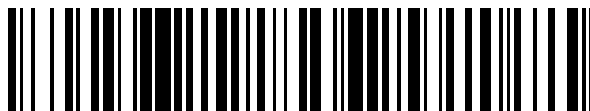


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 524**

21 Número de solicitud: 201731214

51 Int. Cl.:

A23J 3/34 (2006.01)

C12G 1/00 (2009.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

16.10.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.04.2019

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

21.05.2019

Fecha de concesión:

02.10.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

09.10.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
Pabellon de Brasil- Pº de las Delicias, s/n
41013 Sevilla (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

**GORDILLO ARROBAS, Belén;
RODRIGUEZ PULIDO, Francisco José;
RODRIGUEZ MORGADO, Bruno;
PARRADO RUBIO, Juan;
GONZALEZ-MIRET MARTIN, Maria Lourdes;
ESCUDERO GILETE, María Luisa;
HERNANZ VILA, Dolores;
HERNANDEZ HIERRO, Jose Miguel;
CEJUDO BASTANTE, María Jesús;
JARA PALACIOS, Maria José;
NOGALES BUENO, Julio;
BACA BOCANEGRA, Berta;
RIVERO GRANADOS, Francisco José y
HEREDIA MIRA, Francisco José**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Procedimiento para obtener un hidrolizado enzimático a partir de semillas sobremaduras de uva y uso del mismo**

57 Resumen:

Procedimiento para obtener un hidrolizado enzimático a partir de semillas sobremaduras de uva y uso del mismo.

La presente invención se refiere a un procedimiento basado en la hidrólisis enzimática en medio básico de la fracción proteica de semillas de uva sobremaduras para la obtención un hidrolizado enzimático natural de peso molecular variable. La presente invención también se refiere al hidrolizado enzimático obtenido por dicho procedimiento y al uso del mismo como estabilizante del color en vinos tintos.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 709 524 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para obtener un hidrolizado enzimático a partir de semillas sobremaduras de uva y uso del mismo

5

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener un hidrolizado enzimático a partir de semillas sobremaduras de uva y uso de dicho hidrolizado como estabilizador del color en vinos tintos. Por tanto, la presente invención se podría enmarcar dentro la industria enológica en el sector técnico de la elaboración y

10 tratamiento de vinos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cultivo de la vid y la elaboración de vinos se enfrentan a problemas relacionados con altas temperaturas ambientales. En primaveras secas y veranos calurosos, el

15 periodo comprendido entre el color de cambio de uva y su madurez industrial óptima disminuye, mientras que aumenta el desfase entre la madurez de la pulpa y las partes sólidas. Esto dificulta que las uvas alcancen la correcta madurez fenólica, produciendo colores pobres e irregulares. Estos problemas de “caídas de color” son bien conocidos por los enólogos en regiones de clima cálido, por lo que se han desarrollado diferentes

20 estrategias para apaciguar sus efectos en la medida de lo posible. Una de las posibles técnicas para evitar estas caídas de color es modular las interacciones entre pigmentos y copigmentos del vino (Gómez-Míguez, M. et al, *J. Food Eng.* 79 (2007) 271–278). Entre éstas, la adición de fuentes naturales de copigmentos es considerada una alternativa a la vinificación tradicional, generalmente a partir de fuentes naturales

25 de origen enológico como orujo, hollejos o chips de madera. Estas fuentes son ricas en compuestos polifenólicos, que han sido tradicionalmente considerados los mejores copigmentos para los antocianos (Gordillo, B. et al. *Food Chem.* 206 (2013) 249–259; Gordillo, B. et al., *Food Chem.* 141 (2013) 2184–2190).

30

Aparte de estos compuestos fenólicos, las semillas de uva contienen aproximadamente un 14% de proteínas, las cuales son biopolímeros naturales con capacidad copigmentante (Fantozzi, P. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58 (1981) 1027–1031). El contenido total de proteínas en toda la baya depende de la variedad y del grado de

35 maduración (Bertazzo, A. et al. *J. Mass Spectrom.* 45 (201) 966–970; López-Miranda,

S. et al. *Food Chem.* 127 (2011) 481–486), aunque se concentran mayoritariamente en el endospermo de las semillas. Los tipos de proteínas encontrados en semillas de uva son similares a los que están presentes en otras especies de plantas, teniendo multímeros con amplios intervalos de pesos moleculares. Suelen estar estabilizados mediante interacciones no covalentes entre diferentes subunidades, y estudios recientes afirman que son susceptibles de ser potencialmente útiles en aplicaciones prácticas (Gazzola, D. et al. *Food Chem.* 155 (2014) 132–139).

En la industria vitivinícola se han utilizado diferentes agregados para mejorar la estabilidad y el color en el vino, pero el método que propone la presente invención utiliza una fuente de la propia industria, lo cual no sólo implica que el hidrolizado que se añade al vino para estabilizar su color no sea ajeno a éste, sino que también mejora el aprovechamiento de residuos de la industria vitivinícola.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención tiene por objeto un procedimiento basado en la hidrólisis enzimática en medio básico de la fracción proteica de semillas de uva sobremaduras para la obtención un hidrolizado enzimático natural de peso molecular variable. La utilización de semillas en avanzado estado de madurez reduce la interferencia de los compuestos polifenólicos en el proceso hidrolítico, debido a que éstos experimentan reacciones de polimerización con la maduración, lo que conlleva una cierta insolubilización.

Mediante el proceso de copigmentación, los péptidos protegen el color de los compuestos de origen antociánico presente en los vinos tintos mediante el fenómeno de la copigmentación, por lo que el hidrolizado enzimático obtenido puede utilizarse como estabilizador del color en los vinos tintos.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a procedimiento para la obtención un hidrolizado enzimático a partir de semillas sobremaduras de uva caracterizado por comprender las siguientes etapas:

(a) separación de la semilla de uva sobremadura del orujo de uva, obtención de una harina de semilla y desengrasado de la harina de semilla mediante extracción de su fracción lipídica,

- (b) tratamiento de la de la harina de semilla desengrasada obtenida en la etapa a) con una disolución alcalina para la extracción de proteínas, acidificación del extracto obtenido hasta obtener un precipitado, separación del precipitado y redisolución del mismo en agua para obtener un concentrado acuoso proteico,
- 5 (c) hidrólisis enzimática del concentrado acuoso proteico obtenido en el paso (b) para obtener un hidrolizado enzimático.

En una realización preferida de la invención, el procedimiento comprende una etapa d) de centrifugación del hidrolizado enzimático del paso (c). Tras la centrifugación del

10 paso (d), se obtiene, por un lado, un precipitado formado por los restos del material de partida que permanece insoluble (principalmente fibra insoluble y parte de proteínas sin digerir) y, por otro lado, un sobrenadante compuesto principalmente por proteínas, péptidos y aminoácidos, así como otros componentes minoritarios solubilizados durante el proceso (fundamentalmente fenoles y azúcares).

15

En otra realización preferida de la invención, el procedimiento comprende una etapa (e) de separación del sobrenadante (hidrolizado enzimático) del precipitado obtenidos en la etapa (d).

20 En otra realización preferida de la invención, el procedimiento comprende una etapa (f) de clarificación del hidrolizado enzimático sobrenadante obtenido en la etapa (e) mediante filtración del mismo. Preferiblemente la filtración se lleva a cabo con un filtro de 0,2 μm .

25 En otra realización preferida de la invención, el procedimiento comprende una etapa (g) de eliminación de polifenoles del hidrolizado enzimático clarificado obtenido en el paso (f). Preferiblemente, la eliminación de polifenoles se realiza mediante adsorción con polivinilpolipirrolidona (PVPP), más preferiblemente con PVPP 20% p/v (20 g PVPP/L del medio de hidrólisis. Esta eliminación de polifenoles se tiene que hacer en

30 este punto y no antes, ya que los fenómenos de adsorción no suceden selectivamente y es necesario que el medio esté filtrado y clarificado.

En una realización preferida de la invención, tras la eliminación de los polifenoles, el hidrolizado enzimático se centrifuga (etapa (h)) para separar el PVPP en caso de estar presente y otras partículas insolubles.

En otra realización preferida, tras dicha centrifugación, el hidrolizado enzimático se concentra hasta la obtención de una pasta sólida (etapa (i)).

- 5 En otra realización preferida, la pasta sólida obtenida en la etapa (i) se somete a una etapa (j) de secado por liofilización de la misma.

En la etapa (a), la semilla de uva sobremadura es separada del orujo preferiblemente mediante métodos físicos tales como el tamizado, ya que tienen un tamaño menor que
10 los restos de hollejos y raspones presentes en el orujo. Una vez separada la semilla de uva sobremadura, se prepara la harina de la misma preferiblemente mediante trituración y tamizado de la semilla de uva sobremadura separada del orujo. El desengrasado se realiza preferiblemente mediante Soxhlet, con disolventes orgánicos apolares, tales como el hexano. Más preferiblemente, la extracción mediante Soxhlet
15 se realiza durante 24 horas aproximadamente, dependiendo de la escala del proceso y de la cantidad de muestra a desengrasar. El disolvente orgánico se evapora posteriormente y se puede determinar la cantidad de lípidos por gravimetría.

En una realización preferida, la extracción en medio alcalino de la etapa (b) se realiza
20 con una solución de NaOH, más preferiblemente NaOH 10 M.

En una realización preferida, la acidificación de la etapa (b) se realiza con HCl, más preferiblemente HCl 6M.

- 25 En otra realización preferida, la acidificación de la etapa (b) se realiza hasta pH entre 2,5 y 3,5, preferiblemente 3,0, obteniéndose un precipitado proteico ácido (fracción proteica insoluble) que se recupera preferiblemente mediante centrifugación.

En otra realización preferida, una vez realizada la extracción en medio alcalino y
30 previamente a la acidificación, el extracto obtenido se deja decantar hasta que el sobrenadante no muestra turbidez (aproximadamente 3 días). El sobrenadante es el que se somete posteriormente a la acidificación.

En otra realización preferida, el pH al que se realiza la hidrólisis enzimática de la etapa

(c) es alcalino, más preferiblemente el pH varía entre 8 y 9. La temperatura a la que se lleva a cabo la etapa de hidrólisis es de entre 50 y 55 °C, más preferiblemente a 55 °C, todo ello con el objetivo de solubilizar la proteína del material de partida (residuo agroindustrial proteico de semilla de uva sobremadura) y a su vez mantener la actividad proteolítica de las enzimas elegidas durante la duración del proceso. Esta temperatura se alcanza una situación de compromiso entre la actividad de la enzima y la solubilidad del producto, ya que si se alcanza la temperatura de 60 °C, la enzima disminuye su actividad a los 30 minutos.

10 La hidrolisis enzimática se realiza preferiblemente en un periodo entre tres horas y tres horas y media (dependiendo de la escala del proceso) en agitación continua.

Las enzimas que son efectivas en el proceso de hidrólisis descrito en el método de la presente invención (etapa c)) son enzimas proteolíticas, preferiblemente de acción endoproteasas, comúnmente usadas en la hidrólisis de proteínas. Éstas incluyen tripsina, quimiotripsina y combinaciones de ambas, las cuales son estables a las condiciones del método de hidrólisis descritas en la invención y no se inactivan al pH utilizado. Tales enzimas (endoproteasas) son comerciales, inespecíficas y bien conocidas y caracterizadas desde un punto de vista científico para los parámetros óptimos de pH y temperatura.

En la presente invención se entiende por orujo de uva al residuo sólido obtenido como subproducto tras el proceso de vinificación.

25 En la presente invención se entiende por semilla de uva sobremadura a aquella semilla procedente de uvas que han superado ampliamente la madurez tecnológica necesaria para elaborar vinos de mesa, alcanzando un grado de azúcares superior a 25 °Brix”, y que se utilizan para la elaboración de vinos generosos.

30 En la presente invención se entiende por vino generoso a aquéllos con una graduación alcohólica elevada (a partir de 15^o) por ser obtenidos a partir de uvas con gran concentración de azúcares y/o que conllevan la adición de alcohol vínico extra previa a la crianza en madera.

35 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del hidrolizado enzimático obtenido

mediante el método descrito en el primer aspecto de la invención como estabilizante del color en vinos tintos.

5 Un último aspecto de la invención se refiere al uso de semillas de uva sobremaduras obtenidas como subproducto de la elaboración de vinos generosos para la obtención de un hidrolizado enzimático como se ha definido en el segundo aspecto de la presente invención.

10 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1: muestra una gráfica que representa el incremento de la actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/L}$) de una solución antociánica (Mv-3glc) tras la adición de concentraciones crecientes del hidrolizado enzimático de la presente invención.

20

FIG. 2: muestra una gráfica que representa el incremento de la intensidad colorante de una solución antociánica (Mv-3glc) tras la adición de concentraciones crecientes del hidrolizado enzimático de la presente invención.

25

FIG. 3: muestra una gráfica que representa la degradación de color (%) de una solución antociánica (Mv-3glc) tras la adición de concentraciones crecientes del hidrolizado enzimático de la presente invención, durante un periodo de almacenamiento de 30 días.

30

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

35

Ejemplo 1: Preparación de un hidrolizado enzimático a partir de semillas sobremaduras de uva según el procedimiento de la presente invención

5 El residuo agroindustrial proteico que se emplea en el procedimiento de invención es semilla sobremadura de uva (*Vitis vinífera* L.) procedente de orujos obtenidos de la elaboración de vinos generosos tradicionales de clima cálido, las cuales cumplen la calidad higiénico sanitaria mínima para ser reutilizadas con interés industrial. La composición nutricional media de semillas de uva y su composición media de aminoácidos se presentan, a modo de ejemplo, en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

10

Tabla 1. Composición nutricional media de semillas de uva (Zhou et al., 2011).

Composición % (p/p)	
Humedad	10 %
Sólidos Totales	90 %
- Proteínas	10-14 %
- Carbohidratos	12,5 %
- Lípidos	22 %
- Fibra	30 %
- Otros	11,5-15,5 %

Tabla 2. Composición media de aminoácido de semilla de uva (Wu and Lu, 2004).

aminoácido	Contenido (g/100 g proteína)
Lys	2,41
Met	1,25
Cys	0,91
Phe	3,64
Tyr	2,9
Ile	4,72
Leu	7,33
Thr	3,56
Val	6,94
His	2,43
Arg	6,51
Gly	11,39

Ser	6,01
Ala	6,49
Asp	8,16
Glu	20,49
Pro	4,85

En primer lugar, la semilla de uva sobremadura es separada del orujo mediante tamizado, ya que tienen un tamaño menor que los restos de hollejos y raspones presentes en el orujo. Tras su separación, se somete a un proceso de acondicionamiento que incluye la trituración y posterior tamizado hasta obtener harina de semilla seca.

Posteriormente, se extrae la fracción lipídica de la harina de semilla mediante un Soxhlet, durante 24 horas, con disolventes orgánicos apolares como el hexano. El disolvente orgánico se evapora posteriormente y se determina la cantidad de lípidos por gravimetría. En la Tabla 3 se muestra la caracterización química de la harina desengrasada obtenida.

Tabla 3. Caracterización química de la harina desengrasada de semilla de uva sobremadura usada en la invención para la obtención del hidrolizado enzimático de bajo peso molecular.

	Harina desengrasada de semilla de uva sobremadura
% Materia seca	100 %
% Humedad	0 %
% sobre materia seca (p/p)	
% Proteínas	12,5 %
% Lípidos	0 %
% Carbohidratos	79,4 %
% Cenizas	7,1 %
% Fenoles	1 %

La obtención de un concentrado proteico a partir de la harina desengrasada de semilla de uva sobremadura se realiza mediante una extracción en medio alcalino a pH constante 10,5 con NaOH 10 M, durante 3 horas, en una proporción 1:10 (p/v). Tras la extracción alcalina, la suspensión se deja decantar durante 3 días y se recoge el

sobrenadante. Posteriormente, el sobrenadante se acidifica hasta pH 3.0 con HCl 6 M, obteniéndose un precipitado proteico ácido (fracción proteica insoluble) que se recupera mediante centrifugación (3000 g., 10 min).

5 El extracto proteico obtenido en el paso anterior, se somete a hidrolisis enzimática en un biorreactor acondicionado para mantener el pH constante durante todo el proceso de hidrólisis. Este pH constante asegura una actividad óptima de la enzima. El proceso hidrolítico para la obtención del hidrolizado proteico a partir del extracto proteico de semilla de uva se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones:

10 Sustrato: extracto proteico obtenido en la etapa anterior: 10% (p/v; 100 g de semillas/L en agua desionizada)

Enzima: endoproteasas (tripsina y quimiotripsina); 0.3% (v/v; 3 ml/L en agua desionizada)

Temperatura: 55 °C

15 pH: 8,5

Agitación constante: 300 rpm

Tiempo de reacción: 3 horas

20 Un vez que la hidrolisis enzimática ha procedido durante un periodo de tiempo preferible igual a 3 horas, se procede a la centrifugación del hidrolizado obtenido en dicho paso.

Tras la centrifugación se obtiene, por un lado, un precipitado formado por los restos del material de partida que permanece insoluble (principalmente fibra insoluble y parte de proteínas sin digerir) y, por otro lado, un sobrenadante compuesto principalmente por proteínas, péptidos y aminoácidos, así como otros componentes minoritarios solubilizados durante el proceso (fundamentalmente fenoles y azúcares). En la Tabla 4 se muestra la distribución de los pesos moleculares del hidrolizado enzimático proteico obtenido.

30 Tabla 4. Distribución de los pesos moleculares del hidrolizado enzimático proteico obtenido a partir de semilla de uva, según el método de invención.

	hidrolizado enzimático
>10 kDa	25,09 %

10-5 kDa	12,27 %
5-3 kDa	7,17 %
3-1 kDa	17,93 %
1 kDa - 300 Da	15,93 %
<300 Da	21,61 %

Dicho sobrenadante se clarifica haciéndolo pasar por un filtro de 0,2 μm y se somete a la eliminación de polifenoles mediante adsorción con PVPP (20% p/v; 20 g PVPP/L).

- 5 Tras la eliminación de los polifenoles, el hidrolizado enzimático se centrifuga para separar el PVPP y otras partículas insolubles, se concentra hasta la obtención de una pasta sólida y se liofiliza.

Ejemplo 2: Efecto del hidrolizado enzimático obtenido en el ejemplo 1 como estabilizador del color del vino tinto

10

Este ejemplo pone de manifiesto la efectividad del método de invención para la obtención de un hidrolizado enzimático soluble en agua a partir de semilla de uva sobremadura cuyas propiedades antioxidantes y copigmentantes permiten su uso en la industria vinícola, concretamente en la vinificación de vinos tintos como agentes estabilizadores del color de origen natural y agentes que mejoran las propiedades biofuncionales.

15

La distribución de los pesos moleculares del hidrolizado enzimático obtenido a partir de harina desengrasada de semilla de uva sobremadura y su fracción proteica de bajo peso molecular (<1 kDa) se muestran en la Tabla 4 anteriormente indicada.

20

Las propiedades biológicas y copigmentantes, así como estabilizantes de color, del hidrolizado enzimático obtenido mediante el método de la invención, se evalúan en soluciones modelo con antocianos propios de la uva de vinificación y del vino tinto (patrón de malvidina 3-glucosido comercial). En concreto, el ensayo consiste en medir la modificación de tales propiedades antes y después de la adición del hidrolizado

25

enzimático a la solución antociánica (150 mg/L), a una concentración de proteínas similar a las que se usarían en la vinificación (150, 300 y 600 mg/L).

En cuanto a las propiedades biológicas de la fracción de bajo peso molecular (< 1kDa), ésta presentó actividad antioxidante dependiente de su concentración (Figura 1). La actividad antioxidante de las soluciones antociánicas antes y después de la adición hidrolizado enzimático se determinó según el método espectrofotométrico FRAP (Benzie and Strain, 1996), expresada como actividad antioxidante de Trolox equivalente (Ensayo TEAC: Capacidad Antioxidante como Equivalentes Trolox o, en inglés, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), considerada como los μmol de Trolox con la misma capacidad antioxidante que 1 L de solución antociánica ($\mu\text{mol TE/L}$).

En cuanto a las propiedades copigmentantes y estabilizadoras del color del hidrolizado enzimático de la invención, éste presentó capacidad de incrementar la intensidad colorante de las soluciones antociánicas (Figura 2) así como de disminuir su degradación de color durante un periodo de almacenamiento de 30 días (Figura 3). Las propiedades colorimétricas de las soluciones antociánicas y sus variaciones, antes y después de añadir el preparado proteico, se evaluaron mediante Colorimetría Diferencial según la metodología descrita en Gordillo y col. (Gordillo, B. et al. 60 (2012) 2896–2905; Gordillo, B. et al. 63 (2015) *J. Agric. Food Chem.* 7645–7653).

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener un hidrolizado enzimático a partir de semillas sobremaduras de uva caracterizado por comprender las siguientes etapas:
 - 5 (a) separación de la semilla de uva sobremadura del orujo de uva, obtención de una harina de semilla y desengrasado de la harina de semilla mediante extracción de su fracción lipídica;
 - (b) tratamiento de la de la harina de semilla desengrasada obtenida en la etapa (a) con una disolución alcalina para la extracción de proteínas, acidificación del
10 extracto obtenido hasta obtener un precipitado, separación del precipitado y redisolución del mismo en agua para obtener un concentrado acuoso proteico;
 - (c) hidrólisis enzimática del concentrado acuoso proteico obtenido en el paso (b) para obtener un hidrolizado enzimático.
- 15 2. Procedimiento, según reivindicación 1, caracterizado por comprender una etapa (d) de centrifugación del hidrolizado enzimático obtenido en la etapa (c) para obtener un precipitado y el hidrolizado enzimático sobrenadante.
3. Procedimiento, según reivindicación 2, caracterizado por comprender una etapa (e)
20 de separación del hidrolizado enzimático sobrenadante del precipitado obtenido en la etapa (d).
4. Procedimiento, según reivindicación 3, caracterizado por comprender una etapa (f) de clarificación del hidrolizado enzimático sobrenadante obtenido en la etapa (e)
25 mediante filtración del mismo.
5. Procedimiento, según reivindicación 4, caracterizado porque la etapa (f) de clarificación se lleva a cabo con un filtro de 0,2 μm .
- 30 6. Procedimiento, según reivindicación 4 o 5, caracterizado porque comprende una etapa (g) de eliminación de polifenoles del hidrolizado enzimático clarificado obtenido en el paso (f).
7. Procedimiento, según reivindicación 6, donde la eliminación de polifenoles se
35 realiza mediante adsorción con polivinilpirrolidona.

8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, caracterizado porque comprende una etapa (h) de centrifugación del hidrolizado enzimático clarificado obtenido en la etapa (g).
- 5 9. Procedimiento, según reivindicación 8, caracterizado porque comprende una etapa (i) de concentración hasta la obtención de una pasta sólida del hidrolizado enzimático obtenido en la etapa (h).
- 10 10. Procedimiento, según reivindicación 9, caracterizado porque comprende una etapa (j) de liofilización de la pasta sólida obtenida en la etapa (h).
11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la harina de uva sobremadura se prepara en la etapa (a) mediante trituración y tamizado de la semilla separada previamente del orujo.
- 15 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el desengrasado la harina de uva sobremadura de la etapa (a) se realiza mediante Soxhlet y con disolventes orgánicos apolares.
- 20 13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la extracción en medio alcalino de la etapa (b) se realiza con una disolución de NaOH.
- 25 14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la acidificación de la etapa (b) se realiza con una disolución de HCl.
15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la acidificación de la etapa (b) se realiza hasta pH entre 2,5 y 3,5.
- 30 16. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el pH al que se realiza la hidrólisis enzimática de la etapa (c) es alcalino.
17. Procedimiento, según reivindicación 16, caracterizado porque el pH al que se realiza la hidrólisis enzimática de la etapa (c) está entre 8 y 9.
- 35 18. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la hidrólisis enzimática de la etapa (c) se realiza a una temperatura de entre 50 y 55 °C.

19. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la hidrólisis enzimática de la etapa (c) se realiza con endoproteasas.
20. Procedimiento, según reivindicación 19, caracterizado porque las endoproteasas
5 son seleccionadas de tripsina, quimiotripsina y combinaciones de ambas.
21. Hidrolizado enzimático obtenido mediante el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
- 10 22. Uso del hidrolizado enzimático descrito en la reivindicación 21 como estabilizante del color en vinos tintos.
23. Uso de semillas de uva sobremaduras mencionadas en la reivindicación 1 para la obtención de un hidrolizado enzimático.

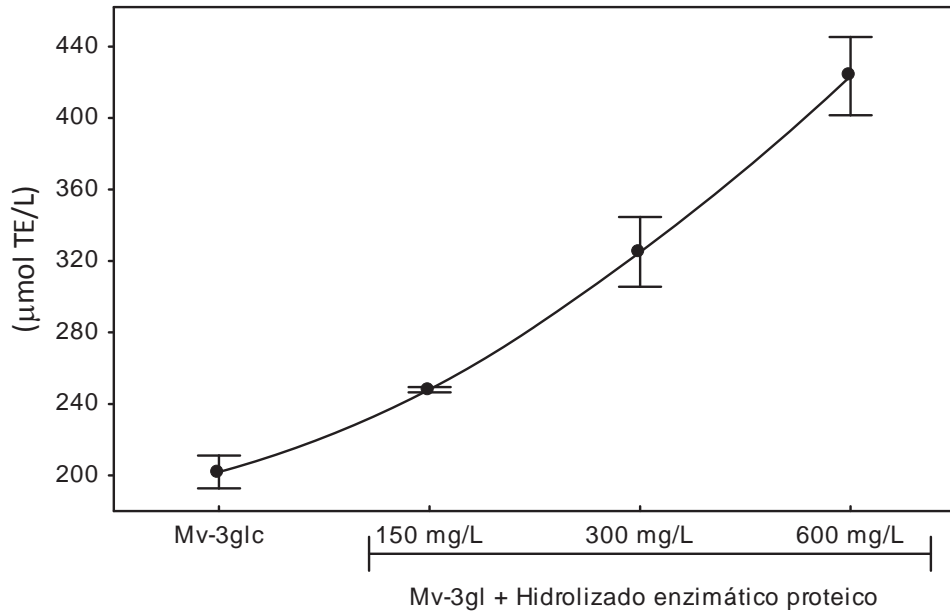


FIG. 1

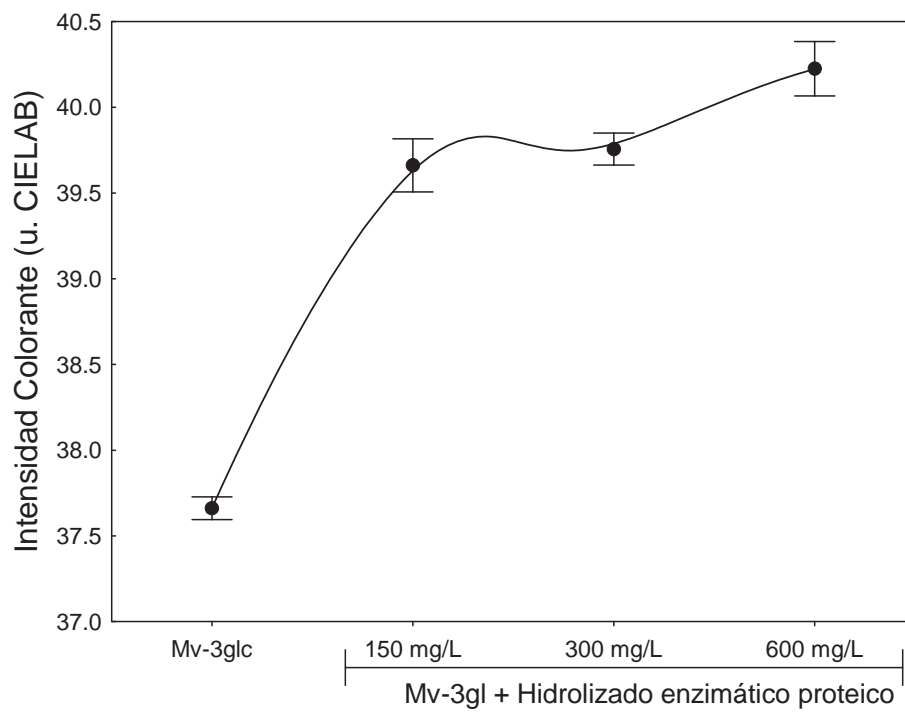


FIG. 2

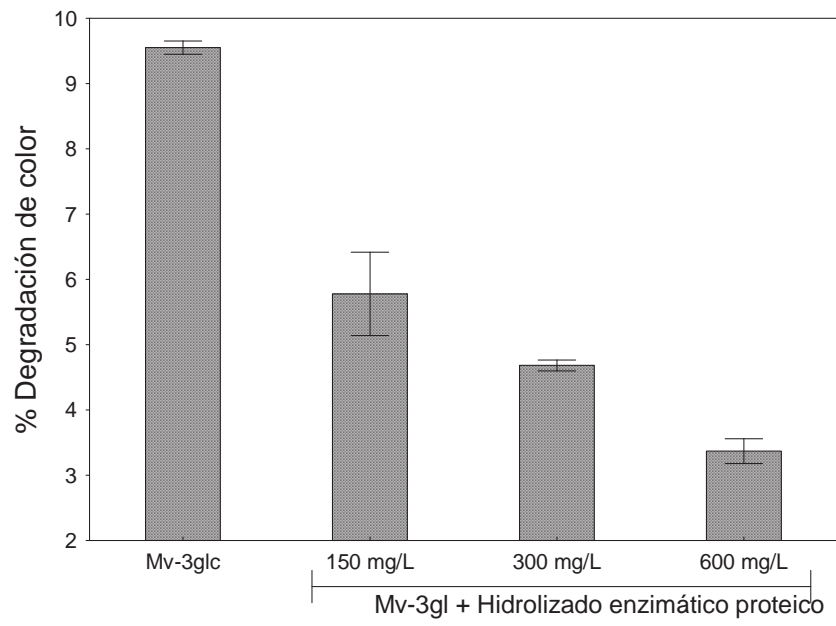


FIG. 3