

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 353**

51 Int. Cl.:

C12H 1/14 (2006.01)

C07K 14/39 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2008 PCT/EP2008/054690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2008 WO08128972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2008 E 08759378 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2137292**

54 Título: **Mezcla de péptidos como estabilizador de vinos**

30 Prioridad:

20.04.2007 EP 07106638

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

05.02.2020

73 Titular/es:

**RYMCO INTERNATIONAL AG (100.0%)
Poststrasse 30
6300 Zug , CH**

72 Inventor/es:

**LANKHORST, PETER, PHILIP y
BIJL, HENDRIK, LOUIS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 740 353 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

Mezcla de péptidos como estabilizador de vinos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende al menos el 2,5 % de una mezcla de péptidos en base al peso seco caracterizada porque los péptidos de levadura tienen un peso molecular ≥ 3 kDa y ≤ 10 kDa, en la estabilización de vinos, en particular para prevenir o retardar la formación de sales de tartrato en el vino.

Antecedentes de la invención

10 La producción de vino se caracteriza por las siguientes etapas que son bien conocidas por los expertos en la materia: a) extracción de mosto de uvas; b) someter el mosto de vino a fermentación bajo la acción de levadura para producir vino que posteriormente se separa de los residuos sólidos; c) someter opcionalmente el vino a añejamiento y d) embotellar o envasar el vino. Después de la separación del vino de los residuos sólidos presentes después de la fermentación, generalmente se forman otros insolubles en el vino en las etapas subsiguientes de su producción (por ejemplo, sólidos debido a la precipitación de sales de tartrato, por ejemplo, cuando el vino se somete a estabilización en frío). Por lo tanto, la producción de vino, especialmente si se realiza a gran escala, muy a menudo comprende la etapa de filtrar el vino para eliminar los compuestos insolubles mencionados anteriormente formados justo antes de embotellar o envasar el vino. La elaboración del vino puede comprender, según el vino que se produzca, etapas adicionales a las mencionadas anteriormente. Todas estas etapas son conocidas por los expertos en la materia.

20 La presencia de sales tartáricas, potasio hidrógeno tartrato (KHT) o tartrato de calcio (CaT) es una de las principales causas de inestabilidad de los vinos. El ácido tartárico es el principal ácido orgánico producido por la baya de la uva durante su desarrollo. Se disuelve en forma de sales de potasio y calcio en los mostos de uva durante el procesamiento de las bayas. Durante la fermentación, la solubilidad de las sales del ácido tartárico disminuye con el aumento de la concentración de etanol (debido a la fermentación de los azúcares). En los vinos jóvenes, el potasio hidrógeno tartrato (KHT) siempre está presente en concentraciones sobresaturantes y se cristaliza espontáneamente. Después del embotellado de vinos, la inestabilidad del KHT puede convertirse 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 utilizar tratamientos físicos antes de embotellar el vino para evitar la cristalización de las sales de tartrato. Estos tratamientos consisten en promover la cristalización enfriando el vino a -4 °C o eliminando los iones de potasio y tartáricos mediante electrodiálisis o mediante el uso de resinas de intercambio iónico. Sin embargo, se supone que estos procesos que consumen tiempo y energía alteran el equilibrio coloidal de los vinos.

35 La alternativa a los tratamientos físicos de los vinos es usar aditivos, que evitan la nucleación y/o el crecimiento de cristales de KHT. En un proceso de fabricación de vino (industrial) que comprende una etapa para estabilizar el vino mediante la adición de un estabilizador de vino (por ejemplo, manoproteína), dicho estabilizador de vino se puede agregar al mosto del vino o al vino. Generalmente se agrega al vino, normalmente durante el añejamiento y antes de la filtración y el embotellado. En caso de que la adición del estabilizador de vino ocurra durante el añejamiento y antes de la filtración y el embotellado, se ha encontrado que la actividad del estabilizador de vino (por ejemplo, la manoproteína) como estabilizante contra la precipitación de sales de tartrato disminuye después de la filtración del vino. Por lo tanto, se debe agregar una dosis más alta de estabilizador de vino para lograr la estabilización deseada en el vino embotellado. Una solución a este problema es, por lo tanto, agregar el estabilizador de vino como una solución después de la última etapa de filtración a la que el vino es sometido antes de embotellar.

45 La carboximetilcelulosa y el ácido metatartárico pertenecen al grupo de aditivos que inhiben el crecimiento de los cristales de KHT. Sin embargo, la carboximetilcelulosa no está aprobada como aditivo de vino en la regulación actual. El ácido metatartárico, por otro lado, es inestable al pH del vino y a la temperatura a la que se almacena el vino. Con el tiempo, el ácido metatartárico se hidroliza y su efecto protector desaparece. Por lo tanto, su uso está restringido a vinos de baja calidad para un rápido consumo. Otro inconveniente es que, dado que un aditivo es preferiblemente un componente natural del vino, este definitivamente no es el caso con ácido metatartárico o carboximetilcelulosa. Los aditivos naturales, que son activos contra la nucleación y la tasa de crecimiento de los cristales de KHT, se prefieren a los aditivos químicos. Un ejemplo de un aditivo natural es la manoproteína. La manoproteína es, junto con el glucano, el componente principal de las paredes celulares de las levaduras (Lipke P.N. et al, J. Bacteriol. (1998) 180(15): 3735-3740). La manoproteína se obtiene principalmente de células de levadura por dos tipos de procedimientos: procedimientos físicos y procedimientos enzimáticos. El procedimiento físico más común para obtener manoproteínas es el descrito en Peat S. et al, J. Chem. Soc. London (1961) 28-35, en el que la manoproteína se obtiene mediante la extracción por calor de células de levadura a pH neutro. Los procedimientos enzimáticos para obtener manoproteínas a partir de levaduras son, por ejemplo, descritos en el documento WO 96/13571, y comprende esencialmente el tratamiento de paredes celulares de levadura aisladas con una preparación de β -glucanasa y el aislamiento del producto mediante ultrafiltración. Se ha

determinado la actividad de las manoproteínas extraídas por calor o por la preparación de β -glucanasa contra la precipitación de sal de ácido tartárico. Se ha encontrado que las fracciones activas contra la estabilización del tartrato son manoproteínas extraídas de las paredes celulares de levadura usando una preparación de β -glucanasa, que tienen un peso molecular de -30-50 kDa y que están altamente glicosiladas (Dubourdieu D. et al, J. Int. Sci. Vigne Vin. (1997) vol. 31 (1) pp. 23-31).

La manoproteína puede tener la desventaja de que, una vez que se agrega al vino, da lugar a una turbidez indeseable y, en algunos casos, a la precipitación de subproductos. Además, la efectividad de la manoproteína para prevenir la nucleación y/o el crecimiento de los cristales de KHT no siempre es satisfactoria. El documento EP-A-10941 17 describe un procedimiento para producir sólidos solubles de manoproteínas en el que se reduce el problema de la turbidez causada por los subproductos presentes en las preparaciones de manoproteínas. En este procedimiento, las paredes celulares de levadura se aíslan después de la autólisis y posteriormente se someten a una hidrólisis selectiva, ya sea a 95-100 °C durante 15-30 horas o bajo la acción de β -glucanasa. En ambos casos se solubilizan la manoproteína y otras impurezas. Varias etapas son necesarias para purificar la manoproteína solubilizada. La manoproteína que es completamente soluble en vino y que es muy activa contra la precipitación de sales de ácido tartárico en vino se ha descrito en el documento WO2006/067145.

El documento US6139891 se refiere a la estabilización del vino frente a la cristalización de tartrato añadiendo manoproteínas de levadura. La fracción de manoproteínas activa tiene un peso molecular de 41,6 kDa.

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de que los aditivos para el vino muestren un efecto mejorado en la prevención y/o retraso de la formación de sales de ácido tartárico en el vino y en los que la turbidez causada por los subproductos y/o la precipitación de los subproductos sean muy limitadas o no existan. El documento US-2004/0101934 divulga el uso de un péptido bioactivo derivado de la levadura que tiene actividades tales como un agente antiestrés, un agente antifatiga, síndrome premenstrual (PMS) y relajantes para el dolor menstrual, y un factor neurotrófico cerebral.

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que los péptidos de un peso molecular específico son particularmente eficaces para estabilizar el vino contra la cristalización de sales de ácido tartárico.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Una "mezcla de péptidos" se define en el presente documento como una mezcla de péptidos con diferentes longitudes con respecto al número de aminoácidos en el péptido, así como diferentes composiciones con respecto al tipo de aminoácidos.

Un "péptido" se define en el presente documento como un compuesto que comprende dos o más residuos de aminoácidos que están unidos a través de enlaces peptídicos.

El "componente de calidad alimentaria" se define en el presente documento como un componente que es seguro para su uso en alimentos.

"Hidrolizado de proteínas" se define en el presente documento como sustratos de proteínas tratados con ácido o enzimáticamente que contienen mezclas de aminoácidos y péptidos en proporciones variables que están determinadas por el grado de hidrólisis y/o el tipo de enzimas utilizadas.

"Extracto de levadura" se define en el presente documento como una composición que comprende los componentes solubles en agua extraídos de células de levadura. En general, los extractos de levadura comprenden aminoácidos, proteínas, péptidos, vitaminas, carbohidratos y sales como los fosfatos. Los extractos de levadura también pueden comprender 5'-ribonucleótidos y/u oligonucleótidos.

La "manoproteína" se define en el presente documento de acuerdo con la RESOLUCIÓN OENO 26/2004 de la OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) como un producto que puede extraerse de células de *Saccharomyces cerevisiae* y/o paredes celulares de levadura por procedimientos fisicoquímicos o enzimáticos. Las manoproteínas son estructuras diferentes dependiendo de su peso molecular, su grado y tipo de glicosilación y su tamaño de carga.

La "actividad de proteasa" se define en el presente documento como la actividad enzimática proteolítica total debida a exoproteasas y endoproteasas.

"Libre de actividad de proteasa" se define en el presente documento como que la actividad de proteasa en la formulación líquida será menor que la actividad mínima detectable con el procedimiento utilizado para medir la actividad de proteasa. Dependiendo del tipo de proteasas que se espera que estén presentes en la formulación líquida, se pueden usar procedimientos específicos para medir la proteasa y se pueden definir unidades de proteasa específicas. Estos procedimientos son conocidos por los expertos en la materia.

La "cantidad total de microorganismos viables" se define en el presente documento como la cantidad total de microorganismos psicrófilos aerobios y anaerobios + microorganismos mesófilos aerobios y anaerobios + microorganismos termófilos aerobios y anaerobios presentes en la solución.

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1.

10 El "peso molecular" tal como se usa en el presente documento, por ejemplo, el peso molecular del péptido o biomolécula, se define mediante el procedimiento experimental para determinar el peso molecular. Uno de estos procedimientos es la ultrafiltración, que es muy conocida en la técnica. Una molécula que tiene ≥ 3 kDa molecular significa que dicha molécula queda retenida por una membrana de ultrafiltración con un límite de 3 kDa. Una molécula con un peso molecular ≤ 10 kDa significa que dicha molécula impregna una membrana de ultrafiltración con un límite de 10 kDa. Dichas membranas pueden ser del tipo de celulosa regenerada o polietersulfona.

15 En una realización preferida, la composición comprende al menos el 4 % p/p de la mezcla de péptidos en la que los péptidos tienen el peso molecular como se ha indicado anteriormente en el presente documento, más preferiblemente al menos el 6 %, más preferiblemente al menos el 8 %, más preferiblemente al menos el 10 % p/p, más preferiblemente al menos 20 % p/p, más preferiblemente al menos 25 % p/p, más preferiblemente al menos 30 % p/p, más preferiblemente al menos 40 % p/p, más preferiblemente al menos 50 % p/p, más preferiblemente al menos 60 % p/p, más preferiblemente al menos 70 % p/p, más preferiblemente al menos 80 % p/p, más preferiblemente al menos 90 % p/p, más preferiblemente al menos el 95 % p/p, lo más preferiblemente al menos el 99 % en base a la materia seca de la composición.

20 La composición puede comprender además una o más biomoléculas tales como carbohidratos y/u oligonucleótidos, dependiendo de la fuente utilizada para la fabricación de la mezcla de péptidos. Un ejemplo de tal carbohidrato es el manano. Preferiblemente, estas biomoléculas tienen el mismo peso molecular que el definido anteriormente para los péptidos en la composición de la invención.

25 La composición puede estar en forma de un sólido o en forma de un líquido o solución. La composición en forma de una formulación sólida tiene la ventaja de que dicha formulación tiene una buena estabilidad de almacenamiento y, en particular, es microbiológicamente estable. Una desventaja puede ser que el sólido se disuelva solo de manera lenta y/o incompleta. Este puede ser el caso cuando el vino o el mosto del vino al que se agrega la composición se mantiene a una baja temperatura de almacenamiento, por ejemplo, por debajo de 15 °C o incluso menor, por ejemplo, por debajo de 10 °C. Otra desventaja de la composición en forma de una formulación sólida puede ser que es difícil obtener una concentración homogénea de la composición de la invención en el vino o en el mosto de vino, debido, por ejemplo, a problemas de mezcla.

30 Por lo tanto, puede preferirse añadir la composición al vino o al mosto del vino en forma de un líquido o solución. Esto se puede lograr produciendo la composición directamente en forma de una formulación líquida, preferiblemente lista para usar, preferiblemente por el fabricante o, alternativamente, haciendo una solución de la formulación sólida de la composición estabilizadora de vino, preferiblemente por el enólogo. Dicha solución se puede hacer en agua o preferiblemente en un volumen adecuado de vino o mosto del vino. Dependiendo de la cantidad efectiva de la composición que sea necesaria para estabilizar el vino contra la cristalización del tartrato, la solución de la composición se puede preparar disolviendo la cantidad apropiada de la formulación sólida sobre la base de esta cantidad efectiva, así como una dosificación deseada y práctica de la solución al vino o al mosto del vino. Por ejemplo, puede preferirse diluir la solución en el vino o el mosto del vino 100 veces o 1.000 veces. El experto puede determinar fácilmente la cantidad efectiva de la formulación sólida, así como la dosificación de la solución, sin carga excesiva y puede ser diferente para cada vino, ya que cada vino tendrá su propio comportamiento de cristalización del tartrato.

35 En un ejemplo preferido, la composición producida directamente en forma de una formulación líquida, preferiblemente lista para usar, o, alternativamente, preparada como una solución a partir de la formulación sólida como se describe anteriormente en el presente documento, tiene un contenido de materia seca entre 50-500 g/l, más preferiblemente entre 100-400 g/l y lo más preferiblemente entre 200-300 g/l. El contenido de materia seca de la formulación líquida o la solución se puede combinar con cualquier contenido de la mezcla de péptidos como se divulgó anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, si la solución tiene un contenido de materia seca entre 50-500 g/l y una mezcla de péptidos al 2,5 % (en base a la materia seca total), esto significa que la concentración de la mezcla de péptidos en esta solución está entre 1,25 y 12,5 g/l (p/v). El experto en la materia entiende que en la formulación líquida o en la solución de la composición, todos los intervalos preferidos para el contenido de materia seca (en g/l) se pueden combinar con todos los intervalos preferidos para el contenido de la mezcla de péptidos expresada como porcentaje de la materia seca total de la composición.

55 Una composición líquida lista para usar altamente preferida tiene un contenido de peso seco de aproximadamente 200 g/l y un contenido de mezcla de péptidos de 10 % en base al peso seco que es igual a aproximadamente 20 g/l de péptidos.

La formulación líquida o la solución de la composición como se describe anteriormente en la presente invención encuentra su uso preferido en la estabilización del vino o el mosto. Por esta razón, es importante que la solución carezca de la presencia de cualquier microorganismo dañino. Además, la presencia de cualquier microorganismo viable puede tener un impacto en la estabilidad de almacenamiento de la solución y en la conservación de su actividad como estabilizador de vino. Por estas razones, en un ejemplo, la solución tiene una cantidad total de microorganismos viables, medida en Unidad de Formación de Colonias (CFU)/ml, que es inferior a 10, preferiblemente inferior a 5. Más preferiblemente, "la solución" es estéril. La cantidad total de microorganismos viables presentes en la solución como se describe anteriormente en el presente documento, medida en unidad de formación de colonias (CFU)/ml, se define en materiales y procedimientos y se establece mediante la determinación del recuento total de placas (TPC), un procedimiento que es bien conocido para los expertos en la materia y se describen brevemente en materiales y procedimientos.

La formulación líquida o la solución de la composición como se describe anteriormente en la presente invención se envasa preferiblemente en un recipiente estéril que puede cerrarse herméticamente durante el transporte y almacenamiento.

La formulación líquida o la solución de la composición como se describe anteriormente en la presente invención es preferiblemente una solución acuosa.

El pH de la formulación líquida o la solución de la composición como se describe anteriormente en la presente invención es preferiblemente tal que la estabilidad de la composición se conserva en el tiempo y de tal manera para evitar la turbidez de la solución. Por lo tanto, el pH de la solución está comprendido preferiblemente entre 3 y 8, más preferiblemente entre 4 y 7, lo más preferiblemente entre 5 y 6.

La formulación líquida o la solución de la composición como se describe anteriormente en el presente documento es de manera preferible microbiológicamente estable en el tiempo. Por lo tanto, en un ejemplo preferido, al menos un aditivo estabilizante se añade a la solución. Más preferiblemente, el aditivo estabilizante es dióxido de azufre. Más preferiblemente, se puede añadir dióxido de azufre a la solución en forma de sal de bisulfito, más preferiblemente como bisulfito de sodio o potasio ($K_2S_2O_5$). La adición de dióxido de azufre tiene otra ventaja junto con la de mantener la solución de manoproteínas microbiológicamente estable. Las soluciones de manoproteína tienen un color que puede variar de amarillo claro a marrón. Sin embargo, el uso de una solución marrón para la estabilización del vino no sería muy atractivo para el enólogo. Por lo tanto, una solución de manoproteínas para ser usada en vino o mosto debe ser preferiblemente ligeramente coloreada. Se ha encontrado que la adición de dióxido de azufre a una solución de manoproteínas puede reducir su color de marrón a amarillo pálido. Por lo tanto, la cantidad de dióxido de azufre que se agrega a la solución está preferiblemente en el intervalo de 1 a 20 g/l (medida como la cantidad de $K_2S_2O_5$ agregado).

La composición puede comprender uno o más componentes adicionales, preferiblemente de grado alimenticio. El componente es preferiblemente adecuado para uso en vino, como se define anteriormente. Ejemplos de componentes adecuados son sustratos de proteínas, hidrolizados de proteínas, extractos de levadura, carboxi metil celulosa, aditivos de vino o mezclas de dos o más de estos componentes. Ejemplos de aditivos para el vino son metatartrato, goma arábiga o manoproteína. Un aditivo de vino especialmente preferido es la manoproteína. Otro componente especialmente preferido es un hidrolizado de proteínas. Los sustratos de proteínas típicos para la preparación de hidrolizados de proteínas son proteínas vegetales como el gluten de trigo, gluten de maíz, proteína de soja, proteína de semilla de colza, proteína de guisante, proteína de alfalfa, proteína de girasol, proteína de frijol fabáceo, proteína de semilla de algodón o sésamo, proteína de maíz, proteína de cebada, proteína de sorgo, proteína de papa, proteína de arroz, proteínas de café. Otros posibles sustratos proteicos son proteínas animales, como la proteína de la leche (por ejemplo, la caseína o la proteína del suero de leche), clara de huevo, proteína del pescado, proteína de la carne, incluida la gelatina, colágeno, la proteína de sangre (por ejemplo, hemoglobina), pelo, plumas y harina de pescado.

Cuando la composición comprende hidrolizado de proteínas, esto se selecciona preferiblemente de un hidrolizado de proteínas de origen animal, vegetal o microbiano, más preferiblemente se selecciona de hidrolizado de caseína, hidrolizado de albúmina de huevo, hidrolizado de gelatina, hidrolizado de albúmina de suero bovino, hidrolizado de lisozima, hidrolizado de proteína de trigo, hidrolizado de proteína de soja, hidrolizado de proteína de guisantes o una mezcla de dos o más de estos componentes.

Preferiblemente, la formulación líquida o la solución de la composición como se describe anteriormente en el presente documento es translúcida a las concentraciones mencionadas. La translucidez se puede cuantificar como el recíproco de la turbidez de la solución a una concentración de 200 g/l de materia seca total medida con nefelometría de acuerdo con los procedimientos estándar. La formulación líquida o la solución de la composición con un contenido de materia seca de 200 g/l tiene preferiblemente una turbidez:

- a pH 4: ≤ 500 NTU, preferiblemente ≤ 250 NTU, más preferiblemente ≤ 200 NTU, más preferiblemente ≤ 150 NTU, más preferiblemente ≤ 100 NTU, más preferiblemente ≤ 50 NTU, más preferiblemente ≤ 35 NTU; y/o

• a pH 8,0: ≤ 250 NTU, preferiblemente ≤ 200 NTU, más preferiblemente ≤ 150 NTU, más preferiblemente ≤ 100 NTU, más preferiblemente ≤ 50 NTU, más preferiblemente ≤ 25 NTU, más preferiblemente ≤ 20 , más preferiblemente ≤ 15 NTU.

5 La composición, cuando se disuelve en vino o mosto de vino, debe dar un vino translúcido y estable. Por lo tanto, en un ejemplo preferido, la composición de la invención cuando se disuelve en agua para producir una solución con un contenido de materia seca de 1 g/l tiene una turbidez de ≤ 4 NTU, preferiblemente de ≤ 2 NTU, más preferiblemente de ≤ 1 NTU y/o cuando se disuelve en etanol al 12 % en agua (v/v) para producir una solución con un contenido de materia seca de 1 g/l y a un pH de 3,5 tiene una turbidez de ≤ 20 NTU, preferiblemente de ≤ 10 NTU, incluso más preferiblemente de ≤ 5 NTU, más preferiblemente de ≤ 1 NTU, y/o cuando se disuelve en
10 vino blanco para producir una solución con un contenido de materia seca de 0,2 g/l tiene una turbidez de ≤ 10 NTU, preferiblemente de ≤ 5 NTU, incluso más preferiblemente de ≤ 2 NTU, lo más preferiblemente de ≤ 1 NTU.

15 La composición para uso de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede prepararse de acuerdo con varios procedimientos. Por ejemplo, la mezcla de péptidos puede producirse usando síntesis de péptidos en fase líquida o en fase sólida o puede prepararse por hidrólisis de una fuente de péptidos. Preferiblemente, la composición del primer aspecto se prepara mediante hidrólisis enzimática de una fuente de péptidos, preferiblemente una fuente de péptidos de fuentes naturales tales como sustratos de proteínas, hidrolizados de proteínas, extractos de levadura, etc.

20 Un proceso para preparar la composición para su uso de acuerdo con el primer aspecto de la invención comprende la etapa de hidrolizar una fuente de péptido que comprende $\leq 2,5$ % de la mezcla de péptidos con los pesos moleculares de los péptidos como se define anteriormente en el presente documento.

25 La fuente de péptidos se puede hidrolizar mediante proteólisis controlada al elegir una enzima adecuada y condiciones de pH, temperatura y tiempo, con el objetivo de la formación de péptidos con pesos moleculares de ≥ 3 kDa y ≤ 10 kDa. La hidrólisis se puede realizar utilizando procedimientos químicos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, como se describe en "Savory Flavours", 1995, por T.W. Nagodawithana, Esteekay Associates Inc., Wisconsin, EE. UU., Páginas 233-237), o procedimientos enzimáticos. Preferiblemente la hidrólisis se realiza por procedimientos enzimáticos. Los expertos en la materia también conocen procedimientos enzimáticos para hidrolizar las fuentes de péptidos (Adler-Nissen, J (1986) *Enzymic hydrolysis of food proteins*, Elsevier Appl. Sci. Publ.).

30 Los sustratos proteicos adecuados que pueden servir como fuente de péptidos son caseína, albúmina de huevo, gelatina, serina albúmina bovina, lisozima, proteína de trigo, proteína de soja, proteína de guisante, levadura o una mezcla de dos o más de estos componentes. Preferiblemente, el sustrato proteico es levadura.

35 Los hidrolizados de proteínas adecuados que pueden servir como fuente de péptidos son hidrolizados de caseína, hidrolizados de albúmina de huevo, hidrolizados de gelatina, hidrolizados de serina albúmina bovina, hidrolizados de lisozima, hidrolizado de proteína de trigo, hidrolizado de proteína de soja, hidrolizado de proteína de guisante, extracto de levadura o una mezcla de dos o más de estos componentes.

40 Después de la hidrólisis de la fuente de péptidos como se describe anteriormente en el presente documento, dicha fuente de péptidos puede comprender menos del 2,5 % en base al peso seco total de una mezcla de péptidos caracterizada porque los péptidos tienen un peso molecular entre 3 kDa y 10 kDa. Con el fin de aumentar la concentración de dicha mezcla de péptidos a al menos dicha mezcla de péptidos enriquecida al 2,5 %. El enriquecimiento se puede lograr utilizando técnicas de separación conocidas en la técnica, tales como HPLC, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de permeación de gel, precipitación selectiva.

45 Una técnica de separación preferida para enriquecer la mezcla de péptidos es la filtración por membrana, preferiblemente ultrafiltración o diafiltración, bajo condiciones adecuadas para aumentar la cantidad de la mezcla de péptidos. El experto en la materia sabe cómo realizar la filtración por membrana, preferiblemente diafiltración o ultrafiltración, bajo condiciones adecuadas para producir una composición que comprenda al menos el 2,5 % p/p en base a la materia seca total de una mezcla de péptidos con pesos moleculares entre 3 y 10 kDa. Las técnicas de filtración de membrana, en particular la ultrafiltración y la diafiltración, son conocidas por los expertos en la materia. Las membranas de ultrafiltración o diafiltración adecuadas que se utilizan en el proceso del tercer aspecto son membranas de polietersulfona (PES), membranas de polietersulfona hidrófila (PES H), membranas
50 de celulosa regenerada o membranas cerámicas de límite adecuado.

55 En una realización, el enriquecimiento de la mezcla de péptidos se realiza al someter la fuente de péptidos hidrolizada a una etapa de ultrafiltración usando una membrana con un límite de 3 kDa, recolectando el retenido resultante, y opcionalmente sometiendo dicho retenido a una segunda etapa de ultrafiltración usando una membrana con un límite de 10 kDa y recolectando el permeado resultante. Alternativamente, la fuente de péptido hidrolizado se somete a una etapa de ultrafiltración utilizando una membrana con un límite de 10 kDa, recolectando el permeado resultante, sometiendo opcionalmente dicho permeado a una segunda etapa de ultrafiltración usando una membrana con un límite de 3 kDa y recolectando el retenido resultante.

Después de la hidrólisis de la fuente de péptidos y/o el enriquecimiento de la mezcla de péptidos, dicha mezcla de péptidos se puede concentrar y opcionalmente secar de acuerdo con técnicas estándar, tales como la liofilización o el secado por aspersión. En caso de que la mezcla de péptidos se recolecte como un líquido, el proceso puede comprender una última etapa de filtración estéril destinada a producir una solución estéril que se puede envasar como tal.

Las proteasas son enzimas que se pueden usar en la producción de fracciones de mezclas de péptidos o composiciones de estas a partir de fuentes naturales tales como fuentes de péptidos y que pueden estar presentes en la fracción de mezclas de péptidos o composiciones de estas como impurezas. La presencia de estas impurezas no representa un problema cuando la mezcla de péptidos o sus composiciones se aíslan como un sólido. La presencia de pequeños rastros de actividad de proteasa en una solución podría causar la degradación de la mezcla de péptidos o composiciones de estos y causar una disminución de la actividad de la mezcla de péptidos o de sus composiciones con respecto a la estabilización del vino hacia la precipitación de tartrato. Para producir una composición para usar de acuerdo con el primer aspecto que está libre de actividad de proteasa, el proceso puede comprender someter una solución de la composición a un tratamiento adecuado para inactivar la proteasa, preferiblemente sometiendo una solución de la composición de acuerdo con el primer aspecto a tratamiento térmico a una temperatura de 70 °C o superior, preferiblemente a una temperatura comprendida entre 80 °C y 140 °C, en el que el tratamiento térmico se realiza preferiblemente durante un tiempo comprendido entre 2 segundos y 60 minutos.

Cualquier tratamiento adecuado para inactivar la actividad de la proteasa se puede usar a este respecto. Más preferiblemente, se usa una etapa de calentamiento para inactivar la actividad enzimática. La temperatura utilizada en el tratamiento térmico es preferiblemente de 70 °C o más alta, preferiblemente la temperatura está entre 80 °C y 140 °C. La duración del tratamiento térmico será tal que, preferiblemente, se eliminará toda la actividad de la enzima. La duración del tratamiento térmico dependerá de la temperatura utilizada. Por ejemplo, las temperaturas más bajas requerirán una mayor duración del tratamiento térmico, mientras que las temperaturas más altas requerirán solo un tiempo corto. Por ejemplo, se prevé un tratamiento a 80 °C durante 30 minutos, así como un tratamiento a 130 °C durante 7 segundos. El tratamiento térmico se realiza preferiblemente utilizando un tratamiento UHT usando condiciones que se usan comúnmente en la industria de alimentos o bebidas. Un tratamiento UHT puede efectuarse típicamente a una temperatura de 130-145 °C durante un período de tiempo de 2-10 segundos. Con un tratamiento de calentamiento realizado a 130 °C o más durante un tiempo suficiente, por ejemplo, un tratamiento de calentamiento a 130 °C durante 7 segundos, se obtendrá una solución libre de actividad de proteasa y, en general, libre de cualquier actividad enzimática.

Al utilizar una etapa de calentamiento, generalmente, al menos parte de los microorganismos presentes en una solución de la composición de acuerdo con el primer aspecto se desactivarán o eliminarán. Preferiblemente, el tratamiento de calentamiento es un tratamiento UHT como se indicó anteriormente porque en este último caso todos los microorganismos o esporas microbianas que puedan estar presentes en la solución serán eliminados o desactivados.

El proceso puede comprender someter la composición a esterilización, preferiblemente a filtración estéril en caso de una solución para eliminar todos los microorganismos. Esto último se puede lograr utilizando filtros específicos conocidos por los expertos en la materia. Preferiblemente, la filtración estéril se realiza después de la inactivación de la proteasa, más preferiblemente se realiza como última etapa antes del envasado.

Al final del proceso de producción, la composición puede envasarse asépticamente de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Los recipientes estériles que se pueden usar pueden fabricarse de varios materiales. Los recipientes adecuados pueden ser bolsas estériles dentro de una caja de cartón. Las bolsas pueden estar provistas de una glándula que puede perforarse mediante un grifo de rosca.

Los expertos en la materia entenderán que el proceso puede comprender además una etapa en la que una solución de la composición se seca mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, por liofilización o secado por aspersión, para producir una composición en forma sólida, por ejemplo, en forma de un polvo o granulado.

La composición para el uso de acuerdo con el primer aspecto se puede usar en cualquier tipo de vino, como por ejemplo los vinos blancos, rosados, espumosos y tintos. Preferiblemente la composición se utiliza en vinos blancos y rosados.

En particular, en un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento de estabilización de vino al prevenir y/o retardar la cristalización de sales de ácido tartárico de acuerdo con la reivindicación 2. La composición se agrega preferiblemente al vino durante el añejamiento, es decir, después de la fermentación pero antes de embotellar. La invención es extremadamente adecuada para vinos blancos y vinos rosados, pero también para vinos tintos o vinos espumosos.

La composición se añade en una cantidad efectiva para lograr un efecto estabilizador. Generalmente, la composición se puede agregar al vino o al mosto de uva para usar en la fermentación para la producción de vino

5 en una concentración de entre 10-1.000 mg por litro de vino o mosto. Ya se han obtenido buenos resultados al agregar la composición hasta una concentración final en el vino de 10 a 400 mg por litro de vino. En una realización preferida, la composición se agrega al vino o al mosto de uva para usarse en la fermentación para la producción de vino en una concentración entre 10-300 mg por litro, más preferiblemente entre 20 y 250 mg por litro, incluso más preferiblemente entre 25 y 200 mg por litro, lo más preferible entre 30 y 150 mg por litro. El experto entenderá que la cantidad que se agregará también dependerá del tipo de vino, de la adición o presencia de, por ejemplo, otros estabilizadores de vino, así como del grado de sobresaturación del KHT en el vino antes de la adición.

10 En general, el vino inestable con respecto a la cristalización de sales de ácido tartárico tiene un Tcrys que puede variar entre 0,5 y 6 días. El vino estabilizado se puede obtener agregando al vino la composición en una concentración adecuada para prevenir y/o retardar la cristalización de sales de ácido tartárico. Preferiblemente, dicho vino comprende 10-1.000 mg de la composición por litro de vino. Más preferiblemente, el vino comprende 10 a 400 mg de composición por litro de vino, más preferiblemente 10-300 mg por litro, más preferiblemente entre 20 y 250 mg por litro, incluso más preferiblemente entre 25 y 200 mg por litro, lo más preferible entre 30 y 150 mg por litro. Dicho vino estabilizado se caracteriza por un vino estabilizado Tcrys/vino inestable Tcrys de al menos 2, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 10, incluso más preferiblemente entre 10 y 40 según se mide de acuerdo con el procedimiento 1.

20 La solución agregada al vino después de la filtración se puede preparar justo antes de agregarla mezclando la composición con agua o vino o puede ser una solución (lista para usar) de la composición, como se describe en detalle más arriba. Por lo tanto, la solución puede estar libre de actividad de proteasa y/o estéril y/o puede comprender además un estabilizador como se describe anteriormente.

La adición al vino puede ocurrir ya sea mezclando la formulación líquida con el vino antes de embotellar o envasar o puede agregarse directamente en la botella (o envase) antes de llenar este con vino.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos que, sin embargo, no pretenden ser limitativos.

25 Ejemplos

Materiales y procedimientos

Nucleación y crecimiento de cristales de KHT

30 La nucleación y el crecimiento de cristales de KHT en el vino se pueden medir y cuantificar mediante los siguientes procedimientos (Moutounet et al. En: Actualites Œnologiques 1999 Vieme Symposium International d'Oenologie de Bordeaux (Lonvaud-Funel ed.)).

Procedimiento 1

El primer procedimiento, indicativo de la nucleación de cristales, mide el tiempo de aparición de los cristales en el vino cuando se almacena a -4 °C. Una inspección visual se realiza diariamente y el tiempo necesario para detectar la aparición de cristales (Tcrys) se expresa en número de días.

35 **Procedimiento 2**

El segundo procedimiento, indicativo del crecimiento de cristales, mide el grado de inestabilidad tartárica (DTI) del vino. Para ello, los vinos se agitan a -4 °C y se mide la conductividad inicial. Posteriormente, se agregan cristales calibrados de KHT y la conductividad se mide luego de alcanzar un valor estable. El DTI se define como la disminución porcentual de la conductividad inicial.

40 **Procedimiento 3**

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

Determinación de aminoácidos en la mezcla de péptidos

50 Una muestra pesada con precisión de la mezcla de péptidos se hidrolizó usando HCl 6N a 110 °C durante 24 horas. Después del tratamiento estándar para eliminar el HCl, la muestra hidrolizada se disolvió en ácido diluido y los precipitados se eliminaron mediante centrifugación en una centrífuga Eppendorf. El análisis de aminoácidos se llevó a cabo en el sobrenadante transparente de acuerdo con el procedimiento PicoTag según se especifica en el manual del operador del sistema de análisis de aminoácidos de aguas (Milford MA, Estados Unidos). Para ello, se obtuvo una muestra adecuada del líquido, se añadió a ácido diluido y se homogeneizó. De la última

solución, se tomó una nueva muestra, se secó y se derivó utilizando fenilisotiocianato. Los diversos aminoácidos derivados presentes se cuantificaron utilizando procedimientos de HPLC y se sumaron para calcular el nivel total de aminoácidos en la muestra pesada.

Determinación de carbohidratos

- 5 La cantidad de carbohidratos se determinó de acuerdo con el procedimiento colorimétrico bien conocido de antrona.

Determinación de proteínas

La proteína se determinó utilizando el procedimiento bien conocido de Kjeldahl.

Determinación de turbidez

- 10 La turbidez se determinó con un medidor de turbidez HACH 2100 N (Hach-Lange, Düsseldorf, Alemania).

Recuento total de placas

- 15 Tres muestras de formulación líquida se almacenaron bajo las condiciones específicas mencionadas a continuación antes del análisis y se analizaron utilizando el procedimiento de recuento total de placas (TPC) para la posible presencia de microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos capaces de crecer en la atmósfera aerobia y anaerobia. La determinación del TPC se realizó vertiendo aproximadamente 15 ml de agar PCA (Recuento de Placa de Agar, Oxoid, Reino Unido) en 1 ml de formulación líquida presente en una placa de Petri. La incubación de TPC se ejecutó bajo una de las 6 condiciones mencionadas a continuación. Para cada condición el análisis se realizó por duplicado. En total, para cada muestra de formulación líquida, se prepararon 12 placas Petri, 6 se incubaron aeróbicamente y las otras 6 anaeróbicamente.

- 20 Condiciones para la determinación de los psicrófilos aerobios y anaerobios:

Almacenamiento de muestras: a 8 °C durante 30 días.

Análisis: TPC en placas PCA.

Incubación: aerobia o anaerobia a 8 °C durante 7 días.

Condiciones para la determinación de los mesófilos aerobios y anaerobios:

- 25 Muestras de almacenamiento: a 30 °C durante 10 días.

Análisis: TPC en placas PCA.

Incubación: aerobia o anaerobia a 30 °C durante 3 días.

Condiciones para la determinación de termófilos aerobios y anaerobios:

Muestras de almacenamiento: a 55 °C durante 10 días.

- 30 Análisis: TPC en placas PCA.

Incubación: aerobia o anaerobia a 55 °C durante 3 días.

- 35 Después del tiempo de incubación adecuado, se analizó cada placa de Petri para determinar la cantidad de colonias formadas en cada placa. La cantidad de colonias en cada placa proporciona la unidad de formación de colonias (CFU) por mililitro de formulación líquida para el tipo específico de microorganismo. La cantidad total de microorganismos viables medidos como CFU por mililitro de formulación líquida, como se define en esta solicitud de patente, está dada por CFU/ml (psicrófilos anaerobios) + CFU/ml (psicrófilos aerobios) + CFU/ml (mesófilos anaerobios) + CFU/ml (mesófilos aerobios) + CFU/ml (termófilos anaerobios) + CFU/ml (termófilos aerobios).

Medición de la actividad de la proteasa

- 40 Los grupos amino libres que se liberan después de la acción de una proteasa sobre la N,N-dimetilcaseína reaccionan con el ácido trinitrobenzenosulfónico produciendo un color amarillo que se puede medir espectrofotométricamente a 405 nm. Se usó un estándar enzimático que contiene proteasa alcalina para la calibración. Se realizaron cinco soluciones estándar con actividades de 10-60 U/ml. (Una U se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 7,59 μmol de p-nitroanilina por minuto a partir de succinil-L-alanil-L-alanil-L-propil-L-fenilalanina-para-nitroanilina (2,18 mg/ml) en pH 8,5 (TRIS 0,1 M) y 37 °C). Se mezclaron 2 ml de solución de N,N-dimetilcaseína (1,68 g/l disueltos en regulador de bórax que contenía 10 g/l de tetraborato de sodio ajustado con ácido fosfórico al 8,5 % a pH 8,5) con 200 μl de solución estándar o de muestra y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 1,2 ml de solución de ácido

trinitrobenzenosulfónico (HCl 4 mM en 12 mM). Después de 5 minutos de incubación a 37 °C, se midió la absorbancia a 405 nm. Mediante el uso de una línea de calibración, se podría calcular la actividad de muestras desconocidas. El límite de cuantificación de la prueba en una matriz de manoproteínas es de 600 U/ml.

Caracterización de la mezcla de péptidos

5 La mezcla de péptidos en la composición se puede caracterizar, por ejemplo, mediante análisis de aminoácidos o RMN. La cantidad de péptido en la composición se puede determinar por el procedimiento PicoTag como se indica en materiales y los procedimientos.

Determinación de la cantidad de la mezcla de péptidos

10 La cantidad de la mezcla de péptidos en la composición se mide como sigue. La composición se somete a ultrafiltración. La mezcla de péptidos que se retiene mediante una membrana de ultrafiltración con un límite de 3 kDa, y permea una membrana de ultrafiltración con un límite de 10 kDa se recolecta, se seca, se pesa y se determinó su porcentaje en peso con respecto a la cantidad de composición seca que fue sometida a ultrafiltración.

Peso seco total

15 El peso seco total se determinó por liofilización y posterior pesaje.

Ejemplo 1

Se disolvió un gramo de albúmina de suero bovino (BSA) en 50 ml de agua del grifo. El pH se ajustó a 8. Después de la adición de Alcalase® (Sigma Aldrich, que contiene proteasa de Bacillus licheniformis), la solución de BSA se incubó a 60 °C durante 4 horas. El pH se reajustó a pH 8 tres veces, y se añadió Alcalase adicional cada vez. Después de 4 horas, ya no se observó una caída del pH, lo que indica que la hidrólisis de la proteína se había detenido. La solución se fraccionó mediante ultrafiltración (UF), primero en una membrana de celulosa regenerada de 3 kDa YM-3 (Amicon, Millipore, Estados Unidos) en una celda agitada. A continuación, el retenido se fraccionó en una membrana de polietersulfona (PES) de 10 kDa PM-10 (Amicon, Millipore, Estados Unidos), lo que produjo un retenido y un permeado. El permeado de la primera ultrafiltración y el retenido y el permeado de la segunda ultrafiltración se liofilizaron, y se calculó el peso seco total de las fracciones UF en relación con el hidrolizado de BSA inicial. El porcentaje de peso seco de las diversas fracciones de péptidos se muestra en la tabla 1. La mayor parte de la BSA se hidrolizó con Alcalase® en fragmentos más pequeños que 3 kDa. Sin embargo, una parte significativa se retuvo en la membrana de 3 kDa, y una parte muy pequeña también fue retenida por una membrana de 10 kDa. Las fracciones UF y el hidrolizado de BSA se probaron en vino blanco sobresaturado en KHT (concentración de ácido tartárico 26 % por encima de la saturación). Se prepararon soluciones de 10 mg/ml y se añadieron alícuotas al vino para alcanzar 50, 100 y 200 mg/l de péptidos o de hidrolizado de BSA. La formación de cristales se monitorizó visualmente a diario. Los resultados se muestran en la tabla 2.

35 **Tabla 1: Peso seco total de fracciones de UF (UF) aisladas de hidrolizado de BSA (% p/p a base de materia seca de hidrolizado de BSA)**

	PM >10 kDa	3kDa<PM<10kDa	PM<3kDa
Producción (%)	1,5	10	88,5

Tabla 2: Actividad del hidrolizado de BSA y de las fracciones UF después de la hidrólisis enzimática. Primer día de cristalización a -4 °C.

	1	2	3	4
concentración (mg/l)	BSA hidrolizada antes del fraccionamiento	Fracción UF (PM>10kDa)	Fracción UF (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF (PM<3kDa)
+ 0 mg/l	1	1	1	1

40

(continuación)

	1	2	3	4
concentración (mg/l)	BSA hidrolizada antes del fraccionamiento	Fracción UF (PM>10kDa)	Fracción UF (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF (PM<3kDa)
+50 mg/l	4	precipitado	8	2
+100 mg/l	7	precipitado	13	4
+200 mg/l	11	precipitado	22	5

5 La Tabla 2 muestra que la BSA hidrolizada es activa como un inhibidor de la cristalización de KHT en el vino. La fracción UF retenida por la membrana de ultrafiltración de 10 kDa (PM>10 kDa) no es completamente soluble en vino, lo que provoca precipitados y turbidez en el vino. La fracción UF que permea la membrana de celulosa regenerada de 3 kDa (PM<3kDa) es baja en actividad. La fracción UF retenida en una membrana de celulosa regenerada de 3 kDa, pero la fracción más activa es la que permea a través de la membrana de polietersulfona de 10 kDa (3kDa<PM<10kDa).

Ejemplo 2

10 Las manoproteínas se recuperaron del extracto de levadura (Maxarome®, DSM Food Specialties) mediante ultrafiltración (UF) y posterior diafiltración (4-10 veces) sobre una membrana Nadir® hidrófila de 4 kDa de polietersulfona (Microdyn-Nadir, Alemania). Se prepararon dos conjuntos de aislados independientes (A y B). Para cada conjunto de aislados, se disolvió un gramo de las manoproteínas recuperadas en 25 ml de agua. Las soluciones se ultrafiltraron en una membrana de 10 kDa PM-10 PES (Amicon, Millipore, Estados Unidos) en una celda agitada. Los retenidos se liofilizaron y se pesaron, produciendo fracciones con un peso molecular de >10 kDa. Los permeados se ultrafiltraron en una membrana de celulosa regenerada YM-3 de 3 kDa (Amicon, Millipore, Estados Unidos) en una celda agitada. Los retenidos y los permeados se liofilizaron y se pesaron, produciendo fracciones UF con 3 kDa<PM<10 kDa. El rendimiento de las fracciones UF se presenta en la tabla 3.

20 Las fracciones UF se caracterizaron por el contenido de péptidos y carbohidratos como se indica en el material y los procedimientos, y los resultados se presentan en la tabla 4.

La actividad de las fracciones UF y de las manoproteínas de partida se probó en tres vinos diferentes como se indicó anteriormente y los resultados se presentan en la tabla 5.

Tabla 3: Peso seco total (% p/p) de las fracciones UF aisladas de manoproteínas

25

	Manoproteína >10 kDa	3 kDa< manoproteína<10 kDa	manoproteína <3 kDa
Producción			
Aislado A	88	10	2
Aislado B	58	33	5

Tabla 4: Composición de la manoproteína antes de la ultrafiltración y de las fracciones UF

	Manoproteína antes de fraccionamiento		Fracción UF de manoproteína (PM >10 kDa)		Fracción UF de manoproteína (3 kDa PM >10 kDa)		Fracción UF de manoproteína (PM <3 kDa)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Aislado	A	B	A	B	A	B	A	B
Contenido de carbohidrato (% p/p)	74	ND	79	87	30	51	5	34
Contenido de péptido (% p/p)	26	ND	21	13	70	49	95	66

Tabla 5: Actividad de las fracciones UF de manoproteína. Primer día de cristalización a -4 °C.

	Manoproteína antes de fraccionamiento		Fracción UF de manoproteína (MW > 10kDa)				Fracción UF de manoproteína (3 kDa MW < 3kDa)			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Aislado	Chardonnay francés	Rosado francés	Blanco alemán	Blanco alemán	Chardonnay francés	Rosado francés	Blanco alemán	Chardonnay francés	Rosado francés	Blanco alemán
Vino	Chardonnay francés	Rosado francés	Blanco alemán	Rosado francés	Chardonnay francés	Rosado francés	Blanco alemán	Chardonnay francés	Rosado francés	Blanco alemán
Concentración añadida al vino (mg/ml)										
+ 0 mg/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
+ 50 mg/ml	3	5	17	3	10	6	>6	3	1	2
+ 100 mg/ml	11	7	17	7	25	14	>6	4	1	2
+ 150 mg/ml	ND	10	ND	ND	ND	> 27	>6	ND	2	2
+ 200 mg/ml	17	13	22	13	> 25	> 27	>6	7	3	4

De la Tabla 5 se deduce que la fracción UF de manoproteína más activa es retenida por la membrana de celulosa regenerada de 3 kDa y permea la membrana de PES de 10 kDa. Esta fracción UF de manoproteína está fuertemente enriquecida en péptidos. También se deduce que la actividad de la mezcla de péptidos entre 3 y 10 kDa puede ser diferente para cada vino.

Ejemplo 3

En dos experimentos idénticos separados (A y B), se disolvieron 2 gramos de manoproteínas disponibles comercialmente (Mannostab®, Laffort, Francia) en 100 ml de agua. Las soluciones se ultrafiltraron (UF) en una membrana de 10 kDa PM-10 PES (Amicon, Millipore, Estados Unidos) en una celda agitada. Los retenidos se liofilizaron y se pesaron. Los permeados se ultrafiltraron en una membrana de celulosa regenerada de 3 kDa (Amicon YM-3) en una celda agitada. Los retenidos y los permeados se liofilizaron y pesaron. La actividad en vino se probó como se describió anteriormente para dos vinos: la manoproteína del experimento A se probó usando Chardonnay francés; la manoproteína del experimento B se probó utilizando vino blanco alemán. La producción de las fracciones UF aisladas de manoproteínas se presentan en la tabla 6a (experimento A) y en la tabla 6b (experimento B). Las fracciones UF se caracterizaron por el contenido de péptidos y carbohidratos como se indica en material y procedimientos, y los resultados se presentan en las tablas 7a y 7b. La actividad de las fracciones UF y de las manoproteínas de partida se probó en vino como se indicó anteriormente y los resultados también se presentan en la tabla 7a y la tabla 7b.

Tabla 6a: Peso seco total de las fracciones UF aisladas de manoproteínas (% p/p) (experimento A)

	UF >10 kDa	fracción UF >3 kDa;	fracción UF <3 kDa
		fracción UF <10 kDa	
Producción	91	3	6

Tabla 6b: Peso seco total de las fracciones UF aisladas de manoproteínas de (% p/p) (experimento B)

	UF >10 kDa	fracción UF >3 kDa; fracción UF <10 kDa	fracción UF <3 kDa
Producción	76	10	6

Tabla 7a: Actividad de las fracciones UF de manoproteína (experimento A). Primer día de cristalización a - 4 °C. Actividad medida en Chardonnay francés.

	1	2	3	4
	Manoproteína comercial antes de fraccionamiento	Fracción UF de manoproteína comercial (PM>10kDa)	Fracción UF de manoproteína comercial (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF de manoproteína comercial (PM<3kDa)
Contenido de carbohidrato (% p/p)	96	No determinado	71	No determinado
Contenido peptídico (% p/p)	4	No determinado	29	No determinado

(continuación)

	1	2	3	4
	Manoproteína comercial antes de fraccionamiento	Fracción UF de manoproteína comercial (PM>10kDa)	Fracción UF de manoproteína comercial (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF de manoproteína comercial (PM<3kDa)
Concentración de manoproteína añadida al vino (mg/l)				
+ 0 mg/l	1	1	1	1
+50 mg/l	1	1	4	1
+100 mg/l	1	1	4	1
+200 mg/l	1	1	5	2
+400 mg/l	No probado	4	11	4

Tabla 7b: Actividad de las fracciones UF de manoproteína (experimento B). Primer día de cristalización a - 4 °C. Actividad medida en vino blanco alemán.

	1	2	3	4
	Manoproteína comercial antes de fraccionamiento	Fracción UF de manoproteína comercial (PM>10kDa)	Fracción UF de manoproteína comercial (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF de manoproteína comercial (PM<3kDa)
Contenido de carbohidrato (% p/p)	96	95	78	71
Contenido peptídico (% p/p)	4	5	22	29
Concentración de manoproteína añadida al vino (mg/l)				
+ 0 mg/l	1	1	1	1
+50 mg/l	1	1	1	1
+100 mg/l	2	1	3	1

(continuación)

	1	2	3	4
	Manoproteína comercial antes de fraccionamiento	Fracción UF de manoproteína comercial (PM>10kDa)	Fracción UF de manoproteína comercial (3kDa<PM< 10kDa)	Fracción UF de manoproteína comercial (PM<3kDa)
+200 mg/l	4	1	4	2
+300 mg/l	ND	1	>6	3

De la tabla 7a y la tabla 7b se deduce que la fracción UF de manoproteína retenida por una membrana de celulosa regenerada de 3 kDa pero no por la membrana de PES de 10 kDa está enriquecida en péptidos, y esta fracción UF es más activa que las otras fracciones UF.

Ejemplo 4

Se disolvió un gramo de lisozima (Delvozyme, DSM) en 50 ml de agua del grifo. El pH se ajustó a 8. Después de la adición de Alcalase® (Sigma Aldrich), la solución de lisozima se incubó a 60 °C durante 5. El pH se reajustó a pH 8 cada hora. Después de 5 horas, no se observó una caída del pH, lo que indica que la hidrólisis de la proteína se había detenido.

La solución se fraccionó mediante ultrafiltración (UF), primero en una membrana de polietersulfona (PES) PM-10 de 10 kDa (Amicon, Millipore, Estados Unidos) en una celda agitada. A continuación, el permeado se fraccionó en una membrana de celulosa regenerada YM-3 de 3 kDa (Amicon, Millipore, Estados Unidos), produciendo un retenido y un permeado. El retenido de la primera ultrafiltración y el retenido y permeado de la segunda ultrafiltración se liofilizaron, y se calculó el peso seco total de las 3 fracciones UF en relación con el material de partida inicial de lisozima. El porcentaje en peso de varias fracciones UF se muestra en la tabla 8. La mayor parte de la lisozima se hidrolizó con Alcalase® en fragmentos más pequeños que 3 kDa. Sin embargo, una parte significativa se retuvo sobre la membrana de 3 kDa, y una parte muy pequeña también fue retenida por una membrana de 10 kDa. Las fracciones UF de lisozima se probaron en vino rosado sobresaturado en KHT. Se prepararon soluciones de 10 mg/ml y se añadieron alícuotas al vino para alcanzar 50, 100 y 200 mg/l de péptidos. La formación de cristales se monitorizó visualmente a diario. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 8: Peso seco total de las fracciones UF aisladas de hidrolizado de lisozima (% p/p en base a la materia seca del hidrolizado de lisozima)

	UF >10 kDa	3kDa<UF<10kDa	UF<3kDa
Producción	1	17	82

Tabla 9: Actividad de las fracciones UF derivadas de lisozima después de la hidrólisis enzimática. Primer día de cristalización a -4 °C.

	1	2	3	4
Concentración agregada al vino (mg/l)	Lisozima antes de hidrólisis enzimática	Fracción UF (PM>10kDa)	Fracción UF (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF (PM<3kDa)
+ 0 mg/l	1	1	1	1

(continuación)

	1	2	3	4
Concentración agregada al vino (mg/l)	Lisozima antes de hidrólisis enzimática	Fracción UF (PM>10kDa)	Fracción UF (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF (PM<3kDa)
+50 mg/l	Precipitado	precipitado	11	3
+100 mg/l	Precipitado	precipitado	>14	4
+200 mg/l	Precipitado	precipitado	>14	6

5 La Tabla 9 muestra que la fracción UF retenida por la membrana de ultrafiltración de 10 kDa (PM >10 kDa) no es completamente soluble en vino, lo que provoca precipitados y turbidez en el vino. La fracción UF que permea la membrana de celulosa regenerada de 3 kDa (PM<3 kDa) es baja en actividad. La fracción UF retenida en una membrana de celulosa regenerada de 3 kDa, pero que permea a través de la membrana de polietersulfona de 10 kDa (3kDa <PM<10kDa) es la fracción más activa.

Ejemplo 5

10 Se disolvió un gramo de Pepton (proteína hidrolizada de una fuente vegetal, Sigma) en 25 ml de agua del grifo. El pepton se utilizó como tal, sin tratamiento con Alcalase®. La solución se fraccionó mediante ultrafiltración (UF), primero en una membrana de polietersulfona (PES) PM-10 de 10 kDa (Amicon, Millipore, Estados Unidos) en una celda agitada. A continuación, el permeado se fraccionó en una membrana de celulosa regenerada YM-3 de 3 kDa (Amicon, Millipore, Estados Unidos), produciendo un retenido y un permeado.

15 El retenido de la primera ultrafiltración y el retenido y permeado de la segunda ultrafiltración se liofilizaron, y se calculó el peso seco total de las 3 fracciones UF con respecto al material de partida inicial de pepton. El porcentaje en peso de las diversas fracciones de péptidos se muestra en la tabla 10.

Tabla 10: Peso seco total de las fracciones UF aisladas de pepton vegetal (% p/p en base a la materia seca del material de partida)

	PM>10 kDa	3 kDa<PM<10 kDa	PM<3 kDa
Producción	5	6	89

20 Las fracciones UF de pepton se probaron en vino blanco sobresaturado en KHT. Se prepararon soluciones de 10 mg/ml y se añadieron alícuotas al vino para alcanzar 50, 100 y 200 mg/l de péptidos. La formación de cristales se monitorizó visualmente a diario. Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Actividad de fracciones UF fracciones (UF) de pepton. Primer día de cristalización a -4 °C.

	1	2	3	4
Concentración agregada al vino (mg/l)	Peptona antes del fraccionamiento	Fracción UF (PM>10kDa)	Fracción UF (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF (PM<3kDa)
+ 0 mg/l	1	1	1	1
+50 mg/l	1	precipitado	1	1

(continuación)

	1	2	3	4
Concentración agregada al vino (mg/l)	Peptona antes del fraccionamiento	Fracción UF (PM>10kDa)	Fracción UF (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF (PM<3kDa)
+100 mg/l	1	precipitado	3	1
+200 mg/l	1	precipitado	6	1

Ejemplo 6

5 Se disolvió un gramo de gelatina (de piel de cerdo, Sigma) en 50 ml de agua del grifo. El pH se ajustó a 8. Se añadió Alcalase® (Sigma Aldrich) y se realizó una incubación a 60 °C durante 4 horas. El pH se reajustó a pH 8 cada hora. Después de 4 horas, no se observó una caída del pH, lo que indica que la hidrólisis de la proteína se había detenido.

10 La solución se fraccionó mediante ultrafiltración (UF), primero en una membrana de polietersulfona (PES) PM-10 de 10 kDa (Amicon, Millipore, Estados Unidos) en una celda agitada. A continuación se fraccionó en una membrana de celulosa regenerada YM-3 de 3 kDa (Amicon, Millipore, Estados Unidos), produciendo un retenido y un permeado. El retenido de la primera ultrafiltración y el retenido y permeado de la segunda ultrafiltración se liofilizaron, y se calculó el peso seco total de las fracciones UF en relación con el material de partida de gelatina inicial. El porcentaje en peso de las diversas fracciones de péptidos se muestra en la tabla 12.

15 La mayor parte de la gelatina fue hidrolizada por Alcalase® en fragmentos más pequeños que 3 kDa. Sin embargo, una parte significativa se retuvo en la membrana de 3 kDa, y una parte muy pequeña también fue retenida por una membrana de 10 kDa. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 12: Peso seco total de las fracciones UF aisladas de gelatina después del tratamiento con proteasa (% p/p en base a la materia seca del material de partida)

	PM >10 kDa	3kDa<PM<10kDa	PM<3kDa
Producción	1	19	80

20 **Tabla 13: Actividad de las fracciones UF (UF) a partir de gelatina hidrolizada. Primer día de cristalización a -4 °C.**

	1	2	3	4
Concentración agregada al vino (mg/l)	Gelatina antes de proteasa	Fracción UF (PM>10kDa)	Fracción UF (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF (PM<3kDa)
+ 0 mg/l	1	1	1	1
+50 mg/l	precipitado	Desprovisto*	<3	<3
+100 mg/l	precipitado	Desprovisto*	6	<3
+200 mg/l	precipitado	Desprovisto*	8	<3
• no disponible debido a producción baja				

Ejemplo 7

5 Se disolvió un gramo de caseína (Sigma) en 50 ml de agua del grifo. El pH se ajustó a 8. Se añadió Alcalase® (Sigma Aldrich) y se realizó una incubación a 60 °C durante 4 horas. El pH se reajustó a pH 8 cada hora. Después de 4 horas, no se observó una caída del pH, lo que indica que la hidrólisis de la proteína se había detenido.

La solución se fraccionó mediante ultrafiltración, primero en una membrana de polietersulfona (PES) PM-10 de 10 kDa (Amicon, Millipore, Estados Unidos) en una celda agitada. A continuación, el permeado se fraccionó en una membrana de celulosa regenerada YM-3 de 3 kDa (Amicon, Millipore, Estados Unidos), produciendo un retenido y un permeado.

10 El retenido de la primera ultrafiltración y el retenido y permeado de la segunda ultrafiltración se liofilizaron, y se calculó el peso seco total de las fracciones UF con respecto al material de partida de caseína inicial. El porcentaje en peso de las varias fracciones de UF se da en la tabla 14.

15 La mayor parte de la caseína fue hidrolizada por Alcalase® en fragmentos más pequeños que 3 kDa. Sin embargo, una parte significativa se retuvo en la membrana de 3 kDa, y una parte muy pequeña también fue retenida por una membrana de 10 kDa. Los resultados se muestran en la tabla 15.

Tabla 14: Peso total seco de las fracciones UF (UF) aisladas de la caseína después del tratamiento con proteasa (% p/p en base a la materia seca del material de partida)

	PM >10 kDa	3kDa<PM<10kDa	PM<3kDa
Producción	0,2	26	74

Tabla 15: Actividad de las fracciones UF a partir de caseína hidrolizada. Primer día de cristalización a -4 °C.

20

	1	2	3	4
Concentración agregada al vino (mg/l)	Caseína antes de proteasa	Fracción UF (PM>10kDa)	Fracción UF (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF (PM<3kDa)
+ 0 mg/l	1	1	1	1
+50 mg/l	precipitado	Desprovisto*	<3	<3
+100 mg/l	precipitado	Desprovisto*	5	<3
+200 mg/l	precipitado	Desprovisto*	7	<3
* no disponible debido a producción baja				

Ejemplo 8

25 Se disolvió un gramo de albúmina de huevo (Sigma) en 50 ml de agua del grifo. El pH se ajustó a 8. Se añadió Alcalase® (Sigma Aldrich) y se realizó una incubación a 60 °C durante 4 horas. El pH se reajustó a pH 8 cada hora. Después de 4 horas, no se observó una caída del pH, lo que indica que la hidrólisis de la proteína se había detenido.

30 La solución se fraccionó mediante ultrafiltración, primero en una membrana de polietersulfona (PES) PM-10 de 10 kDa (Amicon, Millipore, Estados Unidos) en una célula agitada. A continuación, el permeado se fraccionó en una membrana de celulosa regenerada YM-3 de 3 kDa (Amicon, Millipore, Estados Unidos), produciendo un retenido y un permeado.

El retenido de la primera ultrafiltración y el retenido y permeado de la segunda ultrafiltración se liofilizaron, y se calculó el peso seco total de las fracciones UF en relación con el material de partida inicial de albúmina de huevo. El porcentaje en peso de las diversas fracciones de péptidos se muestra en la tabla 16.

5 La mayor parte de la albúmina de huevo fue hidrolizada por Alcalase® en fragmentos más pequeños que 3 kDa. Sin embargo, una parte significativa se retuvo en la membrana de 3 kDa, y una parte muy pequeña también fue retenida por una membrana de 10 kDa. Los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 16: Peso seco total de las fracciones UF aisladas de la albúmina de huevo después del tratamiento con proteasa (% p/p en base a la materia seca del material de partida)

	PM >10 kDa	3kDa<PM<10kDa	PM<3kDa
Producción	29	27	43

10 **Tabla 17: Actividad de las fracciones UF de albúmina de huevo hidrolizada. Primer día de cristalización a -4 °C.**

	1	2	3	4
Concentración agregada al vino (mg/l)	Albúmina de huevo antes de proteasa	Fracción UF (PM>10kDa)	Fracción UF (3kDa<PM<10kDa)	Fracción UF (PM<3kDa)
+ 0 mg/l	1	1	1	1
+50 mg/l	precipitado	precipitado	5	<3
+100 mg/l	precipitado	precipitado	6	<3
+200 mg/l	precipitado	precipitado	12	<3

REIVINDICACIONES

1. El uso de una composición para prevenir y/o retardar la cristalización de sales de ácido tartárico en un vino, comprendiendo la composición al menos el 2,5 % de una mezcla de péptidos en base al peso seco de la composición, en la que los péptidos son de levadura y tienen un peso molecular entre 3 kDa y 10 kDa.
- 5 2. Un procedimiento de estabilización de vino previniendo y/o retardando la cristalización de sales de ácido tartárico en el que una composición que comprende al menos 2,5 % de una mezcla de péptidos en base al peso seco de la composición, **caracterizado porque** los péptidos en la mezcla de péptidos tienen un peso molecular entre 3 kDa y 10 kDa, se agregan al vino o al mosto de uva para usar en la producción de vino.
- 10 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la composición se agrega al vino o al mosto de uva para usarse en la fermentación para la producción de vino en una concentración entre 10-1.000 mg de mezcla de péptidos por litro de vino o mosto.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el vino es vino blanco o vino rosado.
5. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que la composición se añade al vino después de la filtración y antes del embotellado del vino.
- 15 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que la composición comprende además una o más biomoléculas preferiblemente seleccionadas de carbohidratos y/u oligonucleótidos.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que la composición está en forma de un sólido o en forma de un líquido o solución.
- 20 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la composición es un líquido o solución y tiene un contenido de materia seca entre 50-500 g/l.
9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que la composición comprende además uno o más componentes, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en un sustrato proteico, sustrato, un hidrolizado de proteínas, un extracto de levadura, carboximetilcelulosa y un aditivo de vino.
- 25 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el aditivo de vino es manoproteína.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el hidrolizado de proteína es de origen animal, vegetal o microbiano.