de dióxido de azufre tiene otra ventaja además de mantener la solución de manoproteínas microbiológicamente estable. Las soluciones de manoproteínas son de un color que puede variar desde el amarillo claro hasta un tono parduzco. Sin embargo, el uso de una solución parduzca para la estabilización de los vinos no resultaría muy atractiva para el productor de vinos. Por ello, una solución de manoproteínas que se usará en vinos o mosto preferentemente será sólo ligeramente coloreada. Se ha observado que la adición de dióxido de azufre a la solución de manoproteínas puede reducir el color de la misma de parduzca a amarillo pálido. Por ello, la cantidad de dióxido de azufre que se añade a la solución se encuentra preferentemente en el intervalo de 1 a 20 g/l (medida como cantidad de $K_2S_2O_5$ añadida):

La solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención de la invención, disuelta en vino, deberá ser traslúcida y estable. En particular, la actividad de la solución de manoproteínas disuelta como un estabilizador para vinos contra la precipitación de tartratos en el vino se debería preservar en el período de tiempo entre la producción de la solución por el fabricante de la misma y su uso por el vitivinicultor. Por ello, en una realización preferida, la solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención disuelta:

- en agua a una concentración de 1 g/l (sobre la base del peso seco) tiene una turbidez, medida a un pH de 3,5, de 4 NTU o menos, preferentemente de 2 NTU o menos, más preferentemente de 1 NTU o menos, y/o
- en etanol en agua al 12 % v/v a una concentración de 1 g/l (sobre la base del peso seco) tiene una turbidez, medida a un pH de 3,5, de 20 NTU o menos, preferentemente de 10 NTU o menos, aún más preferentemente de 5 NTU o menos, lo más preferentemente de 1 NTU o menos, y/o
- en vino blanco a una concentración de 0,2 g/l (sobre la base del peso seco) tiene una turbidez de ≤ 10 NTU, preferentemente de ≤ 5 NTU, aún más preferentemente ≤ 2 NTU, lo más preferentemente ≤ 1 NTU.

La solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención se caracteriza preferentemente por un contenido de carbohidratos en la manoproteína de al menos 50 % p/p, basado en la materia seca de manoproteína, de los cuales al menos un 70 % p/p, basado en el contenido total de carbohidratos, consiste en residuos de manosa en la forma de oligómeros o polímeros de manosa. Preferentemente, la solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención se caracteriza por una cantidad de fósforo (medida como P_2O_5) en la manoproteína que es menor que 1 % p/p basado en la materia seca, más preferentemente 0,8 % p/p o menor, aún más preferentemente 0,7 % p/p o menor. En general la cantidad de fósforo puede ser de tan solo 0,4 % p/p basado en la materia seca. La cantidad de fósforo en la manoproteína se puede medir de acuerdo con un procedimiento de AES-ICP (espectroscopía de emisión atómica con ayuda de plasma acoplado por inducción) bien conocido.

La solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención se puede combinar con uno o más aditivos para vino adicionales. Los ejemplos de aditivos para vino incluyen carboximetilcelulosa, ácido metatartárico y goma arábiga. En una realización preferida, la solución de manoproteínas se combina con goma arábiga.

En la etapa a) la manoproteína se extrae de una suspensión acuosa de células de levadura sometiendo la suspensión de células de levadura a hidrólisis enzimática, donde preferentemente dichas células de levadura se degradan y la manoproteína y otros componentes de levadura se solubilizan y se liberan de las células de levadura degradadas.

Se puede usar cualquier tipo de levadura en el procedimiento de la invención. En particular, se pueden emplear convenientemente cepas de levadura que pertenecen a los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* o *Candida*. Se prefieren las cepas de levadura pertenecientes al género *Saccharomyces*, por ejemplo, se prefiere la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

El procedimiento de la presente invención puede comenzar con una suspensión de células de levadura en un líquido acuoso, por ejemplo un caldo de fermentación de las células de levadura en cuestión. Los procedimientos de fermentación adecuados que conducen a la obtención de suspensiones de células de levadura son conocidos en la técnica. En algunos casos, se puede concentrar el caldo de fermentación antes de su uso en el presente procedimiento, por ejemplo, por centrifugación o filtración. Por ejemplo, se puede usar levadura en crema (levadura de panadería que ha sido concentrada a 15 - 27 % p/p de contenido de materia seca).

En la etapa a) la hidrólisis enzimática de la suspensión de células de levadura se puede efectuar sometiendo dicha suspensión a la acción de enzimas de levadura nativas y/o de enzimas exógenas añadidas.

Las condiciones usadas para efectuar la hidrólisis enzimática dependen del tipo de enzima usado y pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la materia. En general, la hidrólisis enzimática se efectuará a un pH entre 4 y 10 y a una temperatura entre 40 °C y 70 °C. En general, la hidrólisis enzimática se efectuará durante un tiempo que comprende entre 1 y 24 horas.

En una realización preferida de la invención, primero se inactivan las enzimas de levadura nativas y a continuación se añaden enzimas exógenas a la suspensión. Los expertos en la materia conocen la manera de inactivar enzimas de levadura nativas. La inactivación se puede efectuar, por ejemplo, mediante tratamiento con pH o choque térmico, siendo preferido éste último procedimiento. El choque térmico se puede efectuar convenientemente mediante tratamiento de la suspensión de células de levadura a una temperatura de 80-97 °C durante 5 a 10 minutos. Una vez inactivadas las enzimas de levadura nativas, se pueden añadir enzimas exógenas a la suspensión de células de levadura para efectuar la hidrólisis enzimática. Preferentemente se usa una proteasa, más preferentemente una endoproteasa, para tal fin. Las enzimas exógenas usadas para efectuar la hidrólisis enzimática comprenden preferentemente una enzima para degradar ARN en ribonucleótidos. Para ello se puede emplear cualquier ARNasa, por ejemplo la 5'-Fdasa (5'-fosfodiesterasa). La enzima usada para degradar el ARN en ribonucleótidos se puede añadir junto con o después del tratamiento con las enzimas mencionadas anteriormente, por ejemplo, junto con o después del tratamiento con una proteasa. Opcionalmente, también se usa una desaminasa, por ejemplo una desaminasa adenilica, junto con o después del tratamiento con las enzimas mencionadas anteriormente.

Antes de la etapa b), la enzima o enzimas usadas en la etapa a) se pueden inactivar usando, por ejemplo, los procedimientos mencionados previamente.

En la etapa b) del procedimiento la manoproteína se recupera como una solución, preferentemente usando filtración de membrana. La solución se puede concentrar opcionalmente hasta la concentración final deseada.

Preferentemente se elimina el material insoluble, por ejemplo, el material derivado de las paredes celulares de levadura, antes de la recuperación de la manoproteína en la etapa b), en general mediante un procedimiento de separación sólido-líquido, preferentemente por centrifugación o filtración. La manoproteína se puede recuperar mediante cualquier procedimiento adecuado para tal fin.

- 5 En una realización preferida, en la etapa b) la manoproteína se recupera como una solución usando filtración de membrana, preferentemente usando ultrafiltración (UF) o diafiltración. Los procedimientos de filtración de membrana, en particular ultrafiltración o diafiltración, son conocidos por los expertos en la materia. Preferentemente, la manoproteína se recupera por ultrafiltración (UF) o diafiltración. En los casos en los que se usa UF o diafiltración para recuperar la manoproteína, se pueden emplear filtros con un corte de peso molecular de 100 kDa o menor, 10 preferentemente de 3 a 50 kDa, más preferentemente de 3 a 10 kDa. La fracción de manoproteína permanece en el retentado resultante de la etapa de ultrafiltración o diafiltración. Cuando el material insoluble no se elimina antes de la ultrafiltración o diafiltración, se puede volver a suspender (en solución) el retentado que comprende manoproteína y el material insoluble y eliminar después preferentemente el material insoluble, por ejemplo usando las técnicas de separación de sólidos-líquidos comunes mencionadas previamente.
- 15 Preferentemente, después de recuperar la manoproteína como una solución, la manoproteína recuperada se puede tratar en la etapa c) del procedimiento de la invención con una RNasa, por ejemplo, una Fdasa (fosfodiesterasa), en condiciones suficientes como para convertir los residuos de ARN presentes en la solución de manoproteínas recuperada en ribonucleótidos. El tratamiento se puede efectuar usando procedimientos conocidos en la técnica. Este tratamiento es seguido opcionalmente por una o más etapas de filtración de membrana, por ejemplo, 20 ultrafiltración o diafiltración, (etapa d) del procedimiento de la invención), con el fin de eliminar las impurezas de bajo peso molecular usando membranas según se indicó previamente. La solución de manoproteínas se recupera en el retentado.

Se puede efectuar un ajuste del pH y/o de la concentración de la solución de manoproteínas en cualquier etapa adecuada del procedimiento de producción usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

- 25 La solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención está libre de actividad proteasa y, opcionalmente, de actividad β -glucanasa. Este último resultado se puede lograr mediante la etapa e) sometiendo la solución de manoproteínas obtenida después de la etapa b), c) o d) a un tratamiento adecuado para inactivar la proteasa y opcionalmente, la β -glucanasa, preferentemente sometiendo la solución a tratamiento con calor a una temperatura de 70 °C o más, preferentemente a una temperatura comprendida entre 80 °C y 140 °C, en donde el 30 tratamiento de calor tiene lugar preferentemente durante un tiempo comprendido entre 2 segundos y 60 minutos. Preferentemente la etapa e) se efectuará después de la etapa d) o después de una esterilización, por ejemplo, después de una filtración estéril tal y como se menciona más adelante en el presente documento.

- La temperatura usada en el tratamiento con calor está preferentemente entre 80 °C y 140 °C. La duración del 35 tratamiento con calor será tal que preferentemente se eliminará toda la actividad enzimática de la solución de manoproteínas. La duración del tratamiento con calor dependerá de la temperatura usada. Por ejemplo, las temperaturas más bajas requerirán una duración más prolongada del tratamiento con calor, mientras que las temperaturas más altas solamente requerirán un tiempo corto. Por ello, un tratamiento a 80 °C durante 30 minutos se encuentra dentro del alcance de la reivindicación, así como un tratamiento a 130 °C durante 7 segundos. El 40 tratamiento con calor se efectúa preferentemente usando un tratamiento de UHT en las condiciones comúnmente usadas en la industria de alimentos o bebidas. Un tratamiento de UHT puede tener lugar típicamente a una temperatura de 130-145 °C durante una duración de 2-10 segundos. Con un tratamiento por calor a 130 °C o más durante el tiempo suficiente, por ejemplo, un tratamiento con calor a 130 °C durante 7 segundos, se va a obtener una solución que estará libre de actividad proteasa y β -glucanasa y, en general, libre de toda actividad enzimática.

- 45 El uso de una etapa de calentamiento en general permitirá desactivar o destruir, al menos en parte, los microorganismos presentes en la solución de manoproteínas. Preferentemente el tratamiento con calor es un tratamiento UHT según se indicó previamente porque en el último caso todos los microorganismos o esporas microbianas que pudieron haber estado presentes en la solución estarán muertos o desactivados.

- El procedimiento de la invención puede comprender someter la manoproteína obtenida después de la etapa b), c), d) o e) a una esterilización, preferentemente a una filtración estéril (etapa f) con el fin de eliminar todos los 50 microorganismos presentes en la solución. Esto último se puede lograr usando filtros específicos conocidos por los expertos en la materia. Preferentemente la filtración estéril se efectúa después de la etapa d) o e).

- Antes o después del tratamiento para inactivar la actividad de la enzima, preferentemente después de este 55 tratamiento pero antes de la filtración estéril, se puede añadir una cantidad deseada de dióxido de azufre a la solución de manoproteínas. En general, la adición se efectuará añadiendo una sal adecuada como se indicó anteriormente. Los expertos en la materia conocen la manera de realizar esta adición. Se pueden añadir otros aditivos estabilizantes a la solución de manoproteínas en cualquier etapa adecuada durante el procedimiento de producción, en general en cualquier etapa después de la etapa b) y antes de la filtración estéril.

Al final del procedimiento de producción, la solución de manoproteínas se puede envasar de forma aséptica de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Los recipientes estériles que se pueden usar pueden ser de diversos materiales. Los recipientes adecuados pueden ser bolsas estériles contenidas en una caja de cartón. Las bolsas pueden estar provistas de un anillo que se puede perforar con una tapa a rosca.

5 Los expertos en la materia comprenderán que el procedimiento de la presente invención puede abarcar una etapa en el cual la solución de manoproteínas se seca mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, por liofilización o secado por pulverización para obtener una manoproteína en forma sólida, por ejemplo, en la forma de un polvo o un granulado. Dicha manoproteína en forma sólida también está comprendida por la presente invención.

10 En un segundo aspecto la invención provee un procedimiento para estabilizar el vino previniendo y/o retrasando la cristalización de sales de ácido tartárico en el que en una primera etapa una solución de manoproteínas obtenida de acuerdo con un procedimiento como se define en las reivindicaciones 1 a 4 se añade en una segunda etapa al vino o al mosto de uvas que se usará en la producción de vino. La composición se añade preferentemente al vino durante el envejecimiento, por ejemplo, después de la fermentación pero antes del embotellamiento. La invención es extremadamente adecuada para vinos blancos y vinos rosados, pero también para vinos tintos o vinos espumosos.

15 La solución de manoproteínas se añade en cantidades eficaces para lograr un efecto estabilizador. En general, se puede añadir al vino a una concentración entre 10-2000 mg por litro de vino. Ya se obtienen buenos resultados con la adición de la solución hasta una concentración final de manoproteína en el vino de entre 10 y 400 mg por litro de vino. El experto comprenderá que la cantidad añadida también dependerá de la adición o presencia de, por ejemplo, otros estabilizadores para vino, tales como carboximetilcelulosa, ácido meta-tartárico, goma arábiga y del grado de sobresaturación de KHT en el vino antes de la adición.

20 La formación de núcleos y el crecimiento de cristales de KHT en el vino se pueden medir y cuantificar mediante los siguientes procedimientos (Moutounet y col. En: Actualités Oenologiques 1999 5° Symposium International d'Oenologie de Bordeaux (Lonvaud-Funel ed.)).

25 El primer procedimiento, que indica la formación de núcleos de cristales, mide el tiempo hasta la aparición de cristales en el vino cuando se conserva a -4 °C. Se realiza una inspección visual todos los días y el tiempo necesario para detectar la aparición de cristales (Tcris) se expresa en número de días.

30 El segundo procedimiento, que indica el crecimiento de cristales, mide el grado de inestabilidad tartárica (DTI) del vino. Para ello, se agitan los vinos a -4 °C y se mide la conductividad inicial. A continuación, se añaden cristales calibrados de KHT y a continuación se mide la conductividad después de haber alcanzado un valor estable. El DTI se define como el porcentaje de disminución de la conductividad inicial.

35 El tercer procedimiento mide la concentración verdadera de ácido tartárico disuelto. Se transfiere un volumen exacto del vino a un vial de vidrio y se mezcla con el mismo volumen exacto de D₂O que contiene una concentración exacta conocida de ácido maleico. El espectro de RMN de ¹H se analiza en condiciones de relajación completa y luego se compara la integral del patrón interno (ácido maleico) con la integral del ácido tartárico. De esta manera, se puede determinar la concentración de ácido tartárico disuelto con una precisión y exactitud muy altas.

40 En general, un vino inestable tiene, con respecto a la cristalización de las sales de ácido tartárico, un valor de Tcris que puede variar entre 0,5 y 6 días. Vinos estabilizados con respecto a la cristalización de sales de ácido tartárico se pueden obtener por adición al vino o al mosto de vino que se usará en la fermentación para la producción de vino de la solución de manoproteínas producida mediante el procedimiento de la invención a una concentración adecuada para impedir y/o retardar la cristalización de sales de ácido tartárico. Dicho vino estabilizado se caracteriza por una relación de vino Tcris- estabilizado/vino Tcris-inestable de al menos 2, preferentemente de al menos 5, más preferentemente de al menos 10, aún más preferentemente entre 10 y 60 medida de acuerdo con el procedimiento 1.

45 La producción de vino se caracteriza por las siguientes etapas, que son bien conocidos por los expertos en la materia, de: a) extraer mosto de vino de las uvas; b) someter el mosto de vino a fermentación bajo la acción de levaduras para obtener el vino que luego se separa de los residuos sólidos; c) someter, opcionalmente, el vino a un envejecimiento y d) embotellar o envasar el vino. Después de separar el vino de los residuos sólidos presentes después de la fermentación, en general se forman otros elementos insolubles en el vino en las subsiguientes etapas de su producción (por ejemplo sólidos debido a la precipitación de sales de tartrato, por ejemplo cuando el vino pasa por una estabilización en frío). Por ello, la producción de vino, en especial si se realiza a gran escala, comprende a menudo la etapa de filtrar el vino para eliminar los compuestos insolubles mencionados previamente formados justo antes del embotellamiento o del envasado del vino. La elaboración de vino puede comprender, dependiendo del vino a producir, etapas adicionales a los mencionados previamente. Todas estas etapas son conocidos por los expertos en la materia.

55 En un procedimiento de elaboración (industrial) de vino que comprende una etapa para estabilizar el vino por adición de un estabilizador de vinos, tal como manoproteína, dicha manoproteína se puede añadir ya sea al mosto de vino o al vino. En general, se añade al vino, normalmente durante el envejecimiento y antes de la filtración y el

embotellamiento. En el caso de que la adición de la manoproteína se efectúe durante el envejecimiento y antes de la filtración y embotellamiento se ha observado sorprendentemente que la actividad de la manoproteína como estabilizador contra la precipitación de sales de tartrato disminuye después de filtrar el vino. Por ello, se deberían añadir dosis más altas de manoproteína con el fin de lograr la estabilización deseada en el vino embotellado. Una solución para este problema comprende entonces añadir la manoproteína en la forma de una solución después de la última etapa de filtración por el que pasa el vino antes del embotellamiento.

La solución de manoproteínas añadida al vino después de la filtración se puede formar justo antes de su adición al vino mezclando la manoproteína con agua o vino o puede ser una solución de manoproteínas lista para usar. Preferentemente la solución de manoproteínas se produce usando manoproteínas muy solubles en agua y vino y que no causa turbidez alguna cuando se añade al vino. Más preferentemente la solución de manoproteínas usada en el procedimiento para estabilizar vino es una solución (lista para usar) producida mediante el procedimiento de la invención. Esta se puede combinar con uno o más aditivos o estabilizadores para vino adicionales, tales como carboximetilcelulosa, ácido meta-tartárico y goma arábica. En una realización preferida, la solución de manoproteínas se combina con goma arábica.

La solución se puede añadir después de la filtración al vino en una cantidad apropiada que sea adecuada para estabilizar el vino contra una precipitación de sales tartrato. La adición al vino se puede efectuar ya sea mezclando la solución con el vino antes del embotellamiento o se puede añadir directamente en la botella (o envase) antes de llenar la misma con vino.

La presente invención se ilustrará a continuación con algunos ejemplos que sin embargo no pretenden limitarla.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Determinación por GPC del peso molecular

El peso molecular de péptidos se midió por GPC con una columna TSKGel G2000SWxl 7,8 x 300 mm (Tosoh Bioscience, Japón) usando como fase móvil una solución tampón de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,0 mM, NaCl 100 mM a un pH de 6,0 usando una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y detección a 214 nm. El volumen de inyección de muestras era de 25 μl . La columna se calibró con 4 proteínas globulares estándar de Bio-Rad EE.UU.: Tiroglobulina 670 kDa, y-globulina 158 kDa, ovalbúmina 44 kDa y vitamina B12 1350 Da. Se ajustó una recta de calibración recta del log (PM) contra el tiempo de retención y esta recta de calibración se usó en la determinación del peso molecular promedio de fracciones. La detección se efectuó usando UV3000 Thermo Finnigan (EE.UU.).

Determinación de la turbidez

La turbidez se determinó con un turbidímetro HACH 2100 N (Hach-Lange, Düsseldorf, Alemania) equipado con una lámpara de tungsteno (400-600 nm) a una temperatura de 20 °C

Recuento total de placas

Se guardaron tres muestras de solución de manoproteínas en las condiciones específicas que se mencionarán más adelante antes del análisis y se analizaron usando el procedimiento de recuento total de placas (RTP) para determinar la posible presencia de microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos, capaces de crecer en atmósfera aerobia y anaerobia. La determinación del RTP se efectuó vertiendo aproximadamente 15 ml de agar PCA (agar para recuento de placas, Oxoid, Reino Unido) sobre 1 ml de solución de manoproteínas contenida en una placa de Petri. La incubación por RTP se ejecutó en una de las 6 condiciones que se mencionan más adelante. El análisis se efectuó por duplicado para cada condición. Para cada muestra de manoproteína se prepararon en total 12 placas de Petri, 6 se incubaron aeróbicamente, las otras 6 anaeróbicamente.

Condiciones para la determinación de psicrófilos aerobios y anaerobios:

Conservación de las muestras: A 8 °C durante 30 días

Análisis: RTP sobre placas PCA

Incubación: Aerobia o anaerobia a 8 °C durante 7 días

Condiciones para la determinación de mesófilos aerobios y anaerobios:

Conservación de las muestras: A 30°C durante 10 días

Análisis: RTP sobre placas PCA

Incubación: Aerobia o anaerobia a 30 °C durante 3 días

Condiciones para la determinación de termófilos aerobios y anaerobios:

Conservación de las muestras: A 55 °C durante 10 días

Análisis: RTP sobre placas PCA

Incubación: Aerobia o anaerobia a 55 °C durante 3 días

Después del tiempo de incubación apropiado, se analizó cada placa de Petri para determinar la cantidad de colonias formadas en cada una de ellas. La cantidad de colonias en cada placa indica las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitros de solución para el tipo específico de microorganismo. La cantidad total de microorganismos viables medida como UFC por mililitros de solución de manoproteínas según se define en esta solicitud de patente está dada por: UFC/ml (psicrófilos anaerobios) + UFC/ml (psicrófilos aerobios) + UFC/ml (mesófilos anaerobios) + UFC/ml (mesófilos aerobios) + UFC/ml (termófilos anaerobios) + UFC/ml (termófilos aerobios).

Medición de la actividad proteasa

Los grupos amino libres que son liberados después de la acción de una proteasa sobre la N,N-dimetilcaseína reaccionan con ácido trinitrobencensulfónico para dar un color amarillo que se puede medir espectrofotométricamente a 405 nm. Se usa un patrón de enzima que contiene alcalina proteasa para la calibración. Se preparan cinco soluciones patrón con actividad desde 10-60 U/ml. (Una U se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 7,59 μ mol de p-nitroanilina por minuto de succinil-L-alanil-L-alanil-L-propil-L-fenilamina-para-nitroanalina (2,18 mg/ml) a pH 8,5 (TRIS 0,1 M) y 37 °C). Se mezclan 2 ml de solución de N,N-dimetilcaseína (1,68 g/l disuelta en solución tampón de bórax que contiene tetraborato disódico 10 g/l ajustada con ácido fosfórico al 8,5 % a pH 8,5) con 200 μ l de solución patrón o de ensayo y se incuban durante 15 minutos a 37 °C. A continuación, se añaden 1,2 ml de solución de ácido trinitrobencensulfónico (4 mM en HCl 12 mM). Después de 5 minutos de incubación a 37 °C se mide la absorbancia a 405 nm. Mediante el uso de una recta de calibración, se puede calcular la actividad de muestras desconocidas. El límite de cuantificación de la prueba en una matriz de manoproteína es 600 U/ml.

Medición de la actividad beta-glucanasa

La reducción de la viscosidad de una solución de beta-glucano P-BGBM de cebada (Megazyme, Reino Unido) de pH 4,7 y 45 °C, causada por una beta-glucanasa se mide usando un viscosímetro de caída de bola Grabner. El tiempo de caída de una bola de hierro en un tubo capilar rellena de sustrato constituye una medida de la viscosidad. La reducción de la viscosidad (disminución del tiempo de caída) se usa para calcular la actividad. Se usa un patrón de enzima que contiene actividad beta-glucanasa para la calibración. Se preparan cinco soluciones patrón con actividades de 0,2 – 1,2 U/ml. (Una unidad es la cantidad de enzima por ml de mezcla de reacción que causa un cambio en la viscosidad del sustrato con una velocidad que permite obtener una pendiente de 0,147 por minuto, en el que el sustrato es una solución de beta-glucano de cebada de pH 4,7 y a 45 °C). Bajo agitación continua, se añaden 1,1 g de beta-glucano a 40 ml de agua. Se añade 1 ml de NaOH 1M y la solución se agita durante 15 minutos. A continuación, la solución se incuba durante 15 minutos en un baño de agua a ebullición. Después, bajo agitación continua, la mezcla se enfría durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añade, respectivamente, 1 ml de HCl 1M y 50 ml de ácido acético al 100%. El volumen se completa con agua hasta 100 ml. El pH de esta solución debería ser de 4,70 +/- 0,05. A 45 °C, se mezcla 1 ml de muestra (diluida en solución de NaCl 10 g/l que también contiene la fracción V de BSA 0,5 g/l) con 5 ml de sustrato de beta-glucano y se incuban durante 30 minutos. Después de 30 minutos de incubación, la viscosidad se mide usando el viscosímetro Grabner. El uso de una recta de calibración, permite calcular la actividad de muestras desconocidas. El límite de cuantificación de la prueba en una matriz de manoproteína es de 2 U/ml.

Ejemplo 1

Producción de manoproteína a partir de levadura

Se calentaron dos litros de levadura en crema de *Saccharomyces cerevisiae* durante 10 minutos a 95 °C para inactivar las propias enzimas de la levadura. La suspensión se trató con Pescalase (serina proteasa disponible comercialmente de DSM Food Specialties, Holanda) durante 6 horas a pH 6,0, 60 °C. A continuación, la mezcla se incubó con Fdasa RP-1G (preparación de Fdasa disponible comercialmente de Amano, Japón) durante 15 horas a pH 5,0, 60 °C con el fin de hidrolizar el ARN de la levadura en nucleótidos. El extracto de levadura se separó de las paredes celulares insolubles por medio de centrifugación. El centrifugado se filtró por medio de microfiltración, para eliminar todos los insolubles residuales. A continuación, el filtrado limpio se calentó a 62 °C y se concentró por medio de ultrafiltración sobre una membrana de poliétersulfona (PESH, 4 kDa, NADIR, Microdyn-Nadir, Alemania). Se añadió Fdasa para asegurar que se hubiera hidrolizado todo el ARN residual. A continuación, el retentato se purificó aún más por medio de diafiltración a 62 °C y un factor de lavado de 6. El retentato se concentró hasta una concentración final de manoproteína 200 g/l y los insolubles se eliminaron por medio de filtración estéril sobre lechos filtrantes Seitz EKS. La solución fue tratada por UHT durante 7 segundos a 130 °C. El pH de la solución era de 5.3. La solución de manoproteínas estaba libre de actividad proteasa y β -glucanasa. La solución de manoproteínas se envasó de forma aseptica. La turbidez de la solución se midió por nefelometría y era de 27,3 NTU. La solución de manoproteínas fue evaluada para determinar la presencia de microorganismos viables usando el recuento total de placas según se indica en Materiales y Procedimientos. No se detectaron colonias de microorganismos en las condiciones de ensayo y por ello el valor de UFC/ml de la solución de manoproteínas era igual a 0.

Ejemplo 2

En este ejemplo se demuestra lo que sucede cuando se omite el tratamiento UHT, el cual se usaba para destruir toda actividad proteasa en la muestra de manoproteína.

Materiales y procedimientos:

- 5 Se mantuvo una solución estéril de manoproteínas al 12,5% p/v a 40 °C, una temperatura típica para la actividad proteasa, durante 11 meses. Una versión secada por congelamiento de la muestra se mantuvo a temperatura ambiente durante el mismo período de tiempo.

10 Primero, el producto líquido se secó por congelamiento y luego se prepararon soluciones madre de ambos productos a 10 mg/ml. Se añadieron volúmenes pequeños a dos vinos: rosado de 2006 y Chardonnay de 2005 para lograr concentraciones finales de 50, 100, 150, 200 y 250 mg/l. Las muestras se conservaron a -4 °C y la formación de cristales se monitorizó visualmente de la manera habitual. En la Tabla 1 se indica el tiempo necesario para detectar la aparición de cristales de KHT (días).

Tabla 1

	Chardonnay 2005		Rose 2006	
	Líquido mantenido durante 11 meses a 40 °C	Polvo mantenido durante 11 meses a temperatura ambiente	Líquido mantenido durante 11 meses a 40 °C	Polvo mantenido durante 11 meses a temperatura ambiente
Vino blanco	1	1	1	1
± 50 mg/l	2-3	4	4	7
+ 100 mg/l	2-3	5	4	7
+ 150 mg/l	4	8	6	7
+ 200 mg/l	4	11	8	13
+ 250 mg/l	5	12	8	15

- 15 Estos resultados muestran que los cristales aparecen antes si la muestra de manoproteínas se conserva a 40 °C; en otras palabras, la actividad de las manoproteínas se reduce significativamente cuando las manoproteínas se conservan a 40 °C, una temperatura que es típica para la actividad proteasa.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra el efecto de la actividad enzimática sobre el rendimiento de las manoproteínas.

- 20 A 20 ml de la manoproteína líquida (20 % d.m.) obtenida en el ejemplo 1 y que está libre de actividad proteasa y β -glucanasa, se añadieron 100 μ l de una solución de Alcalase[®] (Sigma Aldrich, que contiene proteasa de *Bacillus licheniformis*). La solución se incubó durante 48 horas a pH 5,3 y 40 °C. De manera similar, se añadieron 12,5 mg de Glucanex[®] (Sigma Aldrich, que contiene las actividades de β -glucanasa, celulasa, proteasa y quitinasa de *Trichoderma harzianum*) a 20 ml de manoproteínas y la incubación se efectuó en las mismas condiciones.
- 25 La solución de manoproteínas obtenida en el ejemplo 1, libre de actividad enzimática, se incubó a 40 °C y la misma solución se conservó a 4 °C. Las soluciones de manoproteínas fueron evaluadas en vino blanco sobresaturado en KHT (concentración de ácido tartárico 26% por encima de la saturación). Se prepararon diluciones de 10 mg/ml y se añadieron alícuotas al vino con el fin de obtener manoproteínas a 50, 75 y 100 mg/l. La formación de cristales se monitorizó visualmente todos los días. En la Tabla 2 se indica el tiempo necesario para detectar la aparición de
- 30 cristales de KHT (días).

Tabla 2

	A	B	C	D
concentración de manoproteínas (mg/l)	Blanco 4 °C	Blanco 40 °C	+ Alcalase [®]	+ Glucanex [®]
+ 0 mg/l	1	1	1	1
+50 mg/l	5	5	2	2
+75 mg/l	8	8	3	2
+100 mg/l	10	10	4	3

En la Tabla 2 se muestra que la actividad de las manoproteínas se reduce significativamente por la acción de la proteasa (Alcalase®) y por la actividad de β-glucanasa, celulasa, proteasa o quitinasa, o por una combinación de dos o más de cualquiera de estas actividades.

5 El cromatograma de permeación en gel de las muestras A-D se registró según se describe en la sección de Materiales y Procedimientos. En la Tabla 3 se muestra el PM de la parte superior del pico del péptido.

Tabla 3: El PM se determinó por GPC de la parte superior del pico del péptido

	A	B	C	D
	Blanco 4 °C	Blanco 40 °C	+ Alcalase®	+ Glucanex®
PM	5,0 kDa	5,0 kDa	3,5 kDa	2,3 kDa

En la Tabla 3 se muestra claramente el efecto de la actividad enzimática sobre el peso molecular de la muestra de manoproteínas.

10 **Ejemplo 4**

Reducción del color por medio de sulfito

Se preparó una solución madre de metabisulfito de potasio K₂S₂O₅ 100 mg/ml. A 5 ml de la solución de manoproteínas obtenida en el ejemplo 1 se añadieron volúmenes crecientes de solución de sulfito con el fin de obtener concentraciones finales de K₂S₂O₅ entre 0,5 g/l y 10 g/l. La primera disminución del color se observó después de 15 minutos. El color disminuyó aún más con el transcurso del tiempo. Después de 24 días a temperatura ambiente, se midió el color de las soluciones usando UV/VIS después de diluir la muestra 60 veces. La absorbancia se monitorizó a 450 nm. Una gran absorbancia a 450 nm da lugar a un color amarillento/marrón. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

20 **Tabla 4:** Absorbancia de la solución de manoproteínas a 450 nm en función de la concentración de sulfito (una solución de manoproteínas 200 g/l se diluyó 60 veces antes de la medición por UV/VIS y los valores de la absorbancia se multiplicaron por 60) y el tiempo de almacenamiento.

K ₂ S ₂ O ₅ (g/l)	Absorbancia			
	Día 12	Día 24	Día 120	Día 200
0	2,85	2,77	2,71	2,60
1	2,44	2,27	2,10	2,08
2	2,48	1,94	2,02	2,15
4	2,01	1,78	1,35	1,49
6	1,84	1,63	1,29	1,18
10	1,72	1,37	1,12	0,56

En la Tabla 4 se muestra que la absorbancia de la solución, y por ello el color de la solución, se reducen significativamente con la adición de sulfito.

25 **Ejemplo 5**

Reducción de la actividad enzimática después del tratamiento con calor.

La reducción de la actividad proteolítica (Alcalase®, Sigma Aldrich) se estudió en el siguiente experimento. Se añadieron 300.000 unidades de Alcalase® a 1 ml de solución de manoproteínas. La actividad se midió antes y después de ebullición durante 10 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

30 Los detalles de los procedimientos usados para determinar la actividad proteasa y β-glucanasa se indican en la sección de Materiales y Procedimientos.

Tabla 5: Reducción de la actividad proteolítica después del tratamiento con calor

	Unidades/ml añadidas	Unidades/ml recuperadas	Límite de detección
Manoproteínas + alcalase	300.000	283.000	600
Manoproteínas + alcalase + 10 minutos a 100 °C	300.000	<600	600

A partir de la Tabla 5 se puede ver que este tratamiento con calor reduce la actividad proteolítica por debajo del límite de detección, es decir a <0,2% de la actividad original.

Se llevó a cabo el mismo experimento con Glucanex® (Sigma Aldrich), véase la tabla 6.

Tabla 6: Reducción de la actividad glucanasa después del tratamiento con calor

	Unidades/ml añadidas	Unidades/ml recuperadas	Límite de detección
Manoproteínas + Glucanex®	1200	1000	2
Manoproteínas + Glucanex®+ 10 minutos a 100 °C	1200	<2	2

5 A partir de la Tabla 6 se puede ver que este tratamiento con calor reduce la actividad β- glucanasa por debajo del límite de detección, es decir a <0,2% de la actividad original.

Ejemplo 6

10 Se determinó la turbidez de una muestra líquida de manoproteínas (LMP) preparada de acuerdo con el procedimiento de la invención como una función del pH y la concentración usando el siguiente procedimiento:

15 Las soluciones de manoproteínas se prepararon a partir de un polvo preparado como en el Ejemplo 1, a concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400 g/l. En el caso de 400 g/l se empleó calentamiento para lograr una solubilización completa. Los valores de la turbidez se midieron en un turbidímetro HACH 2100 N (Hach-Lange) equipado con una lámpara de tungsteno (400-600 nm) a una temperatura de 20 °C. El pH de las muestras se ajustó con soluciones de HCl o NaOH a valores de pH de 4,0, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0 y 8,0.

Se disolvió una muestra de manoproteínas disponible comercialmente, Mannostab (Laffort), a una concentración de 200 g/l, y la turbidez también se midió a valores de pH de 4,0, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0 y 8,0.

Tabla 7: Valores NTU de una muestra líquida de manoproteínas (LMP) de acuerdo con la invención y una muestra comercial en función del pH y la concentración.

	pH 4,0	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0
	NTU	NTU	NTU	NTU	NTU	NTU
LMP 50 g/l	24,9	23,1	23,9	24,1	16,0	13,4
LMP 100 g/l	23,6	19,7	18,6	17,9	15,1	14,7
LMP 200 g/l	32	24,3	22,2	20	17,0	15,6
LMP 300 g/l	34,6	26,5	22,8	20,4	18,9	15,6
LMP 400 g/l	40,2	26,1	24,7	20,4	19,5	15,5
MannoStab 200 g/l	1730	584	418	288	320	n.d.

20 A partir de los datos de la Tabla 7 se puede observar que la turbidez de la preparación líquida de manoproteínas de acuerdo con la invención es bastante baja en todas las condiciones ensayadas. La turbidez es a lo sumo un 8 % de la turbidez de la muestra comercial. Este es el caso a pH bajo, tal como pH 4, así como en muestras concentradas, tal como a concentraciones de 400 g/l.

Ejemplo 7

En este ejemplo se demuestra el efecto de la adición de una muestra de manoproteína de acuerdo con la invención después de filtrar la base de vino.

Las variedades Sauvignon blanc y Chardonnay fueron clarificadas utilizando bentonita y se filtraron para obtener la base de vino. La base de vino se trató de tres maneras diferentes:

- 30
1. La base de vino se filtró usando filtración por cartuchos con un tamaño de poro de 0,45 µm. No se añadieron manoproteínas
 2. La base de vino se filtró usando filtración por cartuchos con un tamaño de poro de 0,45 µm. A continuación se añadieron manoproteínas a una concentración final de 20 g/hl
 3. Primero se añadieron manoproteínas a una concentración de 20 g/hl a la base de vino.

35

A continuación se filtró la base de vino usando filtración por cartuchos con un tamaño de poro de 0,45 μm . En la Tabla 8 se muestra la turbidez de los vinos.

Tabla 8: Turbidez (NTU)

	Blanco	Manoproteínas añadidas <u>después</u> de la filtración	Las manoproteínas añadidas <u>antes</u> de la filtración
Sauvignon	0,42	0,35	0,35
Chardonnay	0,45	0,47	0,56

- 5 Los resultados muestran que la adición de manoproteínas retrasa la formación de cristales y que se puede añadir convenientemente una solución de manoproteínas producida de acuerdo con la invención antes o después de filtrar la base de vino sin afectar significativamente a su turbidez.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una solución de manoproteínas que tiene una turbidez, cuando se mide por nefelometría a una concentración de 200 g/l de manoproteína y a un pH en el intervalo de pH 4 a pH 8, menor que 70 NTU, la cual está libre de actividad proteasa que comprende a) someter una suspensión de células de levadura a hidrólisis enzimática, mediante lo cual dichas células de levadura son degradadas y las manoproteínas y otros componentes de la levadura son solubilizados y liberados de las células de levadura degradadas; b) recuperar la manoproteína solubilizada como una solución y c) inactivar la proteasa sometiendo la solución de manoproteínas obtenida después de la etapa b) a tratamiento térmico a una temperatura de 70 °C o superior
- 5 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la etapa de
 - 10 d) tratar la manoproteína solubilizada recuperada como una solución con fosfodiesterasa.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que en la etapa c) el tratamiento es realizado a una temperatura comprendida entre 80 °C y 140 °C.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la solución de manoproteínas obtenida después de la etapa b), c) o d) es esterilizada.
- 15 5. Procedimiento para estabilizar el vino evitando o retardando la cristalización de sales de ácido tartárico, que implica
 - (a) el procedimiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4;
 - (b) añadir la solución de manoproteínas al vino o al mosto de uvas que se va a usar en la producción de vino.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la cantidad total de microorganismos viables presentes en la solución, medida en unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de la solución es menor de 10.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que la solución es una solución acuosa.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que la solución comprende además al menos un aditivo estabilizador.
- 25 9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que la solución tiene una concentración de manoproteínas entre 50 g/l y 500 g/l.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en el que la solución cuando se disuelve en agua para obtener una solución 1 g/l (sobre la base del peso seco total) tiene una turbidez, medida a un pH de 3,5, de 4 NTU o menor, y/o que cuando se disuelve en una solución de etanol en agua al 12 % v/ v para obtener una solución de 1 g/l (sobre la base del peso seco total) tiene una turbidez, medida a un pH de 3,5, de 20
 - 30 NTU o menor, y/o que cuando se disuelve en vino blanco con una concentración de 0,2 g/l (sobre la base del peso seco total) tiene una turbidez de ≤10 NTU.