

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 février 2002 (14.02.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/12473 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 11/04

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR01/02537

(22) Date de dépôt international : 3 août 2001 (03.08.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

00/10319 4 août 2000 (04.08.2000) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
LALLEMAND SA [FR/FR]; 130, route d'Espagne, B.P.
1021, F-31023 Toulouse Cedex 1 (FR). PROENOL-IN-
DUSTRIA, LDA [PT/PT]; Rua Joaquim Agostinho, 183,
P-4405-227 Canelas (PT).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DULAU,
Laurent [FR/FR]; 15, rue de la Bourse, F-31000 Toulouse
(FR). DE FATIMA TEIXEIRA CARDOSO DA SILVA,
Maria [PT/PT]; Travessa da Junqueira n°98 - Francelos,
P-4405 Gulpilhares (PT). SANTOS, Leonor [PT/PT]; Rua
Alfonso III, n°18, R/Chao, Esq., P-5000 Vila Real (PT).

(74) Mandataire : MORELLE, Guy; Cabinet Morelle & Bar-
dou, SC, 5, Bd de la Méditerranée, BP 4127, F-31400
Toulouse Cedex 4 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasi-
en (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un
brevet (règle 4.17.ii) pour les désignations suivantes AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE,
SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,
ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasi- en (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: PREPARATION OF IMMOBILISED ACCLIMATED MICRO-ORGANISMS, PRODUCTION METHOD AND USE FOR REACTIVATING INTERRUPTED FERMENTATION PROCESSES

(54) Titre : PREPARATION DE MICRO-ORGANISMES ACCLIMATES IMMOBILISES, PROCEDE DE PRODUCTION ET APPLICATION A LA RELANCE DE FERMENTATIONS ARRETEES

(57) Abstract: The invention concerns a preparation of micro-organisms immobilised in beads acclimated to alcohol and/or acidity, and partly dried, capable of developing a fermenting activity when they are introduced in alcohol or acid musts. The invention also concerns a method for obtaining such a preparation comprising an acclimating step and an immobilising step for the micro-organisms, said steps being carried out in any sequence, but necessarily preceding a partial dehydrating step. The invention provides the advantages on enabling the micro-organisms to be preserved in viable and active form for several months, and to be used directly for reactivating interrupted fermenting processes, in particular alcoholic fermentation processes, for producing wine and other fermented beverages.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet une préparation de microorganismes immobilisés dans des billes, acclimatés à l'alcool et/ou à l'acidité, et partiellement séchés, capables de développer une activité fermentative dès leur introduction dans des moûts alcoolisés ou acides. La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une telle préparation comprenant une étape d'acclimatation et une étape d'immobilisation des microorganismes, ces étapes pouvant être effectuées dans un ordre indifférent, mais précédant obligatoirement une étape de déshydratation partielle. Les avantages de la présente invention résident dans la possibilité de conserver les microorganismes sous forme viable et active pendant plusieurs mois, et dans leur utilisation directe pour la relance des fermentations arrêtées, particulièrement des fermentations alcooliques, pour la production de vin ou autres boissons fermentées.



WO 02/12473 A2



-
- *relative au droit du déposant de revendiquer la priorité de la demande antérieure (règle 4.17.iii) pour toutes les désignations*
 - *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv) pour US seulement*
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

Publiée :

- *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport*

PRÉPARATION DE MICRO-ORGANISMES ACCLIMATÉS IMMOBILISÉS,
PROCÉDÉ DE PRODUCTION ET APPLICATION À LA RELANCE DE
FERMENTATIONS ARRÊTÉES

5

La présente invention concerne une préparation de micro-organismes immobilisés dans des billes semi-humides capables d'assurer la reprise de fermentation de boissons fermentées.

10

Il est connu que les micro-organismes immobilisés peuvent servir à l'élaboration de boissons fermentées telles que le vin, la bière, le champagne, les boissons pétillantes à degré d'alcool variable.

Différents modes d'immobilisation de cellules sont connus, on peut citer en particulier :

15

- La demande de brevet EP 0350374 A1 qui décrit la préparation de micro-organismes immobilisés dans des gels sensiblement déshydratés, dont l'utilisation est destinée à la préparation de boissons fermentées.

20

- La demande de brevet EP 0173915 B1 qui décrit la préparation d'un biocatalyseur à cellules immobilisées dans un gel pour la fermentation et/ou la prise de mousse de vin champagnisé ou obtenu selon la méthode champenoise.

- Le brevet FR 2570959 qui décrit la méthode d'obtention de billes contenant des micro-organismes employés pour la fermentation des boissons citées plus haut.

25

Dans toutes ces techniques, les microorganismes sont immobilisés dans des matrices polymériques et introduits dans le moût dès le début du processus de fermentation, alors que les conditions du milieu sont favorables à leur activité métabolique. Cependant il arrive souvent que la fermentation soit ralentie voire stoppée avant que les teneurs en sucre et en alcool et/ou acide aient atteint les niveaux voulus. Il est alors nécessaire de relancer la fermentation par un nouvel apport de microorganismes.

30

Le problème posé actuellement est de disposer d'un outil permettant la relance d'une fermentation arrêtée sans étapes fastidieuses d'acclimatation des microorganismes. En effet, après arrêt accidentel d'une fermentation en cours, l'addition de microorganismes pour relancer la fermentation, par exemple de levure dans le cas des fermentations alcooliques, nécessite une étape dite d'acclimatation desdits microorganismes aux conditions du milieu de fermentation (en particulier du fait de la concentration d'alcool et/ou d'acide déjà produit); à défaut d'une telle étape, les microorganismes non acclimatés subissent un stress qui provoque

35

généralement la perte de leur viabilité, et donc l'échec de la tentative de relance de fermentation. Par conséquent, les techniques actuellement utilisées doivent choisir entre deux schémas.

5 Un premier schéma fait appel à des microorganismes sous forme sèche, qui sont réhydratés puis progressivement acclimatés avant introduction dans le moût. L'acclimatation consiste à soumettre les microorganismes à une incubation pouvant durer de quelques heures à plusieurs jours, dans des milieux de concentration en alcool et/ou d'acidité croissante, et ce juste avant leur utilisation.

10 Un second schéma fait appel à des microorganismes préalablement acclimatés en dehors du lieu d'utilisation. Ils sont transportés sous forme humide et introduits tels quels dans le moût. Dans ce dernier cas, ils doivent être employés dans un délai bref de quelques jours, leur durée de conservation étant faible.

15 Cependant, il n'a pas été possible jusqu'à présent de combiner les avantages liés aux deux techniques: cellules séchées et cellules acclimatées. En effet, le séchage de microorganismes, qui permet généralement une bonne conservation et un transport facile, n'est pas applicable aux microorganismes acclimatés, levures notamment, car il provoque dans ce cas une mortalité importante et rapide.

20 La présente invention concerne une préparation de microorganismes, possédant à la fois les caractéristiques intéressantes des microorganismes sous forme séchée et des microorganismes acclimatés. En effet, il a été trouvé de façon surprenante que des microorganismes immobilisés et acclimatés dans des billes de polymères partiellement séchées permettait à la fois une bonne viabilité desdits microorganismes et le maintien de leur capacité à relancer une fermentation arrêtée, et ce même après un stockage prolongé de plusieurs mois.

30 Ainsi, la présente invention a pour objet des préparations de microorganismes, immobilisés dans des billes de polymère et acclimatés à l'alcool et/ou à l'acidité, aptes à assurer une relance des fermentations arrêtées. La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention de telles préparations de microorganismes.

35 La préparation de microorganismes selon l'invention peut être réalisée avec n'importe quel genre de microorganisme vivant, susceptibles d'être immobilisé et acclimatés à l'alcool et/ou à l'acidité. De tels microorganismes sont décrits dans la littérature et sont bien connus de

l'homme du métier. Selon un mode préféré de mise en œuvre de la présente invention, les microorganismes immobilisés sont des levures, de préférence du genre *Saccharomyces*, telle que *Saccharomyces cerevisiae*.

5 Les billes dans lesquelles les microorganismes sont immobilisés sont composées de polymères réticulés formant une matrice, compatibles avec une bonne viabilité des microorganismes et avec leur utilisation dans des applications alimentaires. De tels polymères peuvent être des polysaccharides, de préférence un gel d'alginate de calcium. L'alginate est un polymère linéaire extrait d'algues et composé d'acide α -D-manuronique et
10 α -L-guluronique. On peut également utiliser par exemple des matrices de polyacrylamide, de pectate ou de carraghénane.

On appelle "billes" des particules de forme sphérique ou de toute autre forme, obtenues par fractionnement de la matrice de polymère incluant les microorganismes. Selon une des
15 caractéristiques de la présente invention, la taille moyenne de ces particules est comprise entre 0,1 et 5 mm, de préférence entre 1 et 3 mm. Selon une autre caractéristique de l'invention, la proportion de microorganismes par rapport au polymère est comprise entre 1 et 50%, de préférence entre 5 et 20% en poids sec.

20 Selon une autre caractéristique de l'invention, l'humidité des billes polymériques est contrôlée de telle sorte que celles-ci présentent un aspect sec, mais contiennent un proportion d'eau suffisante pour maintenir la viabilité des microorganismes. L'humidité est déterminée par la mesure de l'activité de l'eau A_w dans les billes, ladite activité étant comprise entre 0,1 et 0,5, et de préférence entre 0,3 et 0,4.

25 Selon une caractéristique de l'invention les microorganismes vivants immobilisés sont également acclimatés c'est-à-dire qu'ils présentent un état physiologique leur permettant de développer un métabolisme fermentatif dès leur introduction dans des moûts à des concentrations en alcool et/ou en acide élevées, sans chute importante d'activité. En d'autres
30 termes, les microorganismes vivants, acclimatés et immobilisés de la préparation selon l'invention présentent la capacité de démarrer directement après une étape de réhydratation, une fermentation dans un moût présentant un degré alcoolique compris entre 5 et 15° et un pH compris entre 2,8 et 4,0.

35 En outre, les microorganismes vivants, acclimatés et immobilisés de la préparation selon l'invention conservent ces propriétés durant plusieurs mois, ce qui présente un avantage décisif pour leur exploitation commerciale. Pour cela, il suffit de conserver les billes

contenant les micro-organismes partiellement déshydratés, dans un emballage étanche à la vapeur d'eau, maintenu de préférence à une température relativement basse, classiquement d'environ 4°C. Dans ces conditions on obtient une excellente conservation des microorganismes pendant au moins six mois de stockage.

5

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une préparation de microorganismes telle que décrite ci-avant, comprenant les opérations suivantes

10

a)- acclimater lesdits microorganismes à l'alcool et / ou à l'acide,
b)- immobiliser lesdits microorganismes dans des billes de polymère,
c)- déshydrater partiellement lesdites billes,
réalisées dans l'ordre chronologique [a) puis b) puis c)], ou bien [b) puis a) puis c)].

15

Selon la présente invention, les étapes d'acclimatation et d'immobilisation peuvent être effectuées dans un ordre indifférent, mais doivent obligatoirement précéder l'étape de déshydratation partielle.

20

Selon un mode préféré de réalisation de la présente invention, les microorganismes ainsi préparés sont des levures, de préférence du genre *Saccharomyces*, qui sont immobilisées dans des billes de polysaccharides réticulés, de préférence dans un gel d'alginate, dans une proportion de 1 à 50%, de préférence de 5 à 20% en poids sec, par rapport audit polymère.

25

On réalise au départ une culture de microorganismes dans un milieu de culture classique. Puis à partir de ces microorganismes, on réalise soit d'abord l'acclimatation, soit d'abord l'immobilisation des microorganismes, les techniques utilisées pour chaque opération étant indépendantes l'une de l'autre ainsi que de l'ordre choisi pour les exécuter.

30

Il est possible, dans une variante de mise en œuvre, de ne pas utiliser immédiatement les microorganismes obtenus par culture, mais de les conserver sous forme séchés pour la durée désirée. Dans ce cas, on prendra soin de les réhydrater selon une des méthodes bien connues des professionnels, avant de réaliser soit l'acclimatation, soit l'immobilisation des microorganismes.

35

En ce qui concerne l'immobilisation de microorganismes, les techniques en sont connues. Par exemple, les procédés décrits dans les brevets cités précédemment sont utilisables. En général, on réalise la réticulation d'une solution polymérique contenant les microorganismes à enrober, puis on fractionne de la matrice obtenue par des moyens mécaniques, le plus souvent par broyage, pour former des billes de polymère contenant les microorganismes

ainsi piégés. Une autre technique couramment employé consiste à faire passer les microorganismes en suspension dans une solution polymérique, à travers une buse pour former des gouttes, qui sont mises en contact avec un agent gélifiant dans une phase hydrophobe sous agitation. Selon un aspect particulier de l'invention, les microorganismes sont immobilisés dans une matrice de polymère capable de former un gel insoluble dans le vin, tel que l'alginate, selon un procédé connu (comme par exemple celui décrit par DIVIES *et al*, in Proc. Colloque SFR, Compiègne, 1979).

En ce qui concerne l'acclimatation, les techniques en sont également bien connues. En général, on incube des microorganismes séchés dans une solution de degré l'alcool ou d'acidité comparable à celui du milieu dans lequel on souhaite les faire agir. Par exemple, dans le cas de levures destinées à la relance de la fermentation d'un milieu alcoolique, on incube les levures sèches pendant 30 minutes à 37°C dans un vin titrant 10° d'alcool additionné de saccharose. Puis, on récupère les levures par exemple par centrifugation, et on les met en suspension dans une solution d'alginate en vue de l'étape d'immobilisation.

Si les levures sont déjà sous forme immobilisées, on réalise une réhydratation puis une incubation comme précédemment. On termine par l'étape de séchage.

L'étape de déshydratation partielle peut être effectuée par une des techniques suivantes: lyophilisation, séchage sur lit fluidisé, étuvage, jusqu'à obtention d'une activité de l'eau A_w dans lesdites billes de polymère, comprise entre 0,1 et 0,5, de préférence entre 0,3 et 0,4. Ces techniques sont choisies du fait qu'elles permettent de contrôler le taux d'humidité atteint, c'est-à-dire de réaliser une déshydratation ménagée. On obtient des billes d'aspect sec, mais contenant une petite proportion d'humidité de manière à maintenir la viabilité des microorganismes.

Selon une modalité particulière de mise en œuvre de l'invention, on conserve les billes partiellement déshydratées contenant les micro-organismes acclimatés, dans un emballage étanche à la vapeur d'eau, qui est de préférence maintenu à une température relativement basse, de préférence d'environ 4°C. Dans ces conditions on obtient une excellente conservation des microorganismes pendant plusieurs mois de stockage.

Ainsi préparées et éventuellement stockées, les préparations de microorganismes selon l'invention peuvent être utilisées, immédiatement ou dans un délai de plusieurs mois, directement après une simple réhydratation, et sans étape d'acclimatation, à la relance de fermentations arrêtées, en particulier à la relance des fermentations alcooliques arrêtées, telles

que la fermentation des vins rouges ou blancs, de l'hydromel, ou de toute autre boisson préparée par fermentation alcoolique.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lumière des exemples non limitatifs ci-après.

EXEMPLES

Exemple 1: Préparation de billes d'alginate semi-humides contenant des levures *Saccharomyces cerevisiae* immobilisées, préalablement acclimatées à l'alcool

Dans cet exemple, des levures préalablement acclimatées à l'alcool, sont immobilisées dans des billes préparées à partir d'une solution d'alginate de sodium. La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* L43^(R) commercialisée par la société Lallemand (France) est utilisée. L'étape d'acclimatation consiste à incuber pendant 30 minutes à 37°C les levures à raison de 100 g de levures sèches pour 1 litre de liquide, dans un vin titrant 10° d'alcool et additionné de 100 g de saccharose par litre. Après incubation, les levures sont récupérées par centrifugation et resuspendues dans la solution d'alginate de sodium à 4%.

Cette solution passe ensuite dans un système de tubes soumis à des vibrations qui permettent la formation de gouttes. Ces gouttes sont ensuite gélifiées au contact d'une solution 0,2 M de chlorure de calcium. Le temps de contact est de 30 minutes.

Les billes ainsi formées sont lavées par immersion pendant 10 minutes dans de l'eau désionisée. Les billes sont ensuite séchées partiellement sur lit fluidisé jusqu'à obtenir une activité en eau A_w comprise entre 0.3 et 0.4. La température de séchage est inférieure ou égale à 40°C. Le diamètre des billes obtenues est de 2 à 4 mm. Après les contrôles qualité les levures sont emballées et stockées à 4°C avant utilisation.

Exemple 2 : Acclimatation de levures préalablement immobilisées

Des levures obtenues par réhydratation dans l'eau de levures sèches actives L2226^(R) commercialisée par la société Lallemand (France), sont immobilisées puis acclimatées. Des billes d'alginate sont préparées comme dans l'exemple 1 ci-dessus avec des levures non acclimatées. Les billes obtenues sont ensuite récupérées par tamisage et incubées 30 minutes à 37°C dans un vin à 10° d'alcool additionné de 100 g de saccharose par litre. Après tamisage

et lavage par une solution de chlorure de sodium à 9 g/l, les billes sont soumises à l'étape de séchage dans les conditions décrites dans l'exemple 1.

Après les contrôles qualité les levures sont emballées et stockées à 4°C avant utilisation.

5

Exemple 3: Stabilité des levures au cours du stockage

10

Afin d'estimer la stabilité des levures, l'activité de billes contenant la levure *Saccharomyces cerevisiae* est mesurée au temps 0 (juste après la production des billes) et après 6 mois de conservation à 4°C. Le contrôle suivant est réalisé :

- 30 grammes de billes préparées selon l'exemple 1 ci-dessus sont placées dans une solution de glucose à 50 g/l (volume 100 ml) à 37°C.
- La solution est maintenue à 37°C et l'évolution de la concentration du sucre est suivie au cours du temps.

15

Dans les deux échantillons (t = 0 et t = 6 mois), une concentration en sucre inférieure à 2 g/l correspondant à la fin de la fermentation est obtenue au bout de 2 heures. La fin de la fermentation est obtenue après le même temps d'incubation. Les levures immobilisées préparées selon l'exemple 1 sont donc stables pendant au moins 6 mois de stockage à 4°C.

20

Exemple 4 : Application au vin blanc

25

Le vin blanc utilisé dans cet exemple est un vin de Sauvignon présentant les caractéristiques suivantes :

- degré d'alcool acquis au moment de l'inoculation avec les billes : 12,75 °
- sucres résiduels : 14,64 g/l

30

On procède à la reprise de fermentation en utilisant la levure L43(R) commercialisée par la société Lallemand (France), immobilisée sous forme de billes obtenues selon l'exemple 1, conditionnée en unités de 5 kg. La dose d'utilisation est de 200 g de billes par hl de vin. Pour les besoins de l'essai, le vin en arrêt de fermentation est réparti en deux bonbonnes de 25 l (modalités 1 et 2) et deux cuves de 150 hl (modalités 3 et 4).

35

Ces modalités sont les suivantes (la température est régulée entre 18 et 20°C) :

- modalité 1. témoin négatif: vin non ensemencé
- modalité 2. témoin positif: vin ensemencé par des levures L43(R), sous forme de levure

sèche, à la dose de 20 g/hl, réhydratées, non acclimatées

- modalité 3. vinensemencé avec des levures L43^(R), sous forme de levure sèche, à la dose de 20 g/hl, réhydratées, acclimatées à l'alcool selon le protocole dit I.T.V. connu par l'homme de l'art (durée des phases de réhydratation et d'acclimatation : 7 jours)

5 - modalité 4. vinensemencé avec des levures L43^(R) immobilisées obtenues selon l'exemple 1, préparées selon le protocole suivant:

Préparation des levures L43^(R) immobilisées (modalité 4) :

10 a) 30 kg de billes en sac sont plongées, à la température de 37°C, dans une cuve contenant une solution de 60 l d'eau contenant 600 g de glucose / fructose (50/50) et 480 g de NaCl.

b) Après 30 minutes, les sacs sont retirés et trempés, dans les mêmes conditions, dans une nouvelle solution, identique à la précédente.

15 c) Ensuite les sacs sont immergés dans la cuve contenant le vin dont la fermentation alcoolique doit être relancée.

Pour chacune des 4 modalités, on suit l'évolution du taux de sucre en fonction du temps. Les résultats de ce suivi sont présentés dans le tableau 1 suivant :

TABLEAU 1

20	JOURS	SUCRES RÉSIDUELS (g/l)			
		Modalité 1	Modalité 2	Modalité 3	Modalité 4
	0	14,64	14,64	14,64	14,64
	1				13,66
25	4				12,50
	5				12,10
	7	14,64	14,67	14,64	
	9			12,46	
	10				8,88
30	11			10,54	8,00
	14	16,62	14,64	8,66	5,71
	17				4,34
	20			5,55	2,48
	22	14,65	14,60	3,07	
35	24				1,80
	26	14,64	14,62	2,00	

On constate que le procédé selon la présente invention (modalité 4) permet d'obtenir un achèvement de la fermentation, au bout d'une durée plus courte que celle observée avec les mêmes levures acclimatées selon la méthode habituelle (modalité 3), toutes choses étant égales par ailleurs. On n'observe pas, dans l'un et l'autre cas, d'augmentation de l'acidité volatile.

Le procédé d'application selon la présente invention présente ainsi deux avantages essentiels:
-il permet une économie de temps de 2 jours pour la durée totale de l'opération de fermentation,

-il demande 1 heure et non plus 7 jours de préparation et de suivi du pied de cuve.

Exemple 5: Application au vin rouge

Le vin rouge utilisé dans cet exemple est un vin de cépage Merlot présentant les caractéristiques suivantes :

- degré d'alcool acquis au moment de l'inoculation avec les billes : 99,9 g éthanol/l
- pH : 3,2
- sucres résiduels : 19,29 g/l

On procède à la reprise de fermentation en utilisant la levure L2226^(R) commercialisée par la société Lallemand (France), immobilisée sous forme de billes obtenues selon l'exemple 2, conditionnée en unités de 5 kg. La dose d'utilisation est de 200 g de billes par hl de vin. Pour les besoins de l'essai, le vin en arrêt de fermentation est réparti en deux bonbonnes de 25 l (modalités 1 et 2) et deux cuves de 5 hl (modalités 3 et 4).

Ces modalités sont les suivantes (la température est régulée entre 20 et 25°C) :

- modalité 1. témoin négatif : vin nonensemencé,
- modalité 2. témoin positif : vinensemencé par des levures L2226^(R), sous forme de levure sèche, à la dose de 20 g/hl, réhydratées, non acclimatées,
- modalité 3. vinensemencé avec des levures L2226^(R), sous forme de levure sèche, à la dose de 20 g/hl, réhydratées, acclimatées à l'alcool selon le protocole I.T.V. connu par l'homme de l'art (durée des phases de réhydratation et d'acclimatation : 6 jours),
- modalité 4. vinensemencé avec des levures L2226^(R) immobilisées, obtenues selon l'exemple 2, et préparées selon le protocole décrit ci-après :

Préparation des levures immobilisées (modalité 4):

- a) 1 kg de billes en sacs sont plongées, à la température de 37°C, à une solution de 2 l

d'eau contenant 20 g de glucose / fructose (50/50) et 16 g de NaCl.

b) Après 30 minutes, les sacs sont retirés et trempés, dans les mêmes conditions dans une nouvelle solution identique à la précédente.

c) Ensuite les sacs sont immergés dans la cuve contenant le vin dont la fermentation alcoolique doit être relancée.

Pour chaque modalité, on suit, l'évolution du taux de sucre en fonction du temps. Les résultats de ce suivi sont présentés dans le tableau 2 suivant :

TABLEAU 2

JOURS /	Modalité 1	Modalité 2	Modalité 3	Modalité 4
	sucres résiduels (g/l) / éthanol (g/l)	sucres résiduels (g/l) / éthanol (g/l)	sucres résiduels (g/l) / éthanol (g/l)	sucres résiduels (g/l) / éthanol (g/l)
0	19,3 / 99,9	19,3 / 99,9	19,30 / 99,90	19,30 / 99,90
2	Inchangés	Inchangés	Inchangés	18,87 / 101,48
4	Inchangés	Inchangés	Inchangés	16,90 / 101,93
5	Inchangés	Inchangés	Inchangés	14,38 / 102,36
6	Inchangés	Inchangés	Inchangés	13,73 / 102,37
7	Inchangés	Inchangés	19,29 / 100,66	—
11	Inchangés	Inchangés	16,93 / 101,35	4,20 / 104,86
12	Inchangés	Inchangés	11,63 / 102,41	2,76 / 105,29
13	Inchangés	Inchangés	7,46 / 103,53	2,21 / 105,31
14	Inchangés	Inchangés	3,81 / 104,91	—
15	Inchangés	Inchangés	1,83 / 105,39	—

On constate que le procédé selon la présente invention (modalité 4) permet d'obtenir un achèvement de la fermentation, au bout d'une durée inférieure à celle observée avec les mêmes levures acclimatées selon la méthode habituelle (modalité 3), toutes choses étant égales par ailleurs. On n'observe pas, dans l'un et l'autre cas, de montée de l'acidité volatile.

Le procédé d'application selon la présente invention présente ainsi deux avantages essentiels:

- il permet un gain de 2 jours pour la durée totale de l'opération de fermentation,
- il demande 1 heure au lieu de 6 jours de préparation et de suivi du pied de cuve.

Exemple 6 : Application à l'hydromel

L'hydromel utilisé dans cet exemple est issu d'un mélange 300 g de miel / 1 litre d'eau, le but étant de fabriquer de l'hydromel doux titrant 12,5 % d'alcool. Au moment de l'arrêt de fermentation, il possédait les caractéristiques suivantes :

- degré d'alcool acquis au moment de l'inoculation avec les billes : 10,5 % d'alcool
- sucres résiduels totaux : 87,5 g/l
- sucres résiduels à fermenter : 34 g/l

On procède à la reprise de fermentation en utilisant la levure EC1118(R) commercialisée par la société Lallemand (France), immobilisée dans des billes d'alginate de calcium, obtenues selon l'exemple 1, conditionnées en unités de 200 g. La dose d'utilisation est de 200 g de billes pour 100 l d'hydromel.

Pour les besoins de l'essai, l'hydromel en arrêt de fermentation est réparti en deux bonbonnes de 50 l (modalités 1 et 2). Ces modalités sont les suivantes (la température est régulée entre 20 et 25°C) :

- modalité 1. hydromelensemencé avec la levure EC1118(R) immobilisées et préparées selon le protocole décrit ci-après:

a) un sac de 200 g de billes est plongé, à la température de 37°C, dans une solution de 400 ml d'eau contenant 4 g de glucose / fructose (50/50) et 3,2 g de NaCl.

b) puis après 30 minutes, le sac est retiré et trempé, dans les mêmes conditions dans une nouvelle solution identique à la précédente.

c) ensuite le sac est immergé dans la cuve contenant l'hydromel dont la fermentation alcoolique doit être relancée.

- modalité 2. hydromelensemencé avec la levure EC1118(R), sous forme de levures sèches, à la dose de 20 g/hl, réhydratées, acclimatées à l'alcool selon le protocole I.T.V. adapté à l'hydromel (durée des phases de réhydratation et d'acclimatation : 4 jours).

On suit, pour chaque modalité, l'évolution du taux de sucre en fonction du temps. Les résultats de ce suivi sont présentés dans le tableau 3 suivant :

TABLEAU 3

JOURS	/	SUCRES RÉSIDUELS (g/l)	
		Modalité 1	Modalité 2
5	0	87,50	87,50
	1	86,00	85,00
	4	75,00	72,50
	5	71,50	68,50
	7	66,20	64,00
10	9	58,50	59,50
	11	50,00	54,70
	14	36,70	46,00
	20	36,50	36,20

15

On constate que le procédé selon la présente invention (modalité 1) permet d'obtenir un achèvement de la fermentation au bout d'une durée inférieure à celle observée avec les mêmes levures acclimatées selon la méthode habituelle (modalité 2), toutes choses étant égales par ailleurs.

20

Le procédé d'application de la présente invention présente ainsi deux avantages essentiels:

1. il permet un gain de presque 6 jours pour la durée totale de l'opération de fermentation;
2. il demande 1 heure au lieu de 4 jours de préparation et de suivi du pied de cuve.

25

30

35

REVENDEICATIONS

- 5 1. Préparation de microorganismes vivants, acclimatés à l'alcool et/ou à l'acidité, immobilisés dans des billes de polymère partiellement déshydratées.
2. Préparation selon la revendication 1, *caractérisée en ce que* lesdits microorganismes vivants, acclimatés et immobilisés, présentent la capacité de démarrer directement après une étape de réhydratation, une fermentation dans un moût présentant un degré alcoolique compris entre 5 et 15° et un pH compris entre 2,8 et 4,0.
- 10 3. Préparation selon la revendication 2, *caractérisée en ce que* lesdits microorganismes vivants, acclimatés et immobilisés, présentent après une période de conservation d'une durée de 1 jour à au moins six mois, la capacité de démarrer directement après une étape de réhydratation, une fermentation dans un moût présentant un degré alcoolique compris entre 5 et 15° et un pH compris entre 2,8 et 4,0, .
- 15 4. Préparation selon la revendication 1, *caractérisée en ce que* lesdits microorganismes sont des levures, de préférence du genre Saccharomyces.
- 20 5. Préparation selon la revendication 1, *caractérisée en ce que* lesdites billes de polymère sont composées de polysaccharides réticulés, de préférence d'un gel d'alginate.
- 25 6. Préparation selon la revendication 1, *caractérisée en ce que* dans lesdites billes de polymère, l'activité de l'eau est comprise entre 0,1 et 0,5, de préférence entre 0,3 et 0,4.
7. Préparation selon la revendication 1, *caractérisée en ce que* lesdites billes ont une taille comprise entre 0,1 et 5 mm, de préférence entre 1 et 3 mm.
- 30 8. Préparation selon la revendication 1, *caractérisée en ce que* lesdites billes contiennent lesdits microorganismes dans une proportion de 1 à 50%, de préférence de 5 à 20% en poids sec, par rapport audit polymère.
- 35 9. Procédé d'obtention d'une préparation de microorganismes selon la revendication 1, comprenant les opérations suivantes
- a)- acclimater lesdits microorganismes à l'alcool et / ou à l'acide,

b)- immobiliser lesdits microorganismes dans des billes de polymère,
c)- déshydrater partiellement lesdites billes,
réalisées dans l'ordre chronologique [a) puis b) puis c)], ou bien [b) puis a) puis c)].

5 10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel lesdits microorganismes sont des levures, de préférence du genre *Saccharomyces*.

10 11. Procédé selon la revendication 9, dans lequel lesdites billes de polymère sont composées de polysaccharides réticulés, de préférence d'un gel d'alginate.

10 12. Procédé selon la revendication 9, dans lequel lesdits microorganismes immobilisés dans lesdites billes de polymère sont dans une proportion de 1 à 50 %, de préférence de 5 à 20 % en poids sec, par rapport audit polymère.

15 13. Procédé selon la revendication 9, dans lequel ladite déshydratation partielle est effectuée par une des techniques suivantes: lyophilisation, séchage sur lit fluidisé, étuvage, jusqu'à obtention d'une activité de l'eau dans lesdites billes de polymère, comprise entre 0,1 et 0,5, de préférence entre 0,3 et 0,4.

20 14. Préparation de microorganismes susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 9 à 13.

25 15. Application d'une préparation de microorganismes selon l'une des revendications 1 à 8, à la reprise de fermentations arrêtées.

25 16. Application d'une préparation de microorganismes selon l'une des revendications 1 à 8, à la reprise d'une fermentation alcoolique arrêtée.

30

35