

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 921**

51 Int. Cl.:

C12G 1/02 (2006.01)

C12H 1/00 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2004** **E 04767287 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013** **EP 1631657**

54 Título: **Cepas malolácticas tolerantes al alcohol para la maduración de los vinos de pH medio o elevado**

30 Prioridad:

12.06.2003 FR 0307046

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

13.12.2013

73 Titular/es:

DANSTAR FERMENT AG (100.0%)
BAHNHOFSTRASSE 7
6300 ZUG, CH

72 Inventor/es:

BOU, MAGALI y
KRIEGER, SIBYLLE

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 433 921 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepas malolácticas tolerantes al alcohol para la maduración de los vinos de pH medio o elevado

5 **[0001]** La presente invención concierne a un procedimiento de control de la fermentación maloláctica en los vinos por inoculación directa de cepas de bacterias lácticas seleccionadas.

[0002] Tiene por objeto unas cepas de bacterias lácticas seleccionadas resistentes al alcohol, capaces de iniciar y de realizar una fermentación maloláctica (FML) completa cuando se introducen sin una etapa previa de aclimatación
10 en un vino de pH medio a elevado. Esta resistencia al alcohol se aprovecha en un procedimiento para producir la FML en un vino de pH medio a elevado, igualmente objeto de la presente invención.

[0003] La fermentación maloláctica (FML) es la decarboxilación del ácido málico en ácido láctico, como resultado de la actividad metabólica de ciertas bacterias lácticas. Muchas bacterias lácticas que provienen de la superficie de los granos de uva, las hojas de parra, el suelo y del material vinícola están presentes naturalmente en todas las etapas del proceso de vinificación y de almacenamiento del vino. Sin embargo, debido a condiciones limitantes del crecimiento, solo algunos grupos de bacterias lácticas son capaces de multiplicarse en el mosto y sobre todo en el vino. Estas bacterias pertenecen a 4 géneros: *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*.
15 Comúnmente, se encuentran en el vino tres especies de *Pediococcus* y siete especies de *Lactobacillus* (Kunkee, 1967, Adv. Appl. Microbiol., vol 9, pp. 235-279), mientras que *Leuconostoc* y *Oenococcus* están representados cada uno por una sola especie (*Leuconostoc mesenteroides* y *Oenococcus oeni*, respectivamente).

[0004] Se hace referencia a la FML en los artículos científicos: Carbo et al., Riv. Vitic. Envl., vol. 48, N° 4, 1995, p. 29-38; Carrie et al., Revue des Oenologues, N° 103, 2002, p. 16-18; Pilone, Wine Industrie Journal, vol. 10, n° 2, 1995, P. 169-173; Lin et al., Am. J. Envl. Vitric., vol. 46, N° 2, 1995, p. 166-174; Joyeux et al., Connaissance Vigne
25 Vin, vol. 19, N° 3, 1985, p. 149-159.

[0005] La disminución de la acidez y la modificación de los aromas del vino que proceden de la FML se consideran beneficiosos para la calidad del vino. Esta fermentación secundaria contribuye además a la estabilización biológica del vino. Su buena realización reviste por lo tanto gran importancia para la obtención de vinos de calidad, lo que ha
30 llevado a los productores a investigar los medios de controlar su iniciación y su desarrollo.

[0006] En la vinificación tradicional, la FML se produce gracias al crecimiento espontáneo de una flora nativa de bacterias lácticas. El proceso de la FML se desencadena por sí mismo, cuando la flora maloláctica está suficientemente desarrollada, es decir, de manera aleatoria entre el final de la fermentación alcohólica y varias semanas, incluso varios meses, después de la fermentación alcohólica. Cuando las bacterias malolácticas alcanzan una concentración de aproximadamente 10^6 UFC/ml en el medio, entran en una fase metabólica activa e inician la fermentación del ácido málico. En estas condiciones, el *Oenococcus oeni* es la especie responsable más frecuentemente de la FML. En efecto, si bien al principio de la fermentación alcohólica se observa una
40 predominancia de las especies homofermentativas *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*, estas desaparecen cuando la cantidad de alcohol aumenta. Después de la fermentación alcohólica son las especies de *Pediococcus* y *Oenococcus*, según el pH, las que predominan y alcanzan finalmente la concentración crítica para iniciar la FML.

[0007] Se han propuesto varios métodos destinados a controlar mejor el inicio y el desarrollo de la FML, que se basan principalmente en la inducción de la FML por inoculación de los mostos o de los vinos con cepas seleccionadas de bacterias lácticas. En general, se utilizan cepas de *Oenococcus oeni*, siendo conocida esta especie por ser la más conveniente para la FML.
45

[0008] Un primer procedimiento consiste en inducir la FML con la ayuda de una biomasa no proliferante de *Oenococcus oeni*. Debido a que las bacterias actúan en este caso como una preparación enzimática, la degradación completa del ácido málico se obtendrá solamente con una inoculación masiva, a razón de al menos 10^8 UFC/ml, lo que representa un coste demasiado elevado para encontrar una aplicación práctica real.
50

[0009] Un segundo proceso consiste en introducir en la cuba de vinificación preparaciones de *Oenococcus oeni*, antes del inicio de la fermentación alcohólica, cuando aún no se ha producido nada de alcohol y el mosto es rico en nutrientes. Este método tiene la ventaja de que las preparaciones pueden añadirse directamente al mosto en estado liofilizado o congelado sin tener que sufrir estrés alcohólico, lo cual sería muy perjudicial. Pero los resultados no han sido satisfactorios, principalmente debido a la competición entre las levaduras y las bacterias lácticas: una de las dos poblaciones se multiplica más rápidamente y puede suplantar a la otra, principalmente por la influencia del pH del medio. Por otro lado, *Oenococcus oeni*, al ser heterofermentativo, puede utilizar el azúcar como sustrato para producir ácido láctico. Por tanto, el riesgo de obtener una producción de ácidos volátiles por las bacterias lácticas es muy disuasivo para los viticultores (Riberau-Gayon et al., 1975, Sciences et techniques du vin, Tomo III, Dunod, Paris).
60

[0010] Frente a este problema, se ha recurrido a cepas homofermentativas de *Lactobacillus plantarum*, de forma que no haya producción de ácido acético a partir de los azúcares presentes en el mosto o en el zumo de frutas, y por
65

tanto no haya aumento de la acidez volátil en el vino (solicitud de patente EP 0 398 957). Las cepas seleccionadas se introducen en el mosto o el zumo de fruta antes o en los primeros momentos de la FA. Sin embargo, como estas bacterias malolácticas son incapaces de sobrevivir en un vino fermentado, la degradación del ácido málico se ralentiza y se detiene cuando el nivel de alcohol alcanza el 5%. Al final, el ácido málico no se degrada totalmente y el vino obtenido no es estable desde el punto de vista bacteriológico.

[0011] Otra solución para evitar la producción de acidez volátil a partir de los azúcares puede consistir en añadir las bacterias al vino solo después de la fermentación alcohólica, cuando la tasa de azúcar es mínima. Las preparaciones de bacterias lácticas inoculadas en las cubas de vinificación deben ser, en este caso, capaces de sobrevivir a pesar del estrés debido a un grado de alcohol ya elevado en el medio, siendo además esas bacterias lácticas más sensibles al estrés que las que se introducen en el medio en estado liofilizado o congelado.

[0012] Se han comercializado preparaciones de *Oenococcus oeni* desde hace varios años para la adición de bacterias al vino tras la fermentación alcohólica. Se ha preconizado un precultivo en un medio enriquecido con vino, para evitar la caída importante de la población celular cuando se inocula en un medio alcohólico. Por ejemplo, una incubación a 25 °C durante 1 a 6 días, permite mejorar la supervivencia de las bacterias situándolas en un estado fisiológico adaptado. Esta "reactivación", también llamada "aclimatación", debe permitir una inducción de los mecanismos de resistencia de las células frente a un nivel de alcohol elevado, permitiendo un aumento de la población bacteriana y una recuperación de la actividad metabólica (Lafon-Fourcade et al., 1993, Conn. Vigne Vin, vol 17, pp. 55-71). Este método, aunque es eficaz, requiere tiempo y trabajo y se necesitan ciertos conocimientos microbiológicos. Los tiempos de precultivo y el momento de la introducción deben respetarse con precisión so pena de una pérdida significativa de viabilidad, lo que representa un serio contratiempo durante el periodo de las vendimias.

[0013] Más recientemente, se ha explorado otra vía para disponer de preparaciones de bacterias lácticas que respondan a la doble exigencia de poder ser inoculadas en el vino en forma liofilizada o congelada, sin pérdida de viabilidad a pesar del grado alcohólico, lo que permite en particular realizar la FML en periodos más cortos sin aumentar la biomasa aportada. La patente EP 635 050 describe un procedimiento de inducción de la fermentación maloláctica por inoculación a un vino de un cultivo liofilizado de bacterias lácticas que pertenecen al género *Oenococcus oeni* resistentes al alcohol, sin la etapa previa de aclimatación. Las cepas seleccionadas de *Oenococcus oeni* presentan una tasa de supervivencia elevada que hace posible el inicio de la FML con unas concentraciones básicas de aporte (de $1 \cdot 10^6$ a $5 \cdot 10^7$ UFC/ml) y en presencia de alcohol con unas tasas comprendidas entre un 10,5% y un 13%. En las condiciones definidas y con un pH comprendido entre 3,2 y 3,6, las células entran rápidamente en fase de fermentación maloláctica activa.

[0014] Aunque estas preparaciones liofilizadas de *Oenococcus oeni* para la adición directa hayan probado su utilidad en varios tipos de vinos, existen muchos casos en los que su utilización no es satisfactoria. De hecho, el pH del vino es un factor esencial que interviene en la selección de la especie que realizará la FML.

[0015] Ahora bien, una gran parte de los vinos tintos que se producen actualmente provienen de regiones cálidas (como por ejemplo el sur de Europa). Estos vinos tienen un pH bastante elevado, es decir, del orden del 3,5 o superior a este valor, lo que favorece el crecimiento bacteriano y en primer lugar el desarrollo de las bacterias nativas, malolácticas u otras. Estas bacterias, que resisten mal los pH inferiores a 3,5, están por tanto favorecidas en detrimento de *Oe. oeni*.

[0016] Esto conduce a dos tipos de problemas. Por una parte, aunque los iniciadores de la FML a base de *Oe. oeni* que se inoculan en las cubas después de la fermentación alcohólica sean resistentes al alcohol, su rehidratación y aclimatación necesita un cierto tiempo antes de la recuperación de una actividad fermentativa. Como la microflora nativa está favorecida a pH elevados, pueden desarrollarse más rápidamente especies indeseables y suplantar a *Oe. oeni*. La población bacteriana inoculada disminuye por debajo de la masa crítica de 10^6 UFC/ml, o incluso no la alcanza nunca. La degradación del ácido málico no puede realizarse completamente o ni siquiera se inicia.

[0017] Por otra parte, a los valores de pH que favorecen el crecimiento bacteriano, se produce frecuentemente el inicio espontáneo de la FML por una o varias cepas malolácticas nativas, antes incluso de que la fermentación alcohólica se termine, en un estado del proceso en el que los azúcares aún están presentes en cantidades importantes, que disuade de la introducción de bacterias lácticas heterofermentativas en el medio.

[0018] En los dos casos, el control de la FML simplemente no es posible, ya que el riesgo de que sea realizada por bacterias indefinidas es importante, y por tanto no se conocen las características. Las especies nativas dominantes pueden consumir en particular varios sustratos y producir compuestos tóxicos o que lleven a modificaciones organolépticas desagradables y otros efectos negativos sobre el vino.

[0019] Se pueden citar a modo de ejemplo ciertas cepas de *Lactobacillus brevis*, capaces de metabolizar el ácido tartárico (enfermedad de la vuelta), lo que reduce la acidez total y aumenta la acidez volátil. Ciertas cepas de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus buchneri* son capaces de degradar el glicerol, los metabolitos producidos tienen

entonces un papel como precursores de la acroleína, que reacciona con los taninos de los vinos y da un gusto amargo. Muchas cepas malolácticas, de *Pediococcus*, pero también de *Lactobacillus brevis* y ciertas cepas de *Oenococcus oeni* pueden decarboxilar los aminoácidos en aminas biógenas, como la histidina en histamina, que pueden ser el origen de reacciones alérgicas graves en personas sensibles. *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* y otras especies, principalmente del grupo de los *Pediococcus*, son responsables de vinos ahilados, mal de los vinos causado por la producción de polisacáridos exocelulares que aumentan la viscosidad del vino.

[0020] La presencia de tales bacterias lácticas en el seno de una microflora nativa es un fenómeno muy extendido. La complejidad de esta microflora aumenta los riesgos de que al menos una cepa indeseable esté presente en el mosto, y los valores de pH medios o elevados le dan la oportunidad de desarrollarse rápidamente. Todas estas reacciones metabólicas participan de una manera u otra en la alteración de la calidad del vino y son el origen de serias pérdidas económicas.

[0021] Los productores, que tienen objetivos cuantitativos pero también cualitativos con respecto a los productos con el fin de responder a las expectativas del mercado, tienen que controlar lo más posible el proceso de vinificación sea el que sea el pH del vino, y limitar los riesgos de evolución no deseada a lo largo de todo el proceso. Desean disponer de iniciadores de la FML adaptados a las condiciones modernas de producción y a las exigencias de los consumidores, que les protejan en el mejor de los casos de estos riesgos.

[0022] La presente invención tiene por objetivo responder a esta necesidad. De manera inesperada, la solución reside en la selección de cepas de bacterias lácticas resistentes al alcohol, pertenecientes a las especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Estas son capaces de iniciar y realizar una FML completa cuando se introducen sin una etapa previa de aclimatación en un vino de pH medio a elevado. Esa resistencia al alcohol, desconocida entre las bacterias lácticas de estas especies, se manifiesta por una parte por una tasa excelente de supervivencia cuando se inoculan y por otra por un inicio rápido de la actividad fermentativa.

[0023] Estas cepas, además de ser tolerantes al alcohol, presentan un metabolismo homofermentativo, lo que permite su inoculación en el vino antes del final de la fermentación alcohólica, sin producir acidez volátil.

[0024] Las características combinadas de resistencia al alcohol y de crecimiento rápido a un pH medio o elevado, confieren a estas cepas según la invención la ventaja esencial de desarrollarse más rápidamente que la flora nativa, incluso a un pH que favorezca el crecimiento de esta última. El resultado particularmente ventajoso es que no pueden desarrollarse las especies nativas, y por tanto se les impide producir compuestos indeseables. Es posible añadir bacterias en el transcurso de la fermentación alcohólica sin perjudicar la calidad del vino, lo que ofrece una garantía suplementaria de que la FML se realice bajo el control permanente del viticultor.

[0025] Este resultado es aún más sorprendente puesto que las cepas seleccionadas que responden a las exigencias expuestas anteriormente pertenecen a especies de *Lactobacillus* y de *Pediococcus*. Estas bacterias lácticas se habían descartado hasta ahora para su uso en un medio alcohólico, en particular por el hecho de que rara vez están presentes en los medios de fermentación alcohólica y sobre todo en los vinos. Las escasas tentativas de invertir esto anteriormente han llevado a resultados decepcionantes.

[0026] Por ejemplo, se ha visto anteriormente que la adición de preparaciones de *Lactobacillus plantarum* antes de la fermentación alcohólica no permitía una FML completa debido a la pérdida de actividad cuando el grado de alcohol alcanzaba el 5%. Más recientemente, este hecho se ha confirmado por los trabajos llevados a cabo en la Universidad de La Rioja en España (Tenorio et al., 2002, XIII Congreso de Microbiología de los Alimentos, Universidad de La Rioja). De dos cepas de cada una de las especies *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum* que se seleccionaron de entre la flora nativa, se inocularon $5 \cdot 10^6$ UFC/ml en un vino de la región de La Rioja (en el sur de España) después de la fermentación alcohólica. Las cepas de *Oe. oeni* se impusieron en el medio y permitieron un buen desarrollo de la FML, mientras que las cepas de *L. plantarum* desaparecieron hasta no ser detectables al final de la FML. Estos resultados muestran una vez más que cuando se introduce *Lactobacillus* en un medio alcohólico, se deteriora y no es capaz de fermentar el ácido málico en ácido láctico.

[0027] Por otra parte, es bien conocido que las bacterias lácticas tienen una resistencia al estrés muy reducida después de la desecación, liofilización o congelación. Cuando se someten a condiciones desfavorables, tales como un grado alcohólico elevado, su tasa de supervivencia decae drásticamente, y su actividad fermentativa no puede iniciarse salvo después de un período de adaptación al medio más o menos largo. Para iniciar la FML, hace falta además alcanzar una concentración del orden de 10^6 UFC/ml, por lo que se necesitará a menudo una fase de multiplicación celular que permita que la población se reconstituya.

[0028] La presente invención aporta igualmente una respuesta a este problema gracias a nuevas cepas seleccionadas de bacterias malolácticas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, las cuales son capaces de iniciar y realizar la FML cuando se introducen directamente en estado seco, liofilizado o congelado en un vino con un pH medio o elevado.

[0029] Es también un objeto de la presente invención, un procedimiento de inducción de la FML por inoculación directa de estas bacterias malolácticas resistentes al alcohol.

[0030] Se denominará "vino" a un medio de fermentación tal como un mosto a base de zumo de uva o de otras frutas, en el que la cantidad de alcohol producido por fermentación alcohólica es al menos del 5% del volumen. Este vino puede alcanzar su grado alcohólico máximo si la fermentación alcohólica ha terminado. La cantidad de alcohol se expresa por el volumen de alcohol con respecto al volumen total.

[0031] Se denominará "vino maduro" o "vino en madurez" a un vino en el que la FML se ha desarrollado completamente, es decir, en el que la cantidad de ácido málico es inferior a 0,2 g/l. Este vino maduro es microbiológicamente estable, al contrario que un vino no maduro.

[0032] Para un vino, un pH medio será del orden de 3,5 a 3,6, y un pH elevado podrá ser de aproximadamente 3,6 hasta los pH máximos encontrados en los vinos, o sea aproximadamente 4,0, incluso más.

[0033] Por "inoculación directa" se entiende la introducción en el medio de fermentación de las bacterias lácticas elegidas, sin una etapa previa de aclimatación o de adaptación al medio, a una concentración económicamente aceptable, es decir, comprendida entre 10^6 y $5 \cdot 10^7$ UFC/ml de medio. Se puede hacer una simple rehidratación de 20 minutos en agua a 22 °C.

[0034] Las propiedades ventajosas de las cepas seleccionadas según la invención se manifiestan por su capacidad para entrar en la fase fermentativa activa prácticamente sin tiempo de latencia para iniciar la FML en un plazo breve, a pesar de las condiciones desfavorables del medio.

[0035] En la práctica esto se traduce en el hecho de que los primeros días tras la inoculación bacteriana, fracciones importantes del ácido málico presente en el medio se transforman en ácido láctico. Una vez que se inicia el proceso de la FML, las bacterias inoculadas conservan su posición predominante en el medio y aseguran el buen desarrollo de la FML, hasta el agotamiento del sustrato, de forma que se garantiza que el vino maduro que se produce al final, estará exento de compuestos no deseables.

[0036] Es importante señalar que las cepas según la invención son resistentes al alcohol incluso en condiciones que inducen un importante estrés y que conducen a un debilitamiento celular, en particular cuando la inoculación es en forma seca, liofilizada o congelada sin una etapa previa de aclimatación.

[0037] Por tanto, una cepa seleccionada de bacteria láctica según la invención perteneciente a los géneros *Lactobacillus* o *Pediococcus*, tiene la capacidad de realizar la conversión de ácido málico en ácido láctico de manera que, cuando se introduce con una concentración comprendida entre 10^6 y $5 \cdot 10^7$ UFC/ml, directamente en estado seco, liofilizado o congelado en un vino que tiene un grado de alcohol del 10% o más y un pH igual o superior a 3,5,

- i) convierte al menos el 5%, y preferentemente al menos el 10%, del ácido málico en ácido láctico en 5 días después de la inoculación en dicho vino, y
- ii) convierte al menos el 10%, y preferentemente al menos el 25%, del ácido málico en ácido láctico en 10 días después de la inoculación en dicho vino.

[0038] De manera particularmente ventajosa, una cepa de bacteria láctica según la invención tiene una actividad fermentativa tal que, cuando se introduce a una concentración comprendida entre 10^6 y $5 \cdot 10^7$ UFC/ml, directamente en estado seco, liofilizado o congelado en un vino que tiene un grado de alcohol del 10% o más y un pH igual o superior a 3,6

- iii) convierte al menos el 10%, y preferentemente al menos el 15%, del ácido málico en ácido láctico en 5 días después de la inoculación en dicho vino, y
- iv) convierte al menos el 25%, y preferentemente al menos el 40%, del ácido málico en ácido láctico en 10 días después de la inoculación en dicho vino.

[0039] Estas cepas por tanto son particularmente interesantes como iniciadoras de la FML en los vinos de pH medio o elevado, en el transcurso o al final de la fermentación alcohólica. De esta forma, su empleo es totalmente posible en las condiciones habituales de pH y de concentración alcohólica, correspondiéndose su capacidad de realizar la FML con las prestaciones obtenidas comúnmente con otros iniciadores de la FML.

[0040] Como se explicó anteriormente, para asegurarse de que las bacterias nativas no se desarrollen, puede ser interesante inocular el medio de fermentación antes del final de la fermentación alcohólica, sin riesgo de producir acidez volátil a partir del azúcar que aún está presente en el medio. Según una característica ventajosa de la presente invención, las cepas de bacterias lácticas seleccionadas son homofermentativas.

[0041] Además, es interesante que las cepas seleccionadas no sean capaces de producir compuestos tóxicos o que den lugar a modificaciones organolépticas desagradables y otros efectos negativos en el vino. Esto es porque

las cepas seleccionadas de bacterias lácticas a las que se refiere la invención, igualmente no producen aminas biógenas a partir de precursores aminados presentes en el vino, ni degradan el glicerol ni el ácido tartárico. Preferentemente, las cepas según la invención poseen todas estas propiedades.

[0042] Según una forma de realización ventajosa, la presente invención se refiere a una cepa de bacteria láctica que posee todas las características definidas anteriormente, y que tiene la capacidad, cuando se introduce directamente a una concentración de $2 \cdot 10^6$ UFC/ml, en un vino a una temperatura igual o superior a 18 °C, que tiene una cantidad de SO₂ comprendida entre 0 y 15 mg/l, una cantidad de alcohol igual o superior al 10%, y un pH de 3,7 o más

- i) de convertir el 15% del ácido málico en ácido láctico en 5 días después de la inoculación en dicho vino, y
- ii) de convertir el 40% del ácido málico en ácido láctico en 10 días después de la inoculación en dicho vino.

[0043] De manera particularmente ventajosa, dicha cepa de bacteria láctica posee todas las características definidas anteriormente, y tiene la capacidad, cuando se introduce directamente con una concentración de $2 \cdot 10^6$ UFC/ml, en un vino a una temperatura superior o igual a 18 °C, que tiene una cantidad de SO₂ comprendida entre 0 y 15 mg/l, una cantidad de alcohol superior o igual al 10%, y un pH de 3,7 o más

- i) de convertir el 50% del ácido málico en ácido láctico en 5 días después de la inoculación en dicho vino, y
- ii) de convertir el 80% del ácido málico en ácido láctico en 10 días después de la inoculación en dicho vino.

[0044] Las cepas poseen las características anteriores cuando se introducen en un vino que tiene una cantidad de alcohol del 10%, incluso del 12% e incluso del 13%. Por supuesto, estas cepas presentan características idénticas o mejores cuando se introducen más precozmente en el vino, por ejemplo cuando la cantidad de alcohol es solo del 5%.

[0045] Como se indicó anteriormente, las bacterias malolácticas seleccionadas pertenecen de manera inesperada a los géneros *Lactobacillus* o *Pediococcus*, hasta ahora considerados no aptos para desarrollarse en un medio alcohólico. En particular, se seleccionan de entre el grupo formado por *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrückii*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus cerevisiae*.

[0046] En particular, se reivindican las cepas malolácticas homofermentativas siguientes: *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2924, *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M, depositadas en una colección de cultivos de microorganismos conforme a las disposiciones del Tratado de Budapest, regla 6.1.

[0047] Una preparación de bacterias lácticas destinadas a utilizarse como iniciadoras de la FML, es decir, para su adición a un vino con el fin de inducir la FML, puede comprender una o varias cepas de bacterias malolácticas tales como las definidas anteriormente, y eventualmente otros ingredientes conocidos por un experto en la materia. Tales preparaciones se pueden presentar en estado líquido, seco, liofilizado o congelado.

[0048] Las bacterias malolácticas resistentes al alcohol descritas anteriormente en el presente documento o una preparación de las mismas, están destinadas a actuar para la realización controlada de la FML en los vinos de pH medio o elevado, principalmente en un procedimiento objeto de la presente invención.

[0049] Este procedimiento de conversión del ácido málico en ácido láctico en un vino que tiene un pH igual o superior a 3,5, consiste en introducir una preparación que comprende al menos una cepa de bacteria láctica tal como la descrita anteriormente, directamente en estado seco, liofilizado o congelado en dicho vino, a una concentración comprendida entre 10^6 y $5 \cdot 10^7$ UFC/ml, a una temperatura igual o superior a 18 °C, cuando el grado de alcohol es al menos del 10% y en mantener el vino en unas condiciones que permitan el desarrollo de la FML, para obtener un vino maduro en el que la cantidad de ácido málico sea inferior a 0,2 g/l.

[0050] El procedimiento puede aplicarse ventajosamente a cualquier vino en el que el pH sea igual o superior a 3,5 sin límite superior. Se lleva a cabo de manera particularmente ventajosa en los vinos de pH 3,6 o más, en los que el riesgo de desarrollar bacterias no deseables con crecimiento rápido es particularmente elevado.

[0051] Si el viticultor lo desea, y con el fin de evitar un inicio de la FML por bacterias nativas descontroladas, se puede introducir una preparación de bacterias lácticas según la invención en el vino durante la fermentación, por ejemplo, cuando el grado de alcohol ha alcanzado el 5% o antes, es decir, cuando la cantidad de azúcar presente en el vino aún es importante. En ese caso, las bacterias lácticas que entran en la preparación de adición son todas homofermentativas, de manera que se elimina el riesgo de producción de ácidos volátiles.

[0052] Por otro lado, el procedimiento de conversión del ácido málico en ácido láctico objeto de la presente invención se lleva a cabo preferentemente con la ayuda de una preparación de bacterias lácticas que poseen una o varias de las características siguientes (lo ideal sería que poseyeran todas a la vez):

- no producen aminas biógenas a partir de precursores aminados.
- no degradan el glicerol,
- no degradan el ácido tartárico.

5 **[0053]** Las preparaciones bacterianas empleadas en el procedimiento reivindicado se preparan a partir de una o varias cepas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* o *Pediococcus*, y pueden escogerse entre las especies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrückii*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus parvulus*, o *Pediococcus cerevisiae*.

10 **[0054]** En particular, pueden utilizarse una o varias cepas de bacterias malolácticas seleccionadas de entre el grupo compuesto por *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2924 y *Pediococcus acidilactici* CNCM MA18/5M.

[0055] Por ejemplo, se podría añadir a un vino con un pH igual o superior a 3,7 en el que la concentración de alcohol es superior al 11%, una preparación de bacterias malolácticas que comprendan *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2924.

[0056] Se podría también inocular un vino de pH igual o superior a 3,7 en el que la concentración de alcohol es superior al 12% con una preparación de bacterias malolácticas que comprenden *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M.

20 **[0057]** Las concentraciones económicamente aceptables son del orden de $5 \cdot 10^5$ a $5 \cdot 10^7$ UFC/ml de vino. Preferentemente se inocula el vino con $2 \cdot 10^6$ UFC/ml. Las bacterias lácticas o las preparaciones de bacterias lácticas se introducen directamente en el medio de fermentación sin etapa previa de aclimatación. Cuando las bacterias se añaden al vino en forma liofilizada, se someten a una simple rehidratación durante unos veinte minutos.

25 **[0058]** La presente invención puede utilizarse para producir un vino maduro que se obtiene con la ayuda de una preparación de bacterias lácticas tales como las descritas anteriormente.

30 **[0059]** Los ejemplos siguientes permitirán ilustrar con más detalle la realización de la invención y los resultados obtenidos. Es importante señalar que los modos de realización que incluyen la cepa de *Lactobacillus plantarum* DSM 9916 se proporcionan solamente a título ilustrativo.

EJEMPLO 1

35 Protocolo de selección de las cepas

[0060] Se realizó una selección de cepas naturales de bacterias lácticas provenientes de vinos fermentados o de zumos de frutas fermentados. Las bacterias lácticas naturales aisladas se sometieron a una selección según los siguientes criterios:

- Resistencia a unas tasas de alcohol $\geq 10\%$
- Crecimiento a baja temperatura (15 °C)
- Sin formación de aminas biógenas
- Sin degradación del glicerol
- 45 - Sin degradación del ácido tartárico

EJEMPLO 2

Determinación de la resistencia al etanol

50 **[0061]** Las bacterias malolácticas se cultivaron en un caldo CMB. El pH del medio se ajustó a 3,5 con sosa 6 N. Los tubos de ensayo se llenaron con 5 ml de medio CMB y a continuación se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Después del enfriamiento, los niveles de alcohol se ajustaron con etanol puro al: 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, y 14%. Los tubos se inocularon al 0,5%, con un cultivo MRS cultivado durante 48 h (Garvie, 1967, J. gen. Microbiol., vol. 48, pp. 431-438). El crecimiento se siguió midiendo la turbidez a 600 nm después de 3 semanas.

EJEMPLO 3

Determinación del crecimiento a baja temperatura

60 **[0062]** El crecimiento a baja temperatura se ensayó en el mismo medio según el mismo protocolo que el utilizado para la determinación de la resistencia al alcohol descrito en el ejemplo 1. El crecimiento se controló por la medición de la turbidez a 600 nm después de 3 semanas.

65

EJEMPLO 4**Determinación de la producción de aminas biógenas a partir de aminoácidos**

- 5 **[0063]** La selección de cepas que no producen aminas biógenas se ha realizado por cultivo en un medio modelo MECM. Las aminas biógenas que se han investigado son las que se encuentran más a menudo en cantidad importante en los vinos: la histamina, la tiramina, la putrescina y la cadaverina. Para seleccionar las cepas que no produjeran aminas biógenas, estas se cultivaron en un medio modelo MECM suplementado con aminoácidos precursores, particularmente, histidina para la histamina, tirosina para la tiramina, ornitina para la putrescina y la lisina para la cadaverina.

Composición del medio modelo	Concentraciones (g/l)
Triptona	10,0
Extracto de levadura	4,0
Tween 80	1,0
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	0,05
Pantotenato de Calcio	0,01
Glucosa	5,0
Fructosa	5,0
Ácido L-málico	4,0

- 15 **[0064]** El pH se ajustó a 5,0 con HCl o NaOH y el medio se esterilizó en autoclave a 115 °C durante 30 min. Se añadió al medio modelo una solución madre de aminoácidos precursores a 100 mg/ml esterilizada por filtración. La concentración final del medio modelo suplementado es de:

- histidina 10 mg/ml
- tirosina 10 mg/ml
- ornitina 10 mg/ml
- 20 - lisina 10 mg/ml

- 25 **[0065]** Estos precultivos de las cepas de bacterias lácticas se realizaron en un medio MRS, después las células se lavaron en un tampón fosfato, y se volvieron a poner en suspensión en el mismo volumen de tampón fosfato. El medio modelo suplementado se inoculó a continuación con las cepas a ensayar al 1%. Después de la realización de la FML (degradación del ácido málico), las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se congelaron para analizar las aminas biógenas. Solo se conservaron las bacterias que no formaron aminas biógenas a partir de los aminoácidos precursores.

EJEMPLO 5**Control del metabolismo del glicerol y del ácido tartárico**

- 35 **[0066]** El estudio de la degradación del ácido tartárico y del glicerol se realizó en el medio MECMb, de la manera siguiente

Composición del medio MECMb	Concentración (g/l)
Triptona	10,0
Extracto de levadura	4,0
Tween 80	1,0
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	0,05
Pantotenato de Calcio	0,01

- [0067]** Los siguientes compuestos diferentes se añadieron al medio MECMb para obtener distintos medios suplementados:

Compuesto	Concentración (g/l)
Glucosa	5,0
Fructosa	5,0
Glicerol	5,0
TMC: ácido tartárico+ ácido málico+ ácido cítrico:	
Ácido tartárico	7,0
Ácido málico	4,0
Ácido cítrico	0,4

[0068] La degradación se ensayó en las diferentes combinaciones siguientes:

Combinación	Medio
1	MECMb
2	MECMb + TMC
3	MECMb + TMC + glucosa
4	MECMb + TMC + fructosa
5	MECMb + TMC + glicerol
6	MECMb + TMC + glucosa + fructosa + glicerol

[0069] Las bacterias, previamente cultivadas en medio MRS, se lavaron y se utilizaron para inocular los medios MECMb suplementados al 1% (v:v). Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 7-15 días y se analizaron los metabolitos formados. Solo se conservaron las bacterias que no degradaban ni el ácido tartárico ni el glicerol.

EJEMPLO 6

Ensayos de liofilización

[0070] Las cepas que dieron una respuesta positiva a todos los criterios de selección se ensayaron para obtener una producción en forma liofilizada. Se produjeron dos cepas de *Lactobacillus plantarum* y una cepa de *Pediococcus* con las características dadas, en la forma liofilizada, para la inoculación directa de los vinos. La cepa de *Lactobacillus plantarum* DSM 9916 se aisló de un vino Chardonnay californiano, la cepa de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2924 se aisló a partir de un mosto de frutas destinado a destilarse, que se conservó añadiendo ácido y SO₂.

EJEMPLO 7

Tolerancia al alcohol

[0071] La tolerancia al etanol se ensayó en el medio CMB para las cepas siguientes:

- las 2 cepas seleccionadas de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-292A y DSM-9916,
- la cepa seleccionada de *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M,
- una cepa comercial de *Lactobacillus plantarum* (Viniflora) preconizada para inoculación de zumo,
- la cepa de *Lactobacillus plantarum* CNCM MA 18/5U comercializada para nutrición animal,
- la cepa de *Lactobacillus casei* CNCM MA 542/2V, comercializada para nutrición humana,
- la cepa de *Oenococcus oeni* EQ54, comercializada por Lallemend para la adición directa.

[0072] Las células se cultivaron en medio CMB que contenía un 0%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12% y 14% de alcohol etílico. El crecimiento bacteriano se determinó a los 21 días por medición espectrofotométrica de la densidad óptica DO a 600 nm.

[0073] La tolerancia al alcohol TA(x) de las cepas en presencia de una cantidad de alcohol x%, se representa por la tasa de supervivencia después de 21 días en el medio alcohólico con respecto a la tasa de supervivencia después de 21 días en un medio sin alcohol.

$$TA(x) = DO \text{ a } x\% \text{ de alcohol} / DO \text{ a } 0\% \text{ de alcohol}$$

[0074] Los resultados se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1						
Tasa de supervivencia (%) a las cantidades de alcohol:						
Cepas	4%	6%	8%	10%	12%	14%
<i>L. pl.</i> CNCM 1-2924	90	76	71	66	62	3
<i>L. pl.</i> DSM-9916	88	84	71	68	57	3
<i>P. acid.</i> CNCM-MA 18/5M	114	106	102	71	46	8
<i>L. pl.</i> Viniflora	119	96	75	41	6	6
<i>L. pl.</i> CNCM MA 18/5U	82	68	52	25	6	4
<i>L. cas.</i> CNCM MA 542/2V	96	134	78	10	7	7
<i>Oe. oeni</i> EQ54	100	100	95	87	78	77

[0075] Entre las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici*, solo las cepas seleccionadas de *L. plantarum* DSM-9916 y CNCM I-2924 y la cepa de *P. acidilactici* CNCM-MA 18/5M tenían una tasa de supervivencia superior al 50% después de 21 días en un medio que contenía un 10% de alcohol, y se podían desarrollar a unas concentraciones de alcohol superiores al 12%. Estos valores se alcanzaron igualmente con la cepa *Oe. oeni* EQ54.

EJEMPLO 8**Degradación del ácido málico por *L. plantarum* CNCM I-2924**

5 **[0076]** La FML se realizó con la ayuda de la cepa *L. plantarum* CNCM I-2924 por inoculación directa en forma liofilizada, a razón de $2,0 \cdot 10^6$ UFC/ml, tras la realización de la fermentación alcohólica en los vinos siguientes:

- Vino de ensayo pH = 3,6
- Vino de los Viñedos de Buzet, pH = 3,54

10

Los ensayos se realizaron en el laboratorio, en frascos de 200 ml.

Preparación del vino de ensayo

15 **[0077]** El vino de ensayo se fabricó a partir de zumo de uva comercial en tres etapas:

A) Vinificación:

- 1 – El zumo se suplementó con 70 g/l de dextrosa.
- 2 – El zumo se inoculó con 20 g/hl de levadura seca activa Lalvin CY3079; la levadura se rehidrató previamente en un pequeño volumen de zumo a 30 °C durante 30 min.
- 3 – La fermentación se produjo a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C.
- 4 – Una semana después, se midió la concentración de azúcares residuales. Si la concentración de azúcares residuales era inferior a 2 g/l, el vino se clarificaba.

20

B) Clarificación:

- 1 – El vino se clarificó por centrifugación (8500 rpm, 10 min)
- 2 – El vino se dejó a 4 °C durante 8 días.
- 3 – Se eliminaron los cristales de ácido tartárico por centrifugación (8500 rpm, 10 min)

30

C) Estandarización:

El vino se analizó tras la fermentación alcohólica y antes de la inoculación de las preparaciones liofilizadas de *L. plantarum* DSM-9916, el pH se ajustó a 3,6, la cantidad de ácido málico se llevó a 5 g/l. El vino de ensayo que se obtuvo de esta manera tenía las siguientes características:

35

Alcohol (% del volumen)	11,94
Azúcares residuales (g/l)	0,0
SO ₂ libre (mg/l)	4
SO ₂ total (mg/l)	5
Ácido acético (g/l)	0,23
pH	3,18 ajustado a 3,6
Acidez total (g/l H ₂ SO ₄)	5,0
Ácido málico (g/l)	3,1 llevado a 5,0

Vino tinto (Viñedos de Buzet)

40 **[0078]** El vino tinto utilizado es un vino comercial producido por los Viñedos de Buzet. El vino solamente se filtró y se conservó a 4 °C.

[0079] El vino se analizó después de la fermentación alcohólica y antes de la inoculación de preparaciones liofilizadas de *L. plantarum* DSM-9916.

Alcohol (% del volumen)	12,30
Azúcares residuales (g/l)	0,5
SO ₂ libre (mg/l)	4
SO ₂ total (mg/l)	5
Ácido acético (g/l)	0,17
pH	3,54
Acidez total (g/l H ₂ SO ₄)	3,6
Ácido málico (g/l)	1,5

45

[0080] La preparación bacteriana liofilizada se rehidrató en agua a 22 °C durante 20 minutos. A continuación, la solución se añadió directamente al vino después de la fermentación alcohólica. Se midió la supervivencia en el vino y la degradación del ácido málico hasta el agotamiento del sustrato. Se realizaron dos ensayos para cada vino. Un lote no sembrado sirvió como control.

50

Tasa de supervivencia

[0081] La tabla 2 muestra los resultados de las tasas de supervivencia de *L. plantarum* CNCM I-2924, 2 días y 14 días después de la inoculación.

5

TABLA 2

Vino	Inoculación (UFC/ml)	Población el día 0 (UFC/ml)	Población el día 2 (UFC/ml)	% de supervivencia el día 2	Población el día 14 (UFC/ml)	% de supervivencia el día 14
Ensayo	2,0E6	2,1E6	1,9E6	90	1,8E6	86
Ensayo	2,0E6	2,1E6	1,85E6	89	1,65E6	79
Buzet	2,0E6	1,9E6	1,6E6	84	1,7E6	89
Buzet	2,0E6	1,95E6	1,7E6	87	1,6E6	82

Degradación del ácido málico

[0082] La dosificación del ácido málico se determinó para cada ensayo a intervalos regulares con la ayuda de un kit de dosificación (kit E 0139 068, Boehringer Mannheim, Alemania).

10

[0083] La Figura 1 muestra la cinética de degradación del ácido málico en el vino de ensayo a pH=3,6 después de la inoculación con una preparación liofilizada de *L. plantarum* CNCM I-2924.

[0084] La Figura 2 muestra la cinética de degradación del ácido málico en el vino de Buzet después de la inoculación con una preparación liofilizada de *L. plantarum* CNCM I-2924.

15

EJEMPLO 9**Degradación del ácido málico por *L. plantarum* DSM-9916**

20

[0085] La FML se realizó con la ayuda de la cepa de *L. plantarum* DSM-9916 por inoculación directa de la forma liofilizada a razón de $3,0 \cdot 10^6$ UFC/ml, después de la realización de la fermentación alcohólica en el mismo vino tinto de los Viñedos de Buzet, a pH=3,54, que el utilizado en el ejemplo anterior. El vino de Buzet se preparó como se ha indicado antes y poseía las mismas características químicas (véase el ejemplo 8). El ensayo se llevó a cabo con el mismo protocolo.

25

[0086] Tasa de supervivencia: La tabla 3 muestra los resultados de las tasas de supervivencia de *L. plantarum* CNCM I-2924, 2 días y 14 días después de la inoculación.

30

TABLA 3

Vino	Inoculación (UFC/ml)	Población el día 0 (UFC/ml)	Población el día 2 (UFC/ml)	% de supervivencia el día 2	Población el día 14 (UFC/ml)	% de supervivencia el día 14
Buzet	3,0E6	2,3E6	2,3E6	97	1,8E6	78
Buzet	3,0E6	3,1E6	2,1E6	68	1,8E6	58

[0087] Degradación del ácido málico: La dosificación del ácido málico se determinó para cada ensayo a intervalos regulares con la ayuda de un kit de dosificación (kit E 0139 068, Boehringer Mannheim, Alemania). La Figura 3 muestra la cinética de degradación del ácido málico en el vino de Buzet después de la inoculación de una preparación liofilizada de *L. plantarum* DSM-9916.

35

EJEMPLO 10**Degradación del ácido málico en un vino Cabernet por *L. plantarum* DSM 9916 y *P. acidilactici* CNCM MA-18/5M – Comparación con *Oe. oeni* EQ54.**

40

[0088] La FML se realizó en un vino Cabernet Sauvignon de Chile en 2002, de pH 3,7. Los ensayos se llevaron a cabo en 4 barricas de 225 l:

- 45
- vino al que se le ha añadido la cepa *L. plantarum* DSM 9916,
 - vino al que se le ha añadido la cepa *P. acidilactici* CNCM MA-18/5M,
 - vino al que se le ha añadido la cepa *Oe. oeni* EQ54,
 - vino control, sin adiciones.

50 **[0089]** El vino se analizó después de la fermentación alcohólica y antes de la inoculación de preparaciones liofilizadas de bacterias lácticas.

Alcohol (% de vol)	12,9
Azúcares residuales (g/l)	0,3
SO ₂ libre (mg/l)	6
SO ₂ total (mg/l)	13
pH	3,7
Ácido málico (g/l)	1,90
Ácido láctico (g/l)	0,08

[0090] Las cepas se inocularon en forma liofilizada a razón de $2,0 \cdot 10^6$ UFC/ml, a 18 °C, directamente en el vino después de la realización de la fermentación alcohólica. La dosificación del ácido málico se determinó para cada ensayo a intervalos regulares con la ayuda de un kit de dosificación (kit E 0139 068, Boehringer Mannheim, Alemania). Los resultados se presentan en la Figura 4.

[0091] Las cinéticas de degradación del ácido málico indican una buena implantación de las cepas DSM 9916 y CNCM MA-18/5M y un inicio precoz y eficaz de la actividad fermentativa. El ensayo control mostró que en este vino a pH relativamente elevado (pH=3,7), la FML se inició espontáneamente desde los primeros días. En el ensayo realizado con la adición de *Oe. oeni*, la cinética de degradación del ácido málico estuvo más próxima a la del ensayo control, lo que significa que las cepas nativas no deseables se desarrollaron lo bastante rápido para suplantar al *Oe. oeni*. El control de la FML que garantiza la seguridad fermentativa se obtuvo solamente con las cepas *L. plantarum* DSM 9916 y *P. acidilactici* CNCM MA-18/5M.

EJEMPLO 11

Degradación del ácido málico en un vino Tempranillo por *L. plantarum* CNCM I-2924 – Comparación con *Oe. oeni* EQ54.

[0092] La FML se realizó en un vino Tempranillo de La Rioja (España) en 2002, de pH 3,9. En los vinos de esta región, se produce a menudo el inicio espontáneo de la FML que se traduce generalmente en tasas elevadas de aminas biógenas. Los ensayos se llevaron a cabo en 3 barricas de 225 l.

- vino al que se le ha añadido la cepa *L. plantarum* CNCM I-2924,
- vino al que se le ha añadido la cepa *Oe. oeni* EQ54,
- vino control, sin adiciones.

[0093] El vino se analizó después de la fermentación alcohólica y antes de la inoculación de preparaciones liofilizadas de bacterias lácticas.

Alcohol (% de vol)	11,98
Azúcares residuales (g/l)	0,2
SO ₂ libre (mg/l)	4
SO ₂ total (mg/l)	11
pH	3,9
Ácido málico (g/l)	2,35
Ácido láctico (g/l)	0,05

[0094] Las cepas se inocularon directamente en forma liofilizada a razón de $2,0 \cdot 10^6$ UFC/ml, a 18 °C, después de la realización de la fermentación alcohólica. La dosificación del ácido málico se determinó para cada ensayo a intervalos regulares con la ayuda de un kit de dosificación (kit E 0139 068, Boehringer Mannheim, Alemania). En paralelo, el crecimiento bacteriano se midió en las tres cubas. Los resultados se presentan en las Figuras 5 y 6.

[0095] La cinética de degradación del ácido málico (Figura 5) muestra una inducción rápida de la fermentación con *L. plantarum* CNCM I-2924. Por el contrario, la FML no se inicia hasta después de 10 días en la cuba sembrada con *Oe. oeni* EQ54 y en la cuba control: no se observó diferencia entre estos dos ensayos, lo que significa que las cepas nativas no deseables se desarrollaron lo bastante rápido para suplantar al *Oe. oeni*.

[0096] El seguimiento del crecimiento celular (Figura 6) muestra por otra parte que la población de *Oe. oeni* EQ54 no decae durante la inoculación del vino y permanece al mismo nivel que la población de *L. plantarum*. Por tanto, se puede atribuir el retraso del inicio de la FML por *Oe. oeni* a pesar de tener una concentración celular satisfactoria a priori, a la incapacidad para inducir una actividad fermentativa en condiciones de alta concentración alcohólica y pH elevado. La tasa de supervivencia no constituye en este caso el criterio decisivo para asegurar un control eficaz de la FML.

REIVINDICACIONES

1. Cepa seleccionada de bacteria láctica perteneciente al género *Lactobacillus* o *Pediococcus*, que tiene la capacidad de realizar la conversión del ácido málico en ácido láctico, **estando caracterizada dicha bacteria por que** cuando se introduce a una concentración comprendida entre 10^6 y $5 \cdot 10^7$ UFC/ml, directamente en estado seco, liofilizado o congelado en un vino que tiene un grado de alcohol del 10% o más y un pH superior o igual a 3,5,
 - i) convierte al menos el 5%, y preferentemente al menos el 10%, del ácido málico en ácido láctico en 5 días después de la inoculación de dicho vino, y
 - ii) convierte al menos el 10%, y preferentemente al menos el 25%, del ácido málico en ácido láctico en 10 días después de la inoculación de dicho vino.
2. Cepa de bacteria láctica según la reivindicación 1, **que se caracteriza por que** cuando se introduce en una concentración comprendida entre 10^6 y $5 \cdot 10^7$ UFC/ml, directamente en estado seco, liofilizado o congelado en un vino que tiene un grado de alcohol del 10% o más y un pH superior o igual a 3,6:
 - iii) convierte al menos el 10%, y preferentemente al menos el 15%, del ácido málico en ácido láctico en 5 días después de la inoculación de dicho vino, y
 - iv) convierte al menos el 25%, y preferentemente al menos el 40%, del ácido málico en ácido láctico en 10 días después de la inoculación de dicho vino.
3. Cepa de bacteria láctica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **que se caracteriza por que** es homofermentativa,
4. Cepa de bacteria maloláctica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que posee además una o varias de las siguientes características:
 - no produce aminas biógenas a partir de precursores aminados,
 - no degrada el glicerol,
 - no degrada el ácido tartárico.
5. Cepa de bacteria láctica según la reivindicación 4, **que se caracteriza por que** tiene la capacidad, cuando se introduce directamente a una concentración de $2 \cdot 10^6$ UFC/ml en un vino a una temperatura superior o igual a 18 °C, que tiene una cantidad de SO₂ comprendida entre 0 y 15 mg/l, una cantidad de alcohol superior o igual al 10%, y un pH de 3,7 o más
 - i) de convertir el 15% del ácido málico en ácido láctico en 5 días después de la inoculación de dicho vino, y
 - ii) de convertir el 40% del ácido málico en ácido láctico en 10 días después de la inoculación de dicho vino.
6. Cepa de bacteria láctica según la reivindicación 4, **que se caracteriza por que** tiene la capacidad, cuando se introduce directamente a una concentración de $2 \cdot 10^6$ UFC/ml en un vino a una temperatura superior o igual a 18 °C, que tiene una cantidad en SO₂ comprendida entre 0 y 15 mg/l, una cantidad de alcohol superior o igual al 10%, y un pH de 3,7 o más
 - i) de convertir el 50% del ácido málico en ácido láctico en 5 días después de la inoculación de dicho vino, y
 - ii) de convertir el 80% del ácido málico en ácido láctico en 10 días después de la inoculación de dicho vino.
7. Cepa de bacteria maloláctica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes seleccionada del grupo formado por *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrückii*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus cerevisiae*.
8. Cepa de bacteria maloláctica según la reivindicación precedente elegida del grupo compuesto por *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2924 o *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M.
9. Preparación de bacterias lácticas que comprende una o varias cepas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
10. Procedimiento de conversión del ácido málico en ácido láctico en un vino que tiene un pH superior o igual a 3,5, que consiste en introducir una preparación de bacterias lácticas según la reivindicación 9, directamente en estado seco, liofilizado o congelado en dicho vino, a una concentración comprendida entre 10^6 y $5 \cdot 10^7$ UFC/ml, a una temperatura superior o igual a 18 °C, cuando el grado de alcohol ha alcanzado al menos el 10%, y mantener el vino en condiciones que permiten el desarrollo de la FML, para obtener un vino maduro que tenga una cantidad de ácido málico inferior a 0,2 g/l.

- 5 **11.** Procedimiento de conversión del ácido málico en ácido láctico en un vino que tiene un pH superior o igual a 3,5, que consiste en introducir una preparación de bacterias lácticas que comprende una o varias cepas según la reivindicación 3, directamente en estado seco, liofilizado o congelado en dicho vino, a una concentración comprendida entre 10^6 y $5 \cdot 10^7$ UFC/ml, a una temperatura superior o igual a 18 °C, cuando el grado de alcohol ha alcanzado al menos el 5%, y mantener el vino en condiciones que permitan el desarrollo de la FML, para obtener un vino maduro que tenga una cantidad de ácido málico inferior a 0,2 g/l.
- 10 **12.** Procedimiento de conversión del ácido málico en ácido láctico según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que dicha preparación posee además una o varias de las características siguientes:
- no produce aminos biógenas a partir de precursores aminados,
 - no degrada el glicerol,
 - no degrada el ácido tartárico.
- 15 **13.** Procedimiento de conversión del ácido málico en ácido láctico según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que dicha preparación comprende una o varias cepas de bacterias malolácticas seleccionadas del grupo formado por *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrückii*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus cerevisiae*.
- 20 **14.** Procedimiento de conversión del ácido málico en ácido láctico según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que dicha preparación comprende una o varias cepas de bacterias malolácticas seleccionadas del grupo compuesto por *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2924 y *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M.
- 25 **15.** Procedimiento según la reivindicación 14, en el que una preparación de bacterias malolácticas que comprende *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2924 se añade a un vino con un pH superior o igual a 3,9 cuya concentración de alcohol es superior al 11%.
- 30 **16.** Procedimiento según la reivindicación 14, en el que una preparación de bacterias malolácticas que comprende *Pediococcus acidilactici* CNCM MA-18/5M se añade a un vino con un pH superior o igual a 3,7 cuya concentración de alcohol es superior al 12%.

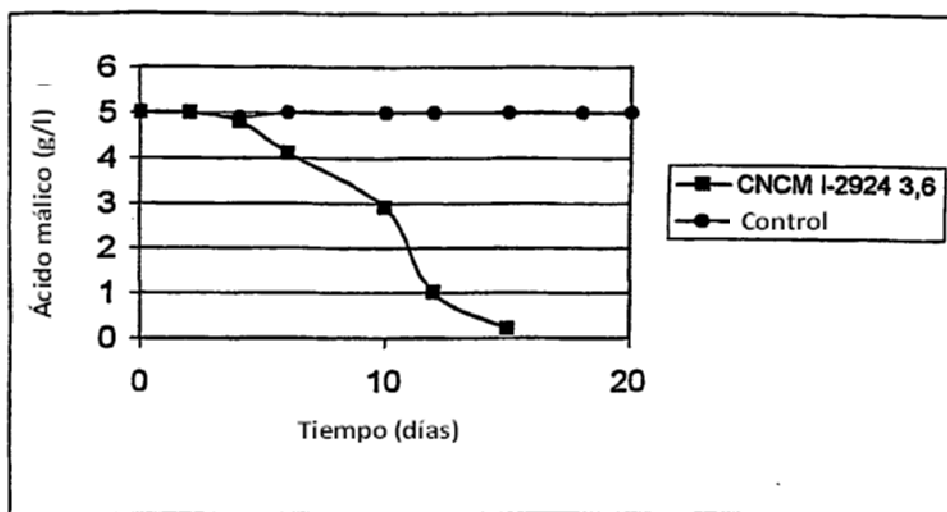


FIGURA 1

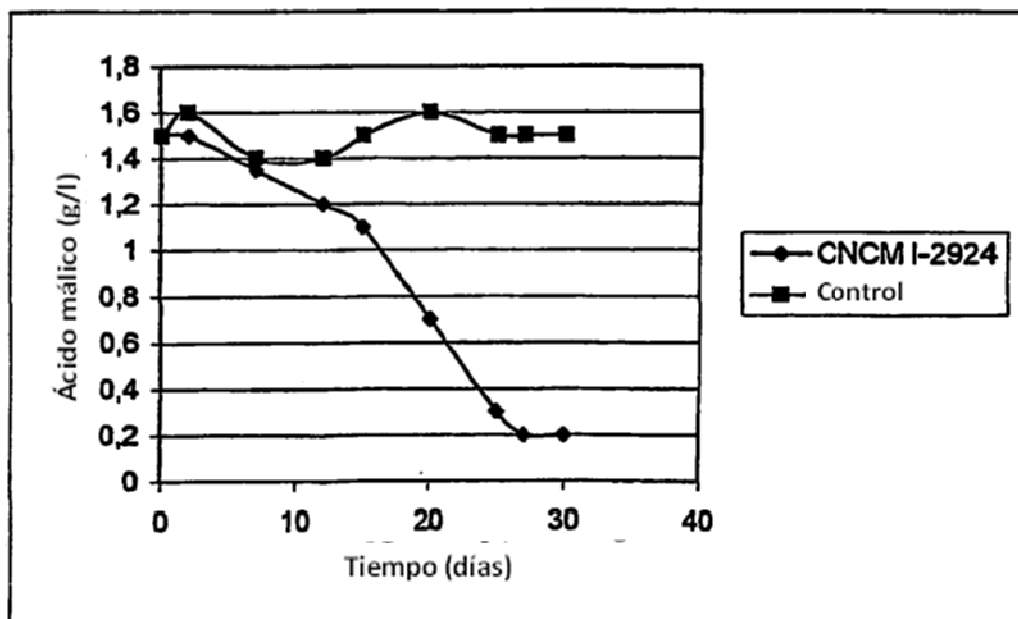


FIGURA 2

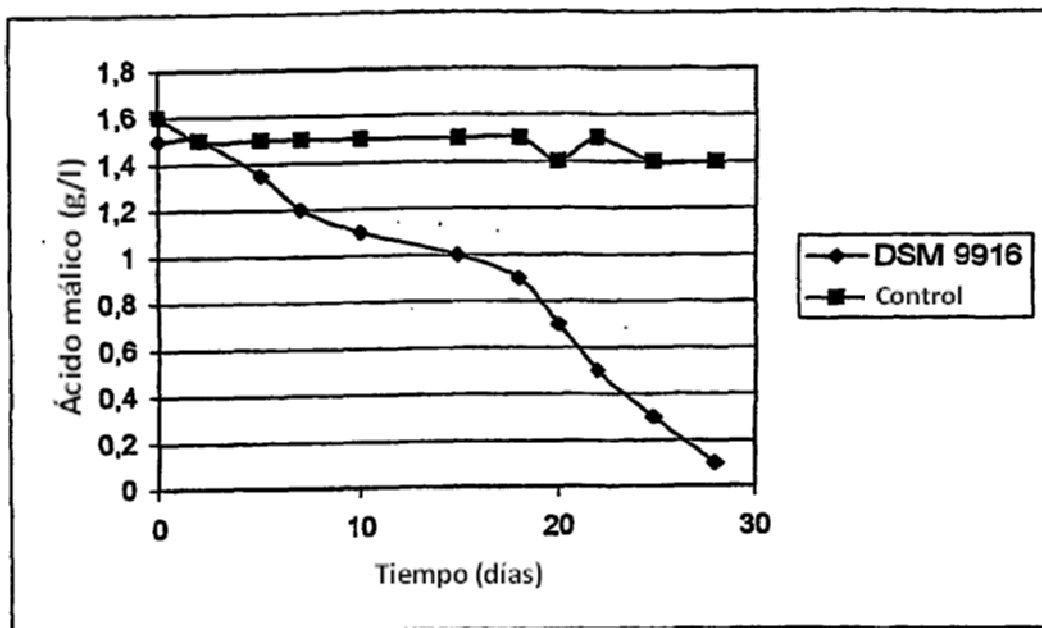


FIGURA 3

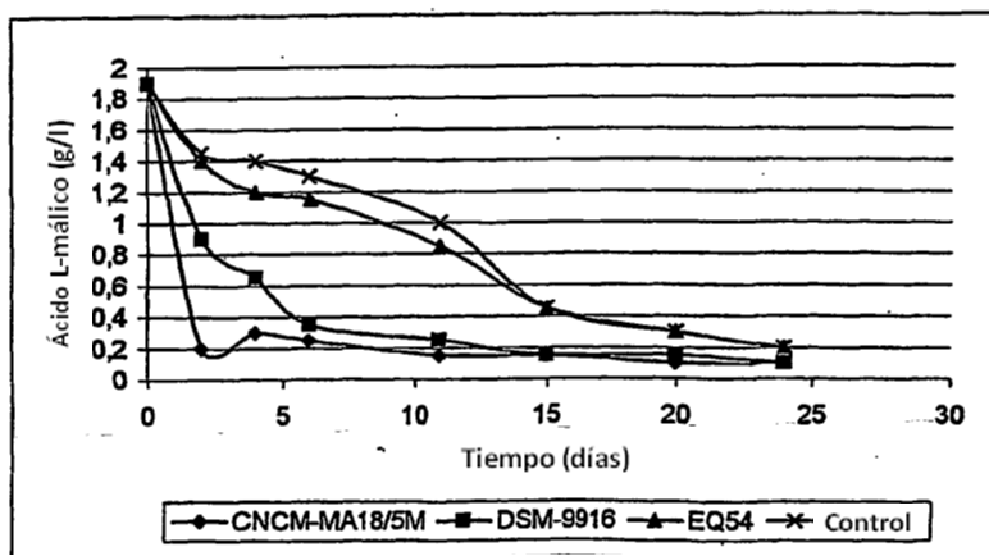


FIGURA 4

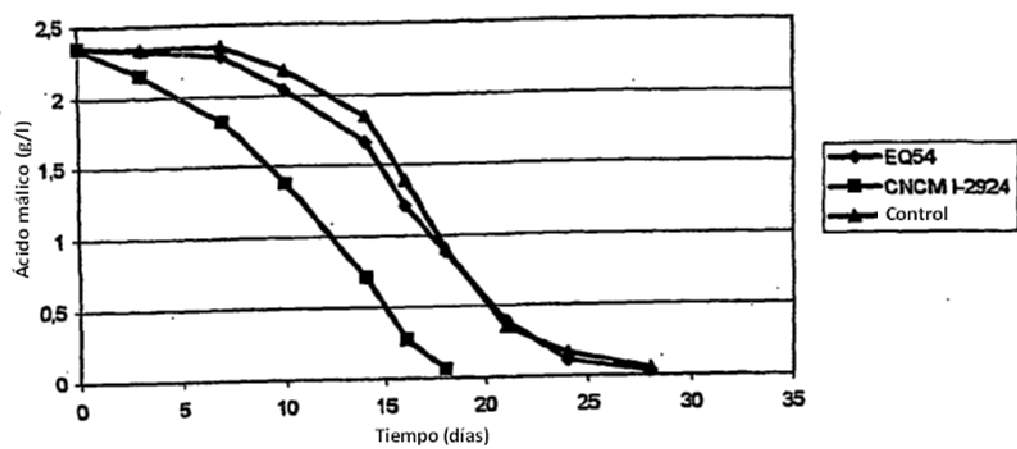


FIGURA 5

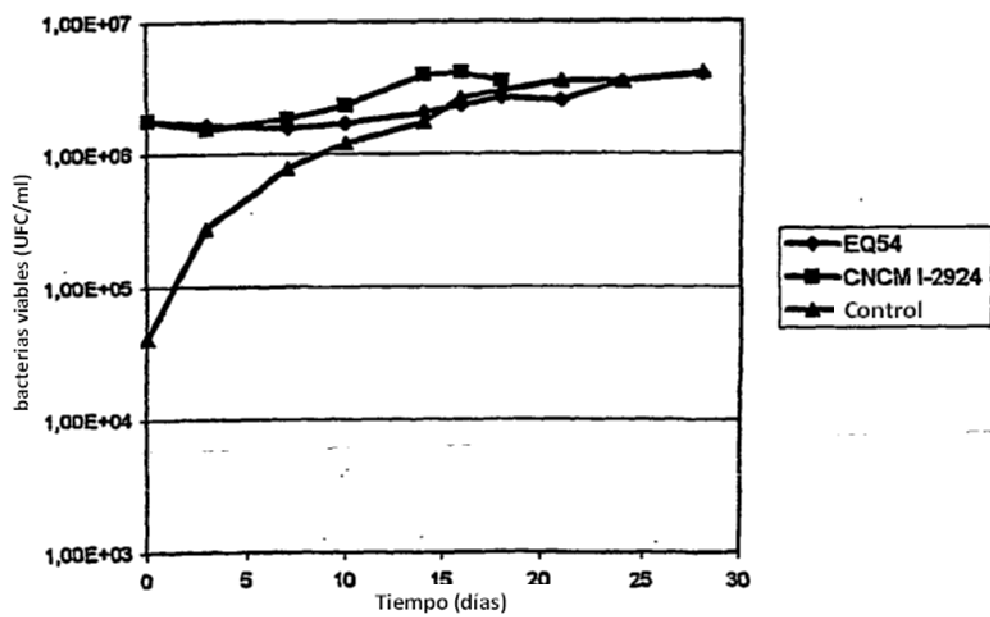


FIGURA 6