



CONFÉDÉRATION SUISSE

OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 662 819 A5

⑤① Int. Cl.<sup>4</sup>: C 12 N 1/20  
C 12 G 1/00

**Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein**  
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

// (C 12 N 1/20, C 12 R 1:01)

## ⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑳ Numéro de la demande: 4123/81

㉔ Date de dépôt: 23.06.1981

㉔ Priorité(s): 23.06.1980 US 161688

㉔ Brevet délivré le: 30.10.1987

㉔ Fascicule du brevet  
publié le: 30.10.1987㉔ Titulaire(s):  
Jack Silver, Santa Rosa/CA (US)  
Frances McNicholl, La Fayette/CA (US)㉔ Inventeur(s):  
Silver, Jack, Santa Rosa/CA (US)  
McNicholl, Frances, La Fayette/CA (US)㉔ Mandataire:  
Patentanwälte Racheli & Fiammenghi, Lugano

㉔ **Composition bactérienne pour induire la fermentation malolactique par une souche de micro-organismes ou ses mutants, procédé pour traiter du vin utilisant cette composition et vin ainsi traité.**

㉔ La composition bactérienne pour induire la fermentation malolactique, consiste en la souche de microorganismes *Leuconostoc oenos* B-44-40 ATCC 31688 ou ses mutants antibio-résistants Bio Logicals 44-40 ATCC 31689, 31690, 31691, 31692, 31693, viables en association avec un support biologiquement acceptable. Pour induire une fermentation malolactique énergique dans le vin, on ajoute pendant ou après la fermentation primaire les nouvelles bactéries productrices d'aide lactique susdites. Selon un mode de réalisation préféré, on prépare des cultures dans un milieu contenant de l'acide glutamique ou un acide semblable comme cryoprotecteur et on les ajoute au vin sous une forme lyophilisée; les cultures induisent une fermentation malolactique à des températures et des pH plus bas que les cultures précédemment connues.

## REVENDECATIONS

1. Composition bactérienne pour induire la fermentation malolactique, caractérisée en ce qu'elle consiste en la souche de micro-organismes *Leuconostoc oenos* B-44-40, ATCC 31668, ou ses mutants antibiorésistants Bio Logicals 44-40, ATCC 31689, 31690, 31691, 31692, 31693 sous une forme biologiquement viable, en association avec un support biologiquement acceptable.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le support est constitué par des restes des milieux utilisés pour le développement biologique du micro-organisme.

3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que les restes de milieux comprennent de l'acide glutamique et/ou ses sels biologiquement acceptables.

4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que le micro-organisme et l'acide glutamique et/ou ses sels sont sous une forme lyophilisée, l'acide glutamique et/ou ses sels agissant comme des cryoprotecteurs du micro-organisme lyophilisé pour le maintenir sous une forme biologiquement active.

5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que le micro-organisme est une souche de *Leuconostoc oenos* antibiorésistante Bio Logicals 44-40, ATCC 31688.

6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle est un mélange avec un poids au moins égal d'une matière fluide en particules convenant en biologie pour accroître le volume et favoriser la dispersion de la composition dans un milieu aqueux.

7. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que les restes de milieux contiennent un acide qui se comporte comme un cryoprotecteur dans la lyophilisation ultérieure des cellules, cet acide étant choisi parmi l'acide  $\alpha$ -cétoglutamique, l'acide L-malique, l'acide DL-malique, l'acide L-aspartique, l'acide DL- $\alpha$ -aminopimélique, l'acide  $\alpha$ -méthyl L-glutamique, l'acide malonique, l'acide N-acétyl L-glutamique, l'acide N-diméthyl L-glutamique, l'acide N-diméthyl L-aspartique, l'acide L-cystéique, la cystéine, la DL-thréonine, l'acétylglycine, l'acide DL-pyrrolidone-5 carboxylique-2, l'acide D-glutamique, l'acide DL-glutamique, l'acide L-glutamique, l'acide aminomalonique, l'acide tartronique et la lysine.

8. Procédé pour traiter du vin pour y induire une fermentation malolactique rapide contrôlée, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter au vin une composition selon la revendication 1.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend l'addition de  $10^5$  à  $10^7$  micro-organismes viables de la composition par millilitre de vin.

10. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on effectue l'addition au vin à une température comprise entre 8°C et 18°C et à un pH inférieur à 3,3.

11. Vin stabilisé contre la fermentation malolactique, préparé selon le procédé de la revendication 8.

La présente invention concerne une composition bactérienne pour induire la fermentation malolactique par une souche de micro-organismes, ou ses mutants, un procédé pour traiter du vin utilisant cette composition et le vin ainsi traité.

La composition est caractérisée par la partie caractérisante de la revendication 1, le procédé par la partie caractérisante de la revendication 8 et le vin par la revendication 11.

De façon générale l'invention concerne les processus de fermentation ainsi que les ingrédients et composés qui y sont utilisés. L'invention concerne une nouvelle composition d'origine microbiologique utile dans les processus de fermentation, en particulier dans la production du vin et des procédés pour sa préparation et son emploi en fermentation.

On prépare les vins non mousseux par fermentation des sucres de jus de fruits. Après achèvement de la fermentation primaire, de

nombreuses fermentations secondaires peuvent se produire. La plupart de ces fermentations secondaires sont indésirables et altèrent le vin. Toutes sont indésirables lorsqu'elles se produisent après la mise en bouteilles.

La fermentation secondaire la plus courante est la fermentation malolactique dans laquelle des micro-organismes provoquent une conversion de l'acide malique en acide lactique, les sucres étant transformés en acides et autres composés organiques ou minéraux. Il faut que la fermentation malolactique soit achevée avant la mise en bouteilles du vin ou empêchée avec un degré de sécurité très élevé. Si elle se produit après la mise en bouteilles, le dégagement de gaz et le développement des bactéries altèrent le produit.

On peut, pour éviter la fermentation malolactique, par exemple, filtrer pour éliminer les organismes qui la provoquent et la favoriser ou pasteuriser le vin pour désactiver les micro-organismes. Ces deux façons de procéder sont coûteuses, réduisent la qualité du vin, par exemple en lui conférant des saveurs indésirables, et dans certains cas elles échouent. On considère que la fermentation malolactique est très souhaitable dans les vins rouges et dans certains vins blancs. Elle provoque une diminution naturelle de l'acidité et améliore les qualités organoleptiques.

On préfère donc favoriser et assurer l'achèvement de la fermentation malolactique avant la mise en bouteilles par addition au vin de micro-organismes produisant la fermentation malolactique. On obtient ainsi un produit supérieur et stable.

Les phénomènes de la fermentation malolactique et l'importance de cette fermentation dans la vinification sont bien connus. Dans de nombreuses régions viticoles, la microflore indigène peut provoquer une fermentation malolactique naturelle. Cependant, il est fréquent que les organismes fermentaires ne démarrent pas rapidement et on risque toujours que des organismes indésirables s'établissent et provoquent des effets secondaires fâcheux.

On a dans une certaine mesure effectué une fermentation malolactique contrôlée avant la mise en bouteilles par emploi de cultures ajoutées. Cependant, les cultures de micro-organismes que l'on a utilisées à cet effet manquent de certaines caractéristiques, notamment la facilité d'emploi et la vigueur de culture. Les cultures précédemment utilisées doivent être ajoutées au vin à un pH de plus de 3,3 et, pendant et après l'addition, le vin doit être maintenu à une température de 18 à 22°C. Ces deux compositions peuvent ne pas toujours être possibles à obtenir ou souhaitables pour l'obtention de vins de qualité supérieure.

Dans de nombreux cas, le pH du vin, au moment où on désire induire la fermentation malolactique, est inférieur à 3,3 et il est particulièrement indésirable d'ajuster le pH à ce stade. La température de stockage du vin dans les cuves avant la mise en bouteilles est de préférence bien inférieure à 18°C, par exemple voisine de 10°C. De plus, il est évidemment souhaitable en pratique industrielle d'effectuer la fermentation malolactique aussi rapidement que possible pour accroître le débit de production et réduire la durée de stockage.

La titulaire a isolé une nouvelle souche de micro-organismes appelée ici *Leuconostoc oenos* B-44-40 qui, de façon étonnante, induit de façon efficace la fermentation malolactique lorsqu'on l'ajoute au vin. La nouvelle souche est plus vigoureuse que les souches bactériennes de *Leuconostoc* précédemment connues et utilisées à cet effet. De plus, elle provoque énergiquement la fermentation malolactique à des températures inférieures à 18°C et au moins aussi basses que 10°C et à des pH bas inférieurs à 3,3, par exemple s'abaissant jusqu'à environ 3,0.

De plus, on a préparé des mutants antibiorésistants de *Leuconostoc oenos* B-44-40, ATCC 31668, que l'on appelle ci-après *Leuconostoc* Bio Logicals 44-40 ATCC 31689, 31690, 31691, 31692, 31693, sous une forme biologiquement viable, en association avec un support biologiquement acceptable, qui sont également efficaces pour induire la fermentation malolactique, dans les mêmes conditions et qui, de plus, permettent la surveillance et le contrôle de la qualité du processus fermentaire.

Le support est préférablement constitué par des restes des milieux utilisés pour le développement biologique du micro-organisme.

Les restes de milieux comprennent préférablement de l'acide glutamique et/ou ses sels biologiquement acceptables.

Le micro-organisme et l'acide glutamique et/ou ses sels sont préférablement sous une forme lyophilisée, l'acide glutamique et/ou ses sels agissant comme des cryoprotecteurs du micro-organisme lyophilisé pour le maintenir sous une forme biologiquement active.

La composition est préférablement en mélange avec un poids au moins égal d'une matière fluide en particules convenant en biologie pour accroître le volume et favoriser la dispersion de la composition dans un milieu aqueux.

Les restes de milieux contiennent préférablement un acide qui se comporte comme un cryoprotecteur dans la lyophilisation ultérieure des cellules, cet acide étant choisi parmi l'acide  $\alpha$ -cétoglutamique, l'acide L-malique, l'acide DL-malique, l'acide L-aspartique, l'acide DL- $\alpha$ -aminopimélique, l'acide  $\alpha$ -méthyl L-glutamique, l'acide malonique, l'acide N-acétyl L-glutamique, l'acide N-diméthyl L-glutamique, l'acide N-diméthyl L-aspartique, l'acide L-cystéique, la cystéine, la DL-thréonine, l'acétylglycine, l'acide DL-pyrrolidone-5 carboxylique-2, l'acide D-glutamique, l'acide DL-glutamique, l'acide L-glutamique, l'acide aminomalonique, l'acide tartronique et la lysine.

De façon inattendue, ces cryoprotecteurs se sont révélés assurer la viabilité des cultures après lyophilisation, si bien que l'on peut utiliser de façon fiable la composition pour induire la fermentation malolactique par addition au vin, au stade approprié de la vinification. On peut ajouter l'acide glutamique ou un de ses sels tel quel ou le former in situ avant ou pendant la culture du micro-organisme, par exemple par hydrolyse ou réaction chimique d'une matière protéique ou similaires ou par hydrolyse de protéines ou peptides contenant de l'acide glutamique dans le milieu de culture.

La nouvelle souche bactérienne appelée ici *Leuconostoc oenos* B-44-40 ATCC 31668 a été isolée d'échantillons de vin ayant subi ou subissant une fermentation malolactique poussée produisant un vin de bonne qualité sans arrière-goût ni autre signe d'altération. On la cultive et l'isole selon les techniques microbiologiques de culture généralement admises. On fait pousser les cultures mixtes provenant d'un échantillon de vin sur un substrat contenant de l'acide lactique, du glucose ou similaires pour sélectionner et isoler les cultures ayant une croissance rapide. L'identité taxonomique exacte de la culture n'est pas actuellement certaine, par suite des difficultés bien connues de classification et de définitions qui existent dans ce domaine. La souche bactérienne B-44-40 appartient de façon certaine à la famille des bactéries productrices d'acide lactique. Il subsiste une certaine incertitude pour savoir si on doit considérer qu'elle appartient au genre *Leuconostoc* species *oenos* ou au genre *Pediococcus*. Dans tous les cas, les réserves concernant la taxonomie des souches bactériennes B-44-40 et Bio Logicals 44-40 s'appliquent au reste de la présente description.

La description taxonomique de la bactérie B-44-40 va maintenant être effectuée.

#### Taxonomie

La bactérie B-44-40 a été classée comme un *Leuconostoc oenos* à partir des caractéristiques suivantes et de leur similitude avec les caractéristiques de cette souche décrite par Garvie (Garvie, E. I. *Leuconostoc Oenos* SP. Nov. J. Gen Microbiol, 48, 431-438, 1967).

Coloration de gram: positive

Présence de catalase: négative

Production de gaz à partir du glucose

Production d'acide D-lactique à partir du glucose

Production d'acide L-lactique à partir de L-malate

Catabolisme de l'acide citrique en présence de glucose

Catabolisme du L-malate en présence de glucose

Pas de production de dextrane à partir du saccharose

Production d'ammoniac et d'intermédiaires du cycle de l'urée à partir de l'arginine lors de la fermentation malolactique dans le vin

Production de mannitol à partir du fructose

Croissance sur les composés suivants comme sources uniques de carbone: D-glucose, D-fructose, D-ribose, tréhalose, cellobiose, esculine, salicine, maltose, D-mannose

Pas de culture sur les composés suivants comme sources uniques de carbone: D-désoxyribose, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose, saccharose, lactose, raffinose, glycérol, D-mannitol, acide L-malique, acide citrique, acide fumarique

Morphologie cellulaire: diplocoques (cocci par paires) avec une tétrade unique en deux plans, formation de chaînes courtes et agrégats, taille 0,5-0,7  $\mu$ m, culture et conversion du malate en lactate jusqu'à pH 3; pas de culture ou très faible culture à pH 2,9; culture et conversion du malate en lactate en présence de SO<sub>2</sub> libre jusqu'à 25 ppm, SO<sub>2</sub> total jusqu'à 100 ppm; pas de culture pour une teneur en SO<sub>2</sub> libre supérieure à 50 ppm et une teneur en SO<sub>2</sub> total supérieure à 200 ppm; culture et conversion du malate en lactate pour une concentration en alcool de 16% en volume

Nécessite absolument des acides gras de type oléique

Un échantillon viable de la souche B-44-40 a été déposé à la souchothèque du National Research Council, Ottawa, Canada, où elle a reçu le numéro de référence 2477. Il y est maintenu sous une forme viable. Un autre dépôt a été effectué le 15 juillet 1980 à l'American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive, ROCKVILLE, Maryland 20852) où il a reçu le numéro de référence ATCC 31688.

Comme décrit plus en détail ci-après, selon un mode préféré de réalisation de l'invention, on utilise des mutants antibiorésistants de B-44-40. Ces souches ont été appelées Bio Logicals 44-40 et des remarques semblables à celles concernant la souche B-44-40 s'appliquent à la classification et à la nomenclature de ces mutants. La taxonomie des mutants utiles était essentiellement la même que celle de B-44-40 si ce n'est bien entendu la caractéristique additionnelle de résistance à au moins un antibiotique choisi.

Des échantillons viables de souches antibiorésistantes B-44-40 ont été déposés le 15 juillet 1980 à l'American Type Culture Collection, où ils sont maintenus sous une forme viable, sous les numéros de référence suivants:

résistant à la rifamycine B-44-40, R1-50 - ATCC 31689

résistant à la rifamycine B-44-40, R1-100 - ATCC 31690

résistant à l'érythromycine B-44-40, R1-25 - ATCC 31691

résistant à l'érythromycine B-44-40, R2-25 - ATCC 31692

résistant à l'érythromycine B-44-40, R1-40 - ATCC 31693

Les mutants antibiorésistants de B-44-40 appelés Bio Logicals 44-40 sont préparés à partir de la souche parente B-44-40 par mutation, puis culture des mutants obtenus dans un milieu de culture favorisant la croissance contenant un antibiotique choisi. Par sélections et passages ou dilutions et cultures répétés, on isole et cultive une souche mutante dont la caractéristique d'identification est la viabilité en présence de l'antibiotique choisi.

Les procédés utilisés pour provoquer la mutation de la souche parente sont généralement les procédés classiques connus pour produire cet effet dans les techniques de culture microbiologique. On peut adopter tout procédé provoquant chez la souche parente une modification chimique ou un clivage et une recombinaison des chaînes d'ADN des chromosomes cellulaires, de façon aléatoire ou dirigée. Par exemple, on peut soumettre l'échantillon à l'action de la lumière ultraviolette ou de rayons X ou d'autres formes de rayonnements, ou de mutagènes chimiques ou cultiver sélectivement des mutants spontanés.

On peut utiliser, pour cultiver et isoler les mutants antibiorésistants, pratiquement tout antibiotique connu ou toute combinaison d'antibiotiques. On peut citer comme antibiotiques appropriés utiles dans un tel procédé les antibiotiques couramment connus et qu'il est facile de se procurer consistant en la rifamycine, la streptovaricine, la streptolydigin, la tétracycline, la chlortétracycline, la gentamycine, l'ampicilline et les antibiotiques aminoglycosidiques tels que la streptomycine, la spectinomycine et d'autres antibiotiques macrolides tels que l'érythromycine et similaires, et on préfère particulièrement la rifamycine et l'érythromycine. L'emploi de ces antibiotiques

ou d'une de leurs combinaisons permet de produire et d'isoler des mutants différents appelés Bio Logicals 44-40 qui répondent tous à la taxonomie précédemment décrite et qui possèdent de plus la caractéristique d'être viables en présence de l'antibiotique choisi ou de la combinaison d'antibiotiques.

La résistance à un antibiotique spécifique ou à une combinaison d'antibiotiques constitue une caractéristique distinctive des souches Bio Logicals 44-40 ATCC 31688 qui permet de détecter facilement leur présence dans les liquides fermentés et qui constitue donc un moyen pratique pour le contrôle de la qualité et la surveillance du procédé. Les risques pour qu'un échantillon de vin choisi au hasard contienne une souche de micro-organismes résistant à un antibiotique spécifique par suite de processus naturels sont si faibles (environ  $1/10^7$ ) qu'ils sont en pratique négligeables. Dans le cas d'une souche de micro-organismes résistant à deux antibiotiques spécifiques, les risques sont de façon correspondante plus faibles ( $1/10^{14}$ ). Donc, si la culture d'un échantillon de vin dans un milieu contenant un antibiotique choisi conduit au développement d'un micro-organisme résistant aux antibiotiques, ce développement constitue une preuve de l'addition de ce micro-organisme résistant aux antibiotiques lors de la vinification. Des essais complémentaires pour caractériser la culture sont inutiles. Cela permet d'effectuer des essais de contrôle de la qualité et des enquêtes concernant ce micro-organisme avec un degré de précision et de certitude rarement observé dans la fermentation des produits naturels. On peut détecter de façon certaine l'emploi du micro-organisme si bien que l'on peut établir qu'il est la cause d'effets spécifiques dans le vin. Les produits naturels fermentés résultent normalement d'une série complexe de processus microbiologiques qui utilisent un grand nombre de micro-organismes différents dont certains sont inconnus et non identifiés, si bien qu'il est normalement difficile d'attribuer un effet ou une caractéristique spécifique quelconque du produit à un processus ou à un organisme spécifique quelconque. L'emploi des bactéries résistantes aux antibiotiques permet également le marquage des vins, pour assurer des normes de production et l'authenticité.

Les compositions lyophilisées de micro-organismes que l'on a préalablement suggérées ou dont on a proposé l'emploi pour induire la fermentation malolactique avaient une efficacité imprévisible. Bien que certains échantillons de compositions aient donné des résultats satisfaisants (avec moins de vigueur qu'on le souhaiterait et avec les conditions d'emploi malaisées précédemment exposées), d'autres échantillons ayant apparemment la même composition se sont révélés totalement incapables d'amorcer la fermentation malolactique désirée. Cela semble dû à une destruction accidentelle des micro-organismes viables lors de la lyophilisation. Selon une autre caractéristique, on cultive le micro-organisme utilisé pour amorcer la fermentation malolactique, pendant au moins une partie de son cycle de culture, dans un milieu contenant de l'acide glutamique ou d'autres molécules apparentées précitées. De façon inattendue, les résidus d'acide glutamique/glutamate provenant du milieu de culture se comportent comme des cryoprotecteurs si bien que les cultures demeurent sous une forme biologiquement viable prête à l'emploi. Cela s'applique aux souches B-44-40 et Bio Logicals 44-40. Par conséquent, les compositions lyophilisées selon l'invention sont fiables et de façon régulière amorcent et provoquent une fermentation malolactique énergique dans une gamme étendue des conditions, contrairement aux compositions lyophilisées précédemment connues.

Comme indiqué, le cryoprotecteur constitué d'acide glutamique/glutamate peut être formé, au moins partiellement, in situ dans le bouillon de fermentation où l'on cultive B-44-40 ou Bio Logicals 44-40 ou par l'hydrolyse de matières protéinées avant leur addition au milieu de culture. Cela se produit lorsqu'on utilise, comme substrat de culture des micro-organismes, des protéines, peptides ou hydrolysats protéiques contenant des quantités d'importance raisonnable de précurseurs formant de l'acide glutamique.

Il convient de noter à cet égard qu'il n'est pas satisfaisant d'effectuer les cultures en l'absence d'acide glutamique/glutamate puis d'ajouter de l'acide glutamique ou des glutamates au produit obtenu

avant la lyophilisation. Cette façon de procéder n'assure pas l'obtention régulière d'une composition lyophilisée viable et efficace. Une molécule semblable à l'acide glutamique ou aux glutamates doit être présente comme résidu d'un milieu de culture pour qu'on obtienne un effet cryoprotecteur efficace régulier. On ne sait pas de façon certaine pourquoi il en est ainsi. Cependant il semble que la raison de ce phénomène soit liée à la présence dans le cryoprotecteur d'un groupe produisant une liaison hydrogène pour former une relation mutuelle intracellulaire entre les molécules présentes dans le cytoplasme du micro-organisme et les molécules d'acide glutamique ou de glutamate transportées à partir du milieu de culture.

Lorsqu'on utilise la souche parente B-44-40 pour amorcer la fermentation malolactique, l'acide glutamique/glutamate doit bien sûr être présent lors de la culture. Lorsqu'on utilise un mutant Bio Logicals 44-40, l'acide glutamique/glutamate doit être présent lors de la culture du mutant.

On ajoute de préférence le cryoprotecteur au milieu de culture au début du processus de croissance du micro-organisme et sous forme d'acide glutamique. Comme généralement le milieu contient divers sels minéraux pour favoriser la croissance, une quantité importante, sinon la totalité, de l'acide glutamique est transformée en glutamates dans le milieu. Les quantités appropriées d'acide glutamique que l'on ajoute au milieu de culture pour obtenir une cryoprotection suffisante du produit final sont comprises entre environ 0,1 et environ 5% (en poids par volume), de préférence entre environ 0,5 et environ 2%.

Avec la condition ci-dessus concernant la présence de glutamate ou d'un autre cryoprotecteur précité, le milieu de culture de B-44-40 et de Bio Logicals 44-40 est généralement classique et peut être facilement conçu, ajusté et optimisé par l'homme de l'art. De façon fondamentale, le milieu est un liquide aqueux contenant des sels minéraux tels que le phosphate de potassium et de magnésium et le sulfate de manganèse, le sulfate ferreux, etc., un substrat pour le micro-organisme tel que l'acide malique, le glucose, les aminoacides, les vitamines, les acides gras et les substances tampons convenant en biologie pour permettre l'ajustement du pH à une valeur conduisant à la croissance optimale comprise normalement entre 3,0 et 7,0. La substance tampon doit permettre de maintenir un pH constant dans le milieu. On effectue les cultures pratiquement en anaérobiose ou microaérophilie.

Après la culture, on recueille les micro-organismes dans le milieu selon des techniques classiques, par exemple par centrifugation et/ou filtration, puis on lyophilise la masse. On effectue également cette lyophilisation selon des techniques classiques qui consistent à soumettre la masse à des températures basses dans un environnement à faible pression. Le produit obtenu est une substance fluide en poudre ou en particules que l'on peut conserver à sec, de préférence dans des récipients bouchés, pendant des durées prolongées, avant de l'ajouter à du vin lors de la vinification.

Les quantités de composition lyophilisée que l'on ajoute au vin pour provoquer la fermentation malolactique n'ont pas de limitation particulière, mais les quantités efficaces sont très faibles. Lorsqu'on les exprime par le nombre des micro-organismes viables, les quantités appropriées peuvent être aussi faibles que 100 organismes viables par ml de vin. Les quantités pratiques sont comprises entre environ  $10^2$  et  $10^8$  et, de préférence, entre  $10^6$  et  $10^7$  micro-organismes viables par ml. En d'autres termes, 1 g de composition suffit pour provoquer la fermentation malolactique de 2500 à 25000 litres de vin. En pratique, on préfère donc mélanger la composition lyophilisée avec un support solide inerte convenant en biologie de façon à la diluer et à obtenir des quantités de matière faciles à mesurer pour effectuer l'addition. Des supports appropriés sont la terre de diatomées et d'autres formes d'argiles sans danger, la poudre de cellulose, les silicates, et des matières semblables. Un mélange contenant 1 à 5% en poids de composition lyophilisée convient et est pratique.

Comme précédemment indiqué, les cultures de l'invention sont plus vigoureuses et agissent dans une gamme de conditions plus étendue pour induire la fermentation malolactique que les micro-

organismes précédemment indiqués. En ce qui concerne la vigueur, B-44-40 provoque des conversions du malate nettement plus rapides dans des conditions semblables que l'un quelconque des micro-organismes connus que sont Lact. Delbruchii, Ped. Cerevisiae, Lact. Buchneri, Leu. Oenos ML-34, Leu. Oenos P-6, Lact. Hildigardii et Lact. Prevo; par exemple, dans des essais comparatifs directs avec Leuconostoc Oenos ML-34 avec un milieu de Rogosa à pH 5,5 à la température ordinaire, B-44-40 produit un nombre maximal de bactéries en quatre jours, tandis que ML-34 produit son nombre maximal de bactéries (nettement moindre) après 13 jours.

L'extension de la gamme des pH dans laquelle on peut effectuer la fermentation malolactique jusqu'à un pH de 3,0 est un avantage pratique très important. On ne connaît pas d'autres cultures permettant d'effectuer la fermentation malolactique à un pH inférieur à 3,2. Au moment de la mise en bouteilles, lorsqu'il est souhaitable d'effectuer la fermentation malolactique, beaucoup de vins ont un pH inférieur à 3,2. Ces vins peuvent augmenter le pH à mesure qu'ils vieillissent dans la cave, mais il est indésirable d'attendre jusqu'à ce que ce processus ait commencé pour démarrer la fermentation malolactique, en raison du risque d'effets secondaires indésirables résultant d'organismes naturels qui peuvent contaminer le vin. La possibilité de débiter la fermentation malolactique à un pH de 3,0 avec les micro-organismes est un avantage important qui réduit encore les risques d'altération du vin.

De même, la possibilité d'opérer à des températures plus basses jusqu'à environ 10°C avec les micro-organismes est un avantage important. C'est une température souhaitable pour les celliers de vinification à laquelle on peut effectuer autant d'opérations de vinification, après la fermentation primaire, qu'on le désire. Les autres micro-organismes connus utilisés pour la fermentation malolactique n'agissent de façon efficace qu'à une température d'au moins 18°C, ce qui est indésirable.

On constate parfois que la composition lyophilisée de micro-organismes a des difficultés pour amorcer spontanément la fermentation malolactique dans certains types de vins. La raison de cette difficulté peut être que le vin présente à cet effet un mauvais équilibre des substances nutritives et de l'acidité. Dans ce cas, on peut, pour assurer encore la fermentation malolactique avec la composition, ajouter au départ l'organisme lyophilisé à un bouillon d'ensemencement contenant du milieu GMT ajusté à pH 4-7. Cela facilite au micro-organisme le retour de son état lyophilisé à un état métabolique d'activité maximale pour l'introduction dans les milieux analogiques sous-optionnels. Après avoir ainsi incubé pendant une période de 8 à 72 h, par exemple, une quantité initiale comprise entre environ  $1 \times 10^8$  et environ  $1 \times 10^9$  cellules bactériennes par millilitre de milieu, on peut ajouter la totalité du bouillon au vin et la fermentation malolactique commence ensuite sans difficulté.

L'invention est illustrée par les exemples non limitatifs suivants.

#### Exemple 1:

##### Sélection des souches

On prépare des souches isolées de façon aléatoire à partir de diverses sources naturelles. On fait tout d'abord passer des échantillons de vin à travers un filtre stérile ayant des pores de 0,65 µm pour éliminer les levures puis à travers un filtre stérile ayant des pores de 0,45 µm que l'on place sur une boîte de milieu de Rogosa (Difco) et qu'on incube à 30°C jusqu'à ce qu'apparaissent des colonies distinctes. Généralement, on n'obtient qu'une souche isolée à partir d'un échantillon, cette souche étant toujours constituée par l'organisme prédominant. Si possible, on isole les souches alors que les vins subissent une fermentation malolactique. On opère ainsi pour être sûr que les organismes isolés sont les organismes prédominants responsables de la fermentation malolactique.

La bactérie appelée B-44-40 a été ainsi isolée d'un vin California Chardonnay.

#### Exemple 2:

##### Enrichissement et sélection des souches

On mesure la masse cellulaire avec un colorimètre Klett Summerson. On utilise un filtre rouge N° 66 avec le vin et un filtre vert N° 54 avec les milieux synthétiques. On agite énergiquement les tubes à essai à bouchon vissé mesurant 10 × 100 mm en Kimex ou en Pyrex contenant 5 ml de vin pour la détermination optique de la masse cellulaire. On cultive les cellules à 22°C sauf indication contraire. On introduit toutes les souches sélectionnées comme précédemment décrit dans des tubes à essai dans des conditions variables de concentration en alcool, de pH et de température.

#### Exemple 3:

##### Enrichissement en fonction de l'alcool

On remplit des groupes de six tubes (à bouchon vissé mesurant 10 × 100 mm) avec 5 ml d'un échantillon de vin. On ajoute de l'éthanol pur à 95% dans les tubes pour obtenir des concentrations finales en alcool de 13,0%, 14,0%, 14,5%, 15,0%, 15,5% et 16,0% (en volume). On place chaque micro-organisme dans un ensemble de tubes à essai à une concentration cellulaire initiale comprise entre  $5 \times 10^4$  et  $5 \times 10^5$  cellules/millilitre et on mesure la croissance comme précédemment décrit. On choisit les organismes ayant une tolérance élevée vis-à-vis de l'alcool.

Les bactéries B-44-40 se développent bien à des concentrations en alcool de 16% en volume et sont capables d'effectuer une fermentation malolactique dans tous les vins étudiés à cette concentration en alcool.

#### Exemple 4:

##### Enrichissement en fonction du pH

Les conditions pour l'enrichissement en fonction du pH sont les mêmes que pour l'enrichissement en fonction de la concentration en alcool si ce n'est que, dans les divers tubes, le pH et non la teneur en alcool varie. On utilise des pH de 3,0, 3,3 et 3,7. On sélectionne les souches en fonction du développement à un pH bas.

Les bactéries B-44-40 se développent à pH 3,0 et permettent d'effectuer une fermentation malolactique à ce pH. Les bactéries B-44-40 se développent mieux à un bas pH que les autres souches étudiées.

#### Exemple 5:

##### Tolérance vis-à-vis de la température

Les conditions d'enrichissement en fonction de la température sont les mêmes que les conditions d'enrichissement en fonction de la concentration en alcool, si ce n'est que la température et non la concentration en alcool varie. Les températures étudiées sont 10°C, 20°C et 30°C. On sélectionne les souches qui se développent à basse température.

Les bactéries B-44-40 se développent mieux à basse température (10°C) que toutes les autres souches étudiées et elles permettent d'effectuer une fermentation malolactique à cette température.

#### Exemple 6:

##### Sélection en fonction du métabolisme du malate

Les conditions pour la sélection en fonction de la conversion du malate sont celles décrites pour les conditions de croissance normale dans le vin. Après inoculation, on mesure chaque jour la teneur en malate des échantillons. On détermine la teneur en malate par spectrométrie avec les réactifs et les modes opératoires de Boehringer Mannheim. Parmi toutes les souches étudiées, la souche B-44-40 permet l'achèvement d'une fermentation malolactique avant toutes les autres souches.

*Exemple 7:**Souches résistant aux antibiotiques*

A des boîtes de milieu nutritif tel que le milieu de Rogosa, on ajoute des quantités variables de l'antibiotique Rifampin (rifamycine) ou de l'antibiotique érythromycine. La teneur en antibiotique des boîtes varie de 10 µg/ml à 100 µg/ml. Le Rifampin et l'érythromycine sont sous la forme la plus pure dont on dispose. On cultive les bactéries B-44-40 dans des milieux GMT (décrits ci-après) jusqu'à la densité maximale. On étale sur chaque boîte 0,2 ml de liquide de culture (environ  $2 \times 10^8$  cellules) puis on incube les boîtes à 30°C jusqu'à ce qu'on puisse observer des colonies séparées. On considère que les colonies qui se développent normalement (par rapport aux bactéries B-44-40 non traitées) sur les boîtes contenant les antibiotiques résistent à la concentration correspondante en antibiotique. On place les colonies résistantes sur des boîtes séparées pour effectuer l'isolement. On soumet ces colonies à de nouveaux essais comparatifs avec des bactéries B-44-40 normales ne résistant pas aux antibiotiques, c'est-à-dire la souche parente, pour s'assurer qu'elles résistent bien aux concentrations en antibiotique indiquées. On obtient les souches suivantes:

1. Rif-R1-50 présente une résistance au Rifampin à 50 µg/ml; premier isolement;
2. Rif-R1-100 présente une résistance au Rifampin à 100 µg/ml; premier isolement;
3. Ery-R1-25 présente une résistance à l'érythromycine à 25 µg/ml; premier isolement;
4. Ery-R2-25 présente une résistance à l'érythromycine à 25 µg/ml; second isolement;
5. Ery-R1-40 présente une résistance à l'érythromycine à 40 µg/ml; premier isolement.

*Exemple 8:**Protection cryogénique*

La survie élevée des bactéries lors de la lyophilisation repose sur l'emploi d'acide glutamique et d'autres composés contenant un groupe formant une liaison hydrogène et deux groupes acides. Plusieurs caractéristiques des processus de culture et de lyophilisation sont essentielles à l'obtention d'une survie élevée des bactéries, à savoir des milieux de culture appropriés, le pH des milieux de culture contenant le mélange cryogénique, le pourcentage de mélange cryogénique utilisé et la phase de croissance lorsque les cellules sont recueillies et lyophilisées.

On cultive les bactéries B-44-40 dans du milieu GMT préparé de la façon suivante.

On autoclave ensemble pendant 15 min à 121°C un mélange à 1,0% d'extrait de levure, 0,25% de Tween 80, 0,068% de phosphate monopotassique, 0,057% de sulfate de magnésium heptahydraté, 0,012% de sulfate de manganèse monohydraté, 0,003% de sulfate ferreux heptahydraté et 1% de citrate de sodium. Après autoclavage, on ajoute 1% de glucose préalablement stérilisé. Le mélange cryogénique utilisé est constitué de 1% de glutamate de sodium, 0,1% de malate et 0,05% de cystéine. On ajoute ce mélange aux milieux après autoclavage sous la forme d'un mélange stérilisé par filtration. On ajuste le pH du mélange obtenu à 4,5 avec de l'acide acétique glacial. On cultive les cellules bactériennes jusqu'à ce qu'on atteigne une densité comprise entre  $1 \times 10^9$  et  $2 \times 10^9$  cellules/millilitre et on recueille alors les cellules et on les lyophilise. Avant la lyophilisation, on congèle rapidement les cellules à -80°C et on les place dans l'appareil de lyophilisation à l'état congelé en veillant à ce qu'elles ne se décongèlent pas.

*Exemple 9:**Addition de bactéries lyophilisées à du vin*

Pour obtenir les meilleurs résultats, on doit ensemer le vin pendant ou peu de temps après l'achèvement de la fermentation primaire. Aucun traitement spécial du vin n'est nécessaire. On place la culture bactérienne lyophilisée directement dans le vin et il est recommandé que l'inoculum corresponde à  $10^6$  cellules/millilitre. On associe la culture bactérienne à un dispersant spécial, par exemple de la terre de diatomées, pour faciliter son mélange rapide et homogène dans le vin à traiter.

La préparation des bactéries B-44-40 est conçue de telle sorte qu'on puisse les utiliser dans des vins ayant un pH inférieur à 3,3 et à des températures inférieures à 15°C. Après inoculation du vin, on peut suivre la teneur en malate par simple chromatographie. Lorsque tout le malate a été consommé, on peut séparer la lie qui peut s'être accumulée lors de la fermentation secondaire. On peut utiliser, comme bactéries, B-44-40 ou les souches résistant aux antibiotiques Bio Logicals 44-40. Dans ce dernier cas, si l'utilisateur désire identifier la présence des bactéries dans un vin donné, il peut déterminer le besoin absolu d'acide oléique ou le marqueur de résistance aux antibiotiques de la souche, en plus de l'aspect morphologique.

Bien entendu, diverses modifications peuvent être apportées par l'homme de l'art aux dispositifs ou procédés qui viennent d'être décrits uniquement à titre d'exemples non limitatifs sans sortir du cadre de l'invention.