

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 193**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/16** (2006.01)

**C12P 11/00** (2006.01)

**C12G 1/022** (2006.01)

**C12R 1/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2009 E 09717572 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2268791**

54 Título: **Cepas de levadura y métodos de utilización de las mismas**

30 Prioridad:

**07.03.2008 NZ 56651808**

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

**11.03.2015**

73 Titular/es:

**AUCKLAND UNISERVICES LIMITED (100.0%)  
Level 10, 70 Symonds Street  
Auckland, NZ**

72 Inventor/es:

**GODDARD, MATTHEW ROBERT;  
GARDNER, RICHARD CLAGUE y  
ANFANG, NICOLE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 531 193 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 de levadura y métodos de utilización de las mismas

## 5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a cepas de levadura como depositadas en el *National Measurement Institute* bajo el número de registro V06/022711 o V06/022712. La invención también se refiere a métodos de fermentación que utilizan las cepas de levadura de la invención tanto aisladas como en combinación con otras cepas de levadura. La descripción divulga además métodos para la selección de cepas de levadura adecuadas para cultivos de fermentación a través de la detección de varios productos metabólicos y del uso de fuentes de nutrientes específicas.

[0002] La invención ha sido desarrollada principalmente para el uso en la fermentación de zumo de uva y en métodos para la producción de vino, y se describirá de ahora en adelante con referencia a esta aplicación. No obstante, ha de reconocerse que la invención no se limita a este campo de utilización específico y que la invención puede ser útil en otros procesos de fermentación.

## Antecedentes

[0003] Cualquier discusión de la técnica anterior a lo largo de la especificación no debe de ninguna manera considerarse una admisión de que tal técnica anterior es muy conocida o forma parte del conocimiento general común en el campo.

[0004] La fermentación es un proceso donde las levaduras metabolizan los azúcares simples en la fruta o el material vegetal principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono. Este proceso está implicado en la producción de una variedad de productos comestibles tales como pan, cerveza, vino, bebidas alcohólicas, quesos madurados blandos y vinagre y también en la producción de biocombustibles, vitaminas, y enzimas.

[0005] El vino es un producto que es en parte producido por la fermentación alcohólica del zumo de uva por parte de las levaduras. Las cepas de levadura presentes en el proceso de fermentación metabolizan los carbohidratos del zumo de uva en etanol y dióxido de carbono. No obstante, estos componentes contribuyen relativamente poco para el sabor global del vino. El aroma y las características de sabor del vino resultan de un gran número de compuestos, incluyendo ácidos volátiles y compuestos carbonilos, de los cuales 400 han sido identificados como producidos por levaduras durante el proceso de fermentación (Nykanen, 1986).

[0006] La fermentación puede ocurrir espontáneamente, cuando el conjunto de microbios presentes naturalmente lleva a cabo la fermentación; alternativamente un vinicultor puede deliberadamente inocular el zumo de uva con un cultivo grande de una levadura para vino conocida disponible comercialmente. Las principales levaduras usadas para inocular zumos de uva son las varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0007] Las etapas iniciales de la fermentación espontánea de vino implican generalmente el crecimiento de levaduras no-*Saccharomyces*, que presentan propiedades fermentativas bajas y prosperan en un ambiente con un nivel de alcohol bajo. Estas levaduras incluyen *Hanseniaspora (Kloeckera)* y *Candida* (por ejemplo *Candida stellata*, *C pulcherrima*) (Heard y Fleet, 1986) así como otras especies. En el caso espontáneo, la fermentación implica la interacción secuencial de una variedad de géneros y especies de levadura (Heard y Fleet, 1988).

[0008] La sensibilidad de las levaduras *no-saccharomyces* a ambientes con más de 5% de etanol significa que su crecimiento está normalmente limitado a los primeros 2 a 3 días de fermentación del vino, después de los cuales la levadura *Saccharomyces* tolerante al etanol se torna dominante. Es importante destacar que las cepas *no-Saccharomyces* pueden influir significativamente en la fermentación ya que pueden alcanzar poblaciones de  $10^6$ - $10^7$  células/ml (Lema et al., 1996). Esta influencia incluye la producción de una gama amplia de productos volátiles y no volátiles tales como ácidos orgánicos, alcoholes volátiles y ésteres que contribuyen significativamente al aroma y características de sabor del vino (Rapp y Versini, 1991; Esteve-Zarzoso et al., 1998). La naturaleza y concentraciones de estos "compuestos de sabor" se determinan por el género y especies de levaduras presentes en la fermentación (Houtman et al., 1980; Lambrechts y Pretorius, 2000; Brandolini et al., 2002; Ramano et al., 2003). Hay un conjunto creciente de trabajos que examinan la contribución de especies *no-saccharomyces* al sabor y aroma del vino (Esteve-Zarzoso et al., 1998). Algunos de estos trabajos muestran que fermentaciones con especies mezcladas producen niveles inesperadamente altos de algunos compuestos activos de sabor incluyendo, por ejemplo, ésteres (Garde-Cerdan y Ancin-Azpilicueta, 2006; Rojas et al., 2003) y 2,3-butanodiol (Clemente-Jimenez et al., 2004).

[0009] Los tioles volátiles son una familia de compuestos de sabor que pueden encontrarse en el vino (Gachons et al., 2000). Se incluyen, por ejemplo, 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP), 4-mercapto-4-metilpentan-2-ol (4MMPOH), 3-

mercaptoexan-1-ol (3MH) y acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA). Algunos de estos tioles, por ejemplo 3MH y 3MHA, tienen aromas y sabores distintivos similares al del pomelo y a la de la fruta de la pasión (Tominaga et al., 1998a).

5 [0010] Se encuentra frecuentemente 3MH y 3MHA en vinos *Sauvignon Blanc* (SB) en concentraciones superiores al umbral sensorial humano. Se encuentra un precursor conjugado de cisteína, no volátil, insípido del 3MH, la S-3-(hexan-1-ol)-cisteína, en zumo de uva SB, y durante la fermentación este precursor es potencialmente clivado para liberar 3MH, que es posteriormente convertido en 3MHA (Gachons et al., 2000). Se piensa que las enzimas necesarias para el procesamiento de estos precursores derivan de levaduras, y la conversión requiere crecimiento activo de la levadura (Tominaga et al., 1998b). Las enzimas implicadas son posiblemente alguna forma de  $\beta$ -liasa y de Acetiltransferasa respectivamente. Una publicación sugirió que existen múltiples genes de levadura que codifican las enzimas  $\beta$ -liasa (Howell et al., 2005). No obstante, científicos en dos laboratorios, incluyendo los presentes inventores, han sido incapaces de repetir estos resultados. Hasta la fecha, consideramos que no han sido publicados datos sólidos que muestran los precursores, enzimas o vías responsables por la liberación de tioles.

15 [0011] Chr Hansen (Dinamarca) produce cuatro fermentos de levadura disponibles comercialmente que incluyen mezclas de diferentes especies de levadura que se llaman *Harmony*, *Symphony*, *Rhythm*, y *Melody*. Las especies de levadura incluidas en estas mezclas son *S. cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* y *Kluyveromyces thermotolerans*. Se ha relatado que las mezclas producen vinos con un perfil de sabor alterado pero no ha habido ninguna sugerencia de que el perfil de sabor está relacionado con la presencia, mezcla o concentración de tioles.

20 [0012] King et al. relata que ciertas cepas de *Saccharomyces* aisladas o en combinación producen 4MMP, 3MH y 3MHA (King et al., J. Agric. Food Chem.; 2008,56,10829-10837).

25 [0013] Ningún estudio ha examinado los efectos de las especies *no-Saccharomyces* en el nivel de tioles volátiles en el vino o los efectos de las mezclas de especies de levadura en la producción de tiorol o en el sabor del vino. Somos conscientes de solamente un estudio donde se midió el efecto de una especie de *Saccharomyces* en el nivel de tioles volátiles en el vino. Esto estaba en relación con la medición de la cantidad de 4MMP producido por la *Saccharomyces cerevisiae* en el vino (Howell et al. 2004).

30 [0014] Es muy deseable que se comprendan los procesos biológicos que controlan la presencia y cantidad de compuestos en un proceso de fermentación. En particular, ser capaz de regular la cantidad y el tipo de tioles en el vino sería muy beneficioso para los vinicultores.

35 [0015] La regulación de la cantidad de tioles, y en particular de 3MH y 3MHA, en el vino permitiría el desarrollo de nuevas tecnologías que permitirían que los vinicultores alteraran con más precisión las cantidades de estos compuestos de sabor distintivos en su producto. Tal tecnología tendría, por lo tanto, un valor comercial significativo.

[0016] Es un objetivo de la presente invención superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior, o proporcionar una alternativa útil.

40 Resumen de invención

45 [0017] Se ha descubierto de forma imprevista que determinadas cepas de levadura tienen propiedades ventajosas útiles en el proceso de fermentación. En particular, las cepas de levadura pueden combinarse con otra levadura en un proceso de fermentación para producir un efecto sinérgico - es decir, la producción de niveles de tioles más elevados en el producto de fermentación. Más específicamente, las levaduras pueden utilizarse para producir niveles más elevados de 3MH y 3MHA en el vino. Además, determinadas cepas nuevas que producen niveles de tioles más elevados en el proceso de fermentación son capaces de acceder a una fuente de nitrógeno y carbono normalmente no accesible a levaduras de su especie en las fermentaciones, específicamente la prolina.

50 [0018] Los inventores descubrieron sorprendentemente que, por ejemplo, las cepas de levadura nombradas PK-KR1 y PK-KR2 (dos cepas nuevas de *Pichia kluyveri*), interactúan sinérgicamente con cepas de levadura disponibles comercialmente para producir niveles elevados de tioles volátiles en cultivos de fermentación de vino. En una fermentación las cantidades relativamente limitantes de nitrógeno disponibles para las levaduras pueden afectar crucialmente el proceso de fermentación y los subproductos producidos por la levaduras. Además descubrieron sorprendentemente que cepas de levadura específicas son capaces de utilizar fuentes de nutrientes no disponibles para preparaciones de *S. cerevisiae* en un cultivo de fermentación. Por ejemplo, la cepa PK-KR1 tiene una mayor propensión que la *S. cerevisiae* para utilizar la L-prolina como una fuente tanto de nitrógeno como de carbono. La prolina es uno de los aminoácidos más abundantes en el zumo de uva pero la *S. cerevisiae* no lo utiliza. Así, el uso de la PK-KR1 no solo altera de forma imprevista el sabor final y el aroma del vino sino también alivia la competencia entre la PK-KR1 y las preparaciones comerciales de *S. cerevisiae* por nutrientes relativamente limitantes (nitrógeno) durante la fermentación.

- [0019] Como tal, la presente invención se refiere a cepas de levadura, fermentos de levadura y métodos de fermentación que permiten una mayor producción de tioles.
- 5 [0020] Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una cepa de levadura aislada como depositada en el *National Measurement Institute* bajo el número de registro V06/022711 o V06/022712 o un equivalente funcional de la misma como definido en el presente documento. Estos aislados fueron depositados bajo los nombres JT1.28 y JT3.71, respectivamente para PK-KR1 y PK-KR2.
- 10 [0021] La descripción divulga una cepa de levadura aislada que comprende una secuencia nucleótida de separador transcrito interno ribosómico nuclear (ITS) 1 -5.8S-ITS2 según cualquier de los SEC ID n.º: 5 o 6.
- [0022] La descripción divulga una cepa de levadura aislada que comprende una secuencia nucleótida de dominio divergente 1 y 2 (D1/2) 26S de ADNr según los SEC ID n.º: 7 o 8.
- 15 [0023] Según otro aspecto, la presente invención proporciona un método de fermentación que comprende el uso de una cepa de levadura según el primer aspecto.
- [0024] Las cepas de levadura de la presente invención pueden utilizarse con una o otras más cepas de levadura en un proceso de fermentación para producir un aumento sinérgico en la producción de tiol.
- 20 [0025] Según otro aspecto, la presente invención proporciona un método de fermentación que comprende el uso de una primera cepa de levadura según el primer aspecto.
- [0026] Preferiblemente, el producto de fermentación es una bebida alcohólica. Más preferiblemente, la bebida alcohólica es vino. Todavía más preferiblemente el vino es vino blanco. En particular, el vino blanco se produce de uvas de la variedad *sauvignon blanc*.
- 25 [0027] Una de las cepas de levadura es una cepa *no-Saccharomyces*, y pertenece al género *Pichia* específicamente a la especie *Pichia kluyveri*. Dicha cepa de levadura es la cepa depositada en el *National Measurement Institute* bajo el número de registro V06/022711 o V06/022712.
- 30 [0028] Preferiblemente, una de las cepas de levadura es una cepa *Saccharomyces*. Más preferiblemente, la cepa *Saccharomyces* es una cepa comúnmente disponible seleccionada de VL3, VIN 7, X5 o ' Merit' como se describe en el presente documento.
- 35 [0029] Estará claro para el destinatario experto que el tiol puede ser cualquier tiol o cualquier combinación de tioles. Los tioles son preferiblemente volátiles. En una forma de realización preferida, el tiol es acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA) y en otra forma de realización preferida, el tiol es 3-mercaptoexan-1-ol (3MH).
- 40 [0030] También estará claro para el destinatario experto que la primera y segunda cepa de levadura pueden añadirse a una fermentación simultáneamente o consecutivamente.
- [0031] Según otro aspecto, la presente invención proporciona un fermento de levadura que comprende al menos dos cepas de levadura que producen un aumento sinérgico en el tiol en un producto de fermentación, donde una cepa de levadura es una cepa de levadura depositada en el *National Measurement Institute* bajo el número de registro V06/022711 o V06/022712.
- 45 [0032] Preferiblemente, una cepa de levadura es una cepa *no-Saccharomyces*.
- 50 [0033] En una forma de realización, la cepa *no-saccharomyces* comprende una concentración total de levaduras presentes en el fermento superior a 10%. Preferiblemente, la concentración total de levaduras presentes en el fermento es  $2,5 \times 10^6$  células por  $\text{ml}^{-1}$ . En otra forma de realización, la cepa *no-saccharomyces* comprende una concentración total de levaduras presentes en el fermento superior a 20%. En otra forma de realización, la cepa *no-saccharomyces* comprende una concentración total de levaduras presentes en el fermento superior a 30%. En otra forma de realización, la cepa *no-saccharomyces* comprende una concentración total de levaduras presentes en el fermento superior a 40%. En otra forma de realización, la cepa *no-saccharomyces* comprende una concentración total de levaduras presentes en el fermento superior a 50%. En otra forma de realización, la cepa *no-saccharomyces* comprende una concentración total de levaduras presentes en el fermento superior a 60%. En otra forma de realización, la cepa *no-saccharomyces* comprende una concentración total de levaduras presentes en el fermento superior a 70%. En otra forma de realización, la cepa *no-saccharomyces* comprende una concentración total de levaduras presentes en el fermento superior a 80%. En otra forma de realización, la cepa *no-*
- 55
- 60

*saccharomyces* comprende una concentración total de levaduras presentes en el fermento superior a 90%. En otra forma de realización, la cepa *no-saccharomyces* comprende una concentración total de levaduras presentes en el fermento superior a 90%.

5 [0034] En otra forma de realización, la concentración total de levaduras presentes en el fermento excede  $2,5 \times 10^6$  células por  $\text{ml}^{-1}$ . La cepa *no-saccharomyces* es la levadura depositada en el *National Measurement Institute* bajo el número de registro V06/022711 o V06/022712. En una forma de realización, el tiol aumentado sinérgicamente en el producto de fermentación es el 3MHA y en una forma de realización alternativa el tiol aumentado sinérgicamente en el producto de fermentación es el 3MH. Estará claro para el destinatario experto, por supuesto, que puede haber un aumento sinérgico en más de un tiol.

10 [0035] Según otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un producto de fermentación que comprende el uso del fermento según la invención donde dicho método comprende el paso de añadir dicho fermento a un cultivo de fermentación. Preferiblemente, el producto de fermentación es una bebida alcohólica y más preferiblemente la bebida alcohólica es el vino.

15 [0036] La presente descripción divulga una bebida preparada según el método de la invención. Preferiblemente, la bebida es alcohólica y más preferiblemente es el vino. Todavía más preferiblemente, el vino es vino blanco. En particular, el vino blanco se produce usando uvas de la variedad *sauvignon blanc*.

20 [0037] También ha sido descubierto de forma imprevista que los nuevos aislados de levadura, por ejemplo PK-KR1, son capaces de utilizar nuevas fuentes de nitrógeno y carbono en cultivos de fermentación.

25 [0038] La presente descripción divulga un método de fermentación que comprende el uso de una cepa de levadura donde dicho método comprende el paso de añadir dicha cepa de levadura a un cultivo de fermentación y dicha cepa de levadura es capaz de obtener nitrógeno y/o carbono de un aminoácido bajo condiciones de fermentación. Preferiblemente, el aminoácido es la prolina.

30 [0039] La presente descripción divulga un método de fermentación donde dicho método comprende el paso de añadir prolina a un cultivo de fermentación donde dicha prolina es una fuente de nitrógeno y/o carbono para una cepa de levadura en dicho cultivo de fermentación.

35 [0040] La presente descripción divulga un método de fermentación que comprende el uso de dos cepas de levadura donde dicho método comprende el paso de añadir dichas cepas a un cultivo de fermentación y cada una de las dichas cepas son capaces de obtener nitrógeno y/o carbono de diferentes fuentes.

40 [0041] La presente descripción divulga un método de selección de una levadura para un cultivo de fermentación dicho método comprende el paso de añadir una cepa de levadura a un cultivo de fermentación cuya fuente sustancialmente única de nitrógeno es la prolina y el paso de aislar una cepa de levadura de dicho cultivo que presenta la capacidad de obtener nitrógeno de la prolina.

45 [0042] La presente descripción divulga un método de fermentación que comprende el uso de una cepa de levadura dicho método comprende el paso de añadir una cepa de levadura a un cultivo de fermentación y donde dicha cepa de levadura no usa glucosa ni fructosa como su única o sustancialmente única fuente de carbono.

50 [0043] Según otro aspecto, la presente invención proporciona un método de mejora del sabor en un producto de fermentación, dicho método comprende el uso de una cepa de levadura según la reivindicación 1 o un fermento de levadura según la reivindicación 3 en un cultivo de fermentación dicho método comprende el paso de añadir dicha cepa de levadura o dicho fermento a un cultivo de fermentación.

55 [0044] El término, "equivalente funcional de la misma" en la medida en que se refiere al equivalente funcional de una cepa de levadura descrita o definida en la presente aplicación, se refiere a la capacidad de la cepa de levadura de interactuar con al menos otra cepa de levadura para producir un aumento sinérgico en la cantidad de tiol en un producto de fermentación. Además, el término "equivalente funcional de la misma" se refiere a una cepa de levadura capaz de acceder a una fuente de nitrógeno y/o carbono en los cultivos de fermentación normalmente no accesible a las levaduras de su especie.

60 [0045] En el contexto de la presente invención, un "aumento sinérgico" en la medida en que se refiere a la cantidad de tiol en un producto de fermentación significa un aumento en la cantidad de tiol en un producto de fermentación producido por dos cepas de levadura, que excede la suma de tiol producido en un producto de fermentación por cualquiera de las cepas solas.

[0046] En el contexto de la presente invención, el término "producto de fermentación" incluye cualquier producto de un proceso de fermentación incluyendo productos sólidos, líquidos o gaseoso.

5 [0047] En el contexto de la presente invención el término " cepa " en la medida en que se refiere a levadura se refiere a una potencial variante genética o subtipo dentro de una especie; por ejemplo, un aislado de una especie de una época en particular, o un aislado que se puede demostrar que difiere de otros miembros de las mismas especies al nivel del nucleótido.

10 [0048] En el contexto de la presente invención el término "fermentación" se refiere a un proceso donde la levadura metaboliza los azúcares simples en la fruta o la material vegetal principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono.

[0049] En el contexto de la presente invención, los términos "comprende", "comprendiendo" y similares deben interpretarse en su sentido inclusivo es decir en el sentido de "incluyendo pero no limitado a" en lugar de en su sentido exhaustivo.

15 Breve descripción de las Figuras

[0050]

20 Figura 1: Alineamientos de homología de la secuencia nucleótida del área PK-KR1 D1/D2 del gen ribosomal 26S con la cepa del tipo *Pichia kluyveri*.

Secuencia superior = Cepa del tipo *P. kluyveri* (CBS 188), número de registro U75727

Secuencia inferior = PK-KR1

Figura 2: Alineamientos de homología de la secuencia nucleótida del área ITS PK-KR1 con la misma área de la cepa del tipo *Pichia kluyveri*.

25 Secuencia superior = Cepa del tipo *P. kluyveri* (CBS188), número de registro DQ104711

Secuencia inferior = PK-KR1

Figura 3: Alineamientos de homología de la secuencia nucleótida del área PK-KR2 D1/2 del gen ribosomal 26S con la misma área de la cepa del tipo *Pichia kluyveri*.

30 Secuencia superior = Cepa del tipo *P. kluyveri* (CBS188), número de registro U75727

Secuencia inferior = PK-KR2

Figura 4: Alineamientos de homología de la secuencia nucleótida del área ITS PK-KR2 con la misma área de la cepa del tipo *Pichia kluyveri*.

35 Secuencia superior = Cepa del tipo *P. kluyveri* (CBS188), número de registro DQ104711

Secuencia inferior = PK-KR2

Figura 5: Un gráfico de barras que presenta la concentración de 3MHA producida en fermentaciones simples y mixtas que contienen cepas de levadura VL3 y PK-KR1 en proporciones de: 10:90, 50:50 y 90:10.

Figura 6: Un gráfico de barras que presenta la concentración de 3MHA producida en fermentaciones simples y mixtas que contienen cepas de levadura VL3 y PK-KR2 en proporciones de: 10:90, 50:50 y 90:10.

40 Figura 7: Un gráfico de barras que presenta la concentración de 3MH producida en fermentaciones simples y mixtas que contienen cepas de levadura VL3 y PK-KR1 en proporciones de: 10:90, 50:50 y 90:10.

Figura 8: Un gráfico de barras que presenta la concentración de 3MH producida en fermentaciones simples y mixtas que contienen cepas de levadura VL3 y PK-KR2 en proporciones de: 10:90, 50:50 y 90:10.

45 Figura 9: Un gráfico de barras que combina los datos presentados en la Figuras 5 y 6 que muestran la concentración de 3MHA producido en fermentaciones simples y mixtas que contienen cepas de levadura VL3, PK-KR1, PK-KR2, y combinadas de la siguiente manera: VL3: PK-KR1; VL3: PK-KR2; en proporciones de 10:90, 50:50 y 90:10.

Figura 10: Un gráfico de barras que combina los datos presentados en las Figuras 7 y 8 que muestran la concentración de 3MH producido en fermentaciones simples y mixtas que contienen cepas de levadura VL3, PK-KR1, PK-KR2, y combinadas de la siguiente manera: VL3: PK-KR1; VL3: PK-KR2; en proporciones de 10:90, 50:50 y 90:10.

50 Figura 11: Un gráfico de barras que presenta la concentración de 3MHA (utilizando un patrón interno deuterado) en fermentaciones simples y mixtas de PK-KR1 y VL3.

Figura 12: Un gráfico de barras que presenta la concentración de 3MH (utilizando un patrón interno deuterado) en fermentaciones simples y mixtas de PK-KR1 y VL3.

55 Figura 13a: Un gráfico de barras que muestra la concentración de 3MHA producido en fermentaciones simples y mixtas (temperatura de fermentación 14 °C) con PK-KR1 y una variedad de cepas comerciales para vino VL3, EC1118, VIN7, X5, QA23 y SVG. Cantidad de 3MHA (a) y 3MH (b) (media ± error típico de la media; n=3) producido por un conjunto de levaduras comerciales para vino en fermentaciones simples y co-fermentaciones a 14 °C con PK-KR1. Las co-fermentaciones fueron todas iniciadas a 10:90 *S.cerevisiae*: PK-KR1. Los niveles de 3MHA en co-fermentaciones PK-KR1 con VL3, VIN7 y X5 son todos significativamente más elevados en comparación con las respectivas fermentaciones simples VL3, VIN7 y X5 (p<0,01).

Figura 13b: Un gráfico de barras que presenta la concentración de 3MH producida en fermentaciones simples y mixtas (temperatura de fermentación 14 °C) con PK-KR1 y una variedad de cepas comerciales para vinos VL3, EC1118, VIN7, X5, QA23 y SVG.

Figura 14: Un gráfico de barras que presenta la concentración de 3MHA y 3MH producida en fermentaciones mixtas de 5 litros (temperatura de fermentación 14°C) con PK-KR1, PK-KR2 y VIN7. Los niveles de 3MHA y 3MH están en  $\text{ng l}^{-1}$ ; Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes según una prueba T ( $P>0,05$ ).

Los niveles de 3MHA y 3MH del experimento de fermentación mixta de cinco litros están en  $\text{ng l}^{-1}$ ; los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes según una prueba T ( $P>0,05$ ).

Figura 15: Los números de células estimados por unidades formadoras de colonias de VL3 y PK-KR1 en fermentaciones simples y co-fermentaciones en el zumo de *Sauvignon blanc*. Números de células estimadas por unidades formadoras de colonias de VL3 y PK-KR1 en fermentaciones únicas (triángulos rellenos y círculos respectivamente) y co-fermentaciones (triángulos y círculos no rellenos respectivamente) a 14 °C. La co-fermentación fue inoculada con una proporción 10:90 de VL3/PK-KR1. media  $\pm$  error típico de la media; n=6.

Figura 16: Uso de nutrientes durante las fermentaciones simples y mixtas, (a) nitrógeno disponible para la levadura (YAN), y (b) uso de glucosa de y fructosa por parte de la PK-KR1 y VL3 durante fermentaciones simples y mixtas.

a) Cambios en la cantidad de nitrógeno disponible para la levadura (YAN) durante fermentaciones únicas VL3 (triángulo relleno) y co-fermentaciones (triángulo no relleno) respectivamente y fermentaciones únicas PK-KR1 (círculo relleno) a 14 °C. La co-fermentación fue iniciada a una proporción 10:90 VL3 para PK-KR1. Control, zumo de uva estéril no inoculado (cuadrados no rellenos), media  $\pm$  error típico de la media; n=3.

b) Cambio en la cantidad total de glucosa y fructosa durante las fermentaciones simples (triángulo relleno) y co-fermentaciones (triángulo no relleno) VL3 respectivamente y fermentación simples PK-KR1 (círculo relleno) a 14 °C. La co-fermentación fue iniciada a proporción 10:90 VL3 para PK-KR1. Control, zumo de uva estéril no inoculado (cuadrados no rellenos), media  $\pm$  error típico de la media; n=3.

Figura 17: El crecimiento de PK-KR1 y VL3 en medios donde la prolina es la única fuente de nitrógeno bajo condiciones de fermentación. El crecimiento de VL3 (triángulos) y PK-KR1 (círculos) durante las condiciones de fermentación a 14 °C en un medio de base nitrogenada para levadura definido (YNB) donde la prolina era la única fuente de nitrógeno. media  $\pm$  error típico de la media; n=6.

Figura 18: El crecimiento de PK-KR1 bajo condiciones de fermentación después de ser privada de carbono y nitrógeno en medios donde la prolina es la única fuente de nitrógeno.

[0051] Crecimiento de PK-KR1 (después de ser privado de carbono y nitrógeno) solamente en un medio de base nitrogenada para levadura (YNB) (por lo tanto no se ha suministrado ninguna fuente de carbono o nitrógeno), y un medio idéntico excepto que se añadió prolina.

Descripción de la invención

[0052] La presente invención se refiere a cepas de levadura y, en particular, a cepas de levadura para uso en procesos de fermentación.

[0053] La invención se refiere a las cepas de levadura PK-KR1 y PK-KR2 depositadas bajo los nombres JT1.28 y JT 3.71 en el *National Measurement Institute*, 51-65 Clarke Street, South Melbourne Victoria 3205, bajo los números de registro V06/022711 y V06/022712 respectivamente.

[0054] Los vinos SB producidos por ejemplo en la región Marlborough de la Isla Sur en Nueva Zelanda tienen perfiles de sabor muy distintivos. Este estilo distintivo coloca estos vinos en una posición fuerte en el mercado vinícola internacional. Por consiguiente, las levaduras implicadas en la mejora del aroma y/o sabor de estos vinos son valiosas a nivel comercial.

[0055] La invención también se refiere a métodos de fermentación que utilizan las cepas de levadura como se ha definido anteriormente tanto aisladas como en combinación con otras.

[0056] La descripción describe además métodos para rastrear y aislar cepas de levadura adecuadas para cultivos de fermentación y en particular levaduras que mejoran una o varias características del vino tales como el sabor y/o aroma.

[0057] Preferiblemente, el método de selección comprende inocular un cultivo o medio de fermentación o varios cultivos o medios de fermentación con una cepa de levadura o varias cepas de levadura. Preferiblemente el cultivo o medio contiene una fuente preseleccionada sustancialmente única de carbono y/o nitrógeno. Preferiblemente la fuente de carbono y/o nitrógeno es la prolina. El método comprende además incubar la fermentación o cultivo inoculado a una temperatura adecuada para el crecimiento de la levadura y monitorizar el crecimiento de la levadura a lo largo de un periodo de tiempo. El método comprende además la identificación y aislamiento de una cepa de levadura o cepas de levadura capaces de usar la fuente preseleccionada sustancialmente única de carbono y/o nitrógeno como una fuente de nutrientes.

[0058] El nitrógeno es normalmente un recurso esencial limitante para las levaduras en el zumo de uva - los niveles relativamente bajos de nitrógeno pueden adulterar el crecimiento de la levadura y la fermentación y posiblemente llevar a problemas de fermentación (paradas de fermentación por ejemplo) (Ribereau-Gayon et al. 2006). De las fuentes de nitrógeno presentes en el zumo de uva, las levaduras utilizan el amoníaco primero, y después los aminoácidos. La prolina es normalmente uno de los aminoácidos más abundantes en el zumo de uva (Ough y Stashak 1974; Spayd y Andersen-Bagge 1996). No obstante, la *S. cerevisiae* es incapaz de utilizar la prolina bajo condiciones anaeróbicas (La enzima PUT1 en la vía de degradación de la *S. cerevisiae* requiere O<sub>2</sub>; Ingledew et al. 1987). En este sentido, una fuente importante de nitrógeno no está disponible para la *S. cerevisiae* durante la fermentación - si las levaduras fueran capaces de utilizar de alguna forma la prolina como fuente de nitrógeno y carbono, los problemas que ocurren durante la fermentación podrían ser aliviados, por ejemplo los vinicultores no necesitarían añadir artificialmente fuentes de nitrógeno. Además, de una perspectiva de co-fermentación *no-saccharomyces*, un compañero de co-fermentación que no compete directamente por recursos de nitrógeno limitados (por ser capaz de acceder a la prolina por ejemplo) sería ideal en aplicaciones comerciales, ya que no solo disminuiría la competencia con la *S. cerevisiae*, sino también desbloquearía el nitrógeno oculto en la prolina para que la *S. cerevisiae* la usara posteriormente.

[0059] Por consiguiente, la descripción divulga además cepas de levadura capaces de utilizar nuevas fuentes de nitrógeno y/o carbono en cultivos de fermentación.

[0060] Se describe la invención más detalladamente a través de los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento de las levaduras

[0061] Se aislaron dos cepas de levadura, designadas PK-KR1 y PK-KR2, de la fermentación natural del zumo de uva Chardonnay 2005 obtenido de *Mate's vineyard* en *Kumeu River Wines*, West Auckland como se describe a continuación. Las Figuras 5 a 18 presentan datos relativos a experimentos que se realizaron utilizando estas cepas y que se relatan en más detalle a continuación.

[0062] Se tomaron muestras de zumo en varias fases durante el proceso de fermentación las cuales se inocularon en los medios de malta acidulada para seleccionar las levaduras y evitar las bacterias (Johnson et al., 2004). Se extrajo ADN de colonias similares a levaduras aisladas usando protocolos bien conocido en la técnica y resina quelante Chelex-100 (Walsh et al., 1991). Se amplificó el separador transcrito interno (ITS) ribosómico nuclear 1,5.8S, y los dominios divergentes 1 y 2 (D1/D2) ITS2 y 26S de cada cepa usando cebadores específicos de los hongos (White et al., 1990, Kurtzman y Robnett 1998), a través de la reacción en cadena de la polimerasa usando métodos bien conocidos en la técnica. El destinatario experto entenderá que estas regiones del genoma de la levadura se analizan generalmente para identificar organismos al nivel de la especie (Leaw et al., 2006 y White et al., 1990, Kurtzman y Robnett 1998). Específicamente, se amplificó el separador transcrito interno (ITS) ribosómico nuclear 1,5.8S, y las secuencias ITS2 usando cebadores designados SEC ID n.º 1 y SEC ID n.º 2 y se amplificaron las secuencias de dominios divergentes 1 y 2 (D1/D2) 26S usando cebadores designados SEC ID n.º 3 y SEC ID n.º 4. Se secuenciaron ambas cadenas de los productos de ADN resultantes usando métodos bien conocidos en la técnica. Las secuencias de ADN ITS1-5.8S-ITS2 de las levaduras PK-KR1 y PK-KR2 son designadas SEC ID n.ºs: 5 y 6 respectivamente. Las secuencias de ADN 26S D1/2 de las levaduras PK-KR1 y PK-KR2 son designadas SEC ID n.ºs: 7 y 8, respectivamente.

[0063] Se analizaron las secuencias de ADN ITS1-5.8S-ITS2 y de dominio 1 y 2 26S de estas cepas utilizando la herramienta de búsqueda estándar BLAST disponible en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), de acuerdo con Kurtzman & Fell, (2006). Se presentan los alineamientos de homología de secuencia relevantes en las Figuras 1 a 4. El análisis indica que las levaduras aisladas son cepas nuevas de *Pichia kluyveri* como se detalla a continuación.

PK-KR1

El alineamiento de la región ITS de la PK-KR1 indicó un: 99% de identidad con DQ674358 (*Pichia fermentans*) y DQ104711 (*Pichia kluyveri*)

[0064] El alineamiento de la región 26S de la PK-KR1: indicó un 100% de identidad con EF564382.1 (*Pichia kluyveri*) Se alinearon también las secuencias de la PK-KR1 indicadas con las secuencias correspondientes U75727 y DQ104711 de *Pichia kluyveri*. Estos alineamientos se presentan en las Figuras 1 y 2 respectivamente.

PK-KR2



[0065] El alineamiento de la región ITS de la PK-KR2 indicó un 98% de identidad con AY027508.1/DQ104711.1 (*Pichia fermentans*/*Pichia kluyveri*)

El alineamiento de la región 26S de la PK-KR2 indicó un 99% de identidad con AJ746339.1(*Pichia kluyveri*)

[0066] Se alinearon también las secuencias de PK-KR2 indicadas anteriormente con las secuencias correspondientes U75727 y DQ104711 de *Pichia kluyveri*. Estos alineamientos se presentan en las Figuras 3 y 4

Conclusión - La PK-KR1 y PK-KR2 son dos cepas nuevas y diferentes de *Pichia kluyveri*

[0067]

Nuestro identificador	Mejor correspondencia a una especie
PK-KR1	<i>Pichia kluyveri</i>
PK-KR2	<i>Pichia kluyveri</i>

Micro fermentación con levaduras aisladas en cultivos simples y mixtos

[0068] Se efectuó la fermentación usando los aislados de levadura preparados en el ejemplo 1 y la cepa de levadura Zymaflore VL3 (Laffort). Esta es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* disponible comercialmente, aislada en Burdeos y vendida específicamente para la fermentación de vino.

[0069] Se llevaron a cabo las fermentaciones usando 200 ml de zumo de uva *Sauvignon Blanc* estéril de 2005 de Rapaura en Marlborough. Se esterilizó primero el zumo de uva usando DMDC (dicarbonato de dimetilo, C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>, PM: 134.09 g mol<sup>-1</sup>, CAS: 4525-33-1).

[0070] Se llevaron a cabo las fermentaciones usando una única cepa, y con varias proporciones en cuanto a pares de cepas como se indica en la Tabla 1 a continuación. Se cultivaron cada una de las especies de levadura durante 48 horas a 28 °C en un medio de laboratorio estándar para levaduras antes de inocular el zumo. De acuerdo con los protocolos de la industria vinícola, el zumo fue inoculado a una concentración inicial de 2,5x10<sup>6</sup> células de levadura por ml<sup>-1</sup>. Para referirse a la inoculación descrita se usan porcentajes, 100% corresponde a 2,5x10<sup>6</sup> células de levadura ml<sup>-1</sup>.

[0071] Se llevaron a cabo dos conjuntos independientes de fermentaciones. Se diseñó el primer conjunto de fermentaciones para investigar el efecto de las fermentaciones con especies mezcladas en las concentraciones de tiol. Las proporciones de levadura usadas en estas fermentaciones se encuentran resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1: Proporciones de inoculación de levadura en fermentaciones mixtas como un porcentaje de 2,5x10<sup>6</sup> células por ml<sup>-1</sup>

Cepa de levadura comercial	Carga de inoculación	Aislado de Levadura	Carga de inoculación
VL3	10%	PK-KR1	90%
VL3	50%	PK-KR1	50%
VL3	90%	PK-KR1	10%
VL3	10%	PK-KR2	90%
VL3	50%	PK-KR2	50%
VL3	90%	PK-KR2	10%

[0072] Se llevó a cabo un segundo conjunto de fermentaciones para investigar el efecto del tamaño del inóculo en la concentración final de tiol, y para corroborar los resultados de las fermentaciones iniciales con respecto a las fermentaciones mixtas de VL3 y PK-KR1. Se presenta el tamaño y la proporción de los inóculos de levadura en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2: Tamaño del inóculo como un porcentaje de 2,5x10<sup>6</sup> células ml<sup>-1</sup>

Cepa de levadura	Tamaño del inóculo
VL3	100%

VL3	50%
VL3	10%
VL3	5%
VL3	1%
VL3	0,5%
VL3	0,1%
PK-KR1	90%

Tabla 3: Proporciones de inoculación de levadura en fermentaciones mixtas como un porcentaje de  $2,5 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$

Cepa de levadura comercial	Carga de inoculación	Aislado de levadura	Carga de inoculación
VL3	100%	PK-KR1	90%
VL3	50%	PK-KR1	90%
VL3	10%	PK-KR1	90%
VL3	5%	PK-KR1	90%
VL3	1%	PK-KR1	90%
VL3	0,5%	PK-KR1	90%
VL3	0,1%	PK-KR1	90%

[0073] Se llevaron a cabo fermentaciones a 25 °C en matraces de Erlenmeyer de 250ml con una válvula de fermentación.

5 Se monitoreó el progreso de la fermentación a través de la pérdida de peso ya que esto corresponde aproximadamente al grado al cual los azúcares en el zumo fueron metabolizados en etanol y CO<sub>2</sub>. Después de una fermentación de siete días se centrifugó el contenido de los matraces a 6000 xg durante 10 min. para granular cualquier sólido. Enseguida se transfirió el sobrenadante a recipientes de muestras de 70ml que se almacenaron a -20 °C. Se realizaron todas las fermentaciones en triplicado.

10

Extracción y cuantificación de tiol

[0074] Se analizó la concentración de tiol en la fermentación líquida (vino) con base en el método de Tominaga et al. (Tominaga et al., 1998c), que requiere que se separe el tiol del vino a través de cromatografía y que seguidamente sea analizado usando cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) según procedimientos estándar. El método de cuantificación se basa en la comparación con una cantidad conocida de un patrón interno que se añadió al vino antes del procesamiento.

15

Separar el tiol del vino

20

[0075] Se añadió y mezcló con cada 50 ml de muestra de vino cinco ml de 1 mM Na-4-(hidroxi-mercuri)benzoato (pHMB), y 0,5 ml de 2 mM 0,1 M acetato de sodio, pH6, 0,02 mM Butilhidroxianisol (BHA), antes de añadir una mezcla de las formas deuteradas de 3MH y 3MHA. Se ajustó el pH a 7.

25

[0076] Las muestras fueron enseguida pasadas a través de una columna de resina Dowex y cualesquiera tioles presentes se unieron a la matriz en la columna. Enseguida se lavó la columna con 50 mL de BHA. Enseguida se eluyeron los tioles unidos con 50 ml de tampón de elución de cisteína (0,1 M acetato de sodio, 0,02 mM BHA, 400mg de cisteína HCL, ajustados a pH6).

30

[0077] Se extrajeron los tioles en la solución eluida usando diclorometano. La fase orgánica inferior que contiene los tioles fue recuperada y secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, antes de ser filtrada y concentrada bajo un flujo de gas N<sub>2</sub> hasta un volumen final de aproximadamente 25 µL.

35

Análisis GC-MS

5 [0078] Se inyectaron tres microlitros del extracto en el Cromatógrafo de Gas Agilent 6890N con un detector Selectivo de Masa inerte Agilent 5973 y una columna BP20. Se operó el inyector a 240 °C siendo el helio el gas portador y con un flujo de rampa de 1 ml por min.<sup>-1</sup> durante 52 min., y enseguida se aumentó a 2,4 ml por min.<sup>-1</sup> durante 12 min. Se programó la temperatura de la columna para aumentar de 40 °C a 166 °C a un ritmo de 3 °C por min.<sup>-1</sup>, y para enseguida aumentar a un ritmo de 40 °C por min.<sup>-1</sup> hasta los 270 °C. Se establecieron las condiciones del espectrómetro en 250 °C para la interfaz.

[0079] Se detectaron los tioles en el modo de monitoreo de iones seleccionado, usando los iones presentados en la Tabla 4.

Tabla 4: Compuestos y sus iones seleccionados en el modo SIM

Compuesto	Cuantificador	Calificador
Acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA)	116	101
3MHA-D	118	103
3-mercaptoexan-1-ol (3MH)	134	100
3MH-D	102	136

10 [0080] Se llevó a cabo la cuantificación de los compuestos a través de la comparación del área de valor máximo del compuesto adecuado con el área de valor máximo de la concentración conocida del respectivo patrón interno.

Resultados

15 [0081] Las Figuras 5 a 14 presentan la media, y error típico de la media, de los niveles de 3MHA y 3MH de las fermentaciones llevadas a cabo en triplicado. Todos los valores están en ng l<sup>-1</sup>.

[0082] Todos los valores de P presentes en estas Figuras indican la probabilidad de que la cantidad de tiol en los dos tratamientos en cuestión sea la misma, como calculado utilizando una simple prueba T (una cola).

20

Primer conjunto de fermentaciones.

[0083] Las Figuras 5 a 10 presentan los datos recogidos del primer conjunto de fermentaciones que corresponde a inoculaciones simples 100% con las cepas indicadas y a las proporciones de inoculación de levadura en fermentaciones mixtas como se ha detallado en la Tabla 1. Se analizaron y cuantificaron utilizando benzenometanotiol como el patrón interno.

25

[0084] Las Figuras 5 a 8 muestran las cantidades de tiol en comparaciones individuales entre especies. Las Figuras 9 y 10 presentan todas las especies en cuanto a 3MH y 3MHA y reproducen los datos proporcionados en las Figuras 5 a 8.

30

Producción de 3MHA en fermentaciones mixtas que contienen PK-KR1

[0085] La Figura 5 muestra que la cantidad de 3MHA producida en la fermentación mixta inoculada con VL3 (10%) y PK-KR1 (90%) fue significativamente más elevada en comparación con las fermentaciones inoculadas apenas con una especie. La fermentación mixta de VL3 (10%) y PK-KR1 (90%) produjo aproximadamente tres veces más 3MHA que cualquiera de las fermentaciones inoculadas apenas con una especie. Se determinó que este aumento en la producción de 3MHA en la fermentación mixta es significativo a nivel estadístico (P=0,005).

35

[0086] La Figura 5 también muestra que hubo un aumento en el 3MHA en fermentaciones mixtas inoculadas con la mezcla recíproca (VL3, 90% + PK-KR1, 10%), aunque no tan espectacular sigue siendo significativo (P=0,01).

40

Producción de 3MHA en fermentaciones mixtas que contienen PK-KR2

[0087] La Figura 6 muestra que la cantidad de 3MHA producida por todas las proporciones de VL3 y PK-KR2 en fermentaciones mixtas era elevada en comparación con las fermentaciones simples de las dos especies.

45

Producción de 3MH en fermentaciones mixtas que contienen PK-KR1

[0088] La Figura 7 muestra que los niveles de 3MH eran elevados en las fermentaciones mixtas inoculadas con VL3 y PK-KR1 en comparación con fermentaciones inoculadas solamente con una especie.

50

Producción de 3MH en fermentaciones mixtas que contienen PK-KR2

[0089] La Figura 8 muestra que la cantidad de 3MH producido por todas las proporciones de VL3 y PK-KR2 en fermentaciones mixtas era elevada en comparación con fermentaciones simples de las dos especies.

5 Sinopsis de los resultados del primer conjunto de fermentaciones

[0090] En general, parece que las fermentaciones con ciertas mezclas de cepas de levadura de la presente invención y una cepa de la especie *Saccharomyces* produjeron una cantidad elevada de 3MHA y/o 3MH en comparación con las fermentaciones con una única cepa. Determinadas mezclas de VL3 con PK-KR1 y con PK-KR2 produjeron cantidades elevadas de 3MHA y 3MH.

Segundo conjunto de fermentaciones

[0091] Para determinar si el aumento en el nivel de tiol observado en el primer conjunto de fermentaciones resultada del uso de diferentes cantidades de VL3 en el inóculo, se llevó a cabo un segundo conjunto de fermentaciones que examinaban el efecto de diferentes cantidades de VL3 en la producción de tiol en fermentaciones simples o mixtas con PK-KR1.

[0092] Las Figuras 11 y 12 muestran los datos del segundo conjunto de fermentaciones que corresponde a los tamaños del inóculo detallados en la Tabla 2 y a las proporciones de inoculación en fermentaciones mixtas detalladas en la Tabla 3. Se determinó la cantidad de tiol en estos experimentos utilizando el patrón interno deuterado.

Producción de 3MHA en fermentaciones inoculadas con diferentes cantidades de VL3

[0093] La Figura 11 muestra que aunque hubo un efecto significativo a nivel estadístico del tamaño de inoculación de VL3 en la cantidad de tiol producida en fermentaciones simples, como determinado por un análisis de varianza de un factor (one way ANOVA),  $P=0,003$ , no fue aparente ninguna tendencia obvia. Los valores para 100% y 10% son ligeramente inferiores en comparación con las otras cantidades (50%, 5%, 1%, 0,5% y 0,1%) que son aproximadamente iguales. Por consiguiente, si el tamaño del inóculo de VL3 tiene algún efecto en la cantidad de 3MHA obtenido, ese efecto es pequeño.

[0094] La Figura 11 también muestra que los niveles de 3MHA fueron significativamente más elevados en fermentaciones inoculadas en tanto VL3 como PK-KR1 a proporciones de 100:90, 50:90 y 10:90 en comparación con fermentaciones de inóculo único. Una prueba T determinó diferencias significativas cuando se compararon con las cantidades de 3MHA producidas en fermentaciones inoculadas tanto con 100% VL3 como con 0,1% VL3.

[0095] Es importante destacar que las fermentaciones inoculadas con tamaños de inóculo de VL3 y PK-KR1 particularmente relevantes comercialmente, demuestran un nivel más elevado de 3MHA en comparación con fermentaciones con una única especie. Estos datos corroboran los resultados del primer conjunto de fermentos. Los tamaños de inóculo de VL3 y PK-KR1 comercialmente relevantes pueden aplicarse a fermentaciones con más de 5% (superior a  $0,25 \times 10^6$  células por  $\text{ml}^{-1}$ ) de VL3.

40 Producción de 3MH en fermentaciones inoculadas con cantidades diferentes de VL3

[0096] La Figura 12 muestra que el efecto de variar la cantidad del inóculo de VL3 en los niveles de 3HM reproduce el efecto visto para el 3MHA. Aunque el tamaño del inóculo tiene un efecto significativo, como determinado por un análisis de varianza de un factor (one way ANOVA),  $P=0,03$ , no hay una tendencia clara. Los niveles de 3MH obtenidos en las fermentaciones 100% VL3 son inferiores a los obtenidos usando otros tamaños de inóculo que, nuevamente, son relativamente constantes.

[0097] La Figura 12 también muestra que los niveles de 3MH producidos por fermentaciones mixtas inoculadas con VL3 y PK-KR1 no eran elevados en comparación con las fermentaciones inoculadas con una única especie.

50 Síntesis de los resultados del segundo conjunto de fermentaciones

[0098] Cualquier efecto del tamaño del inóculo VL3 es muy pequeño y no tiene probablemente un efecto global en los niveles de 3MHA y 3MH aislados.

Resumen de resultados

[0099] Las fermentaciones llevadas a cabo con una mezcla de VL3 y de las dos cepas de *Pichia kluyveri* aisladas de *Kumeu River* presentan niveles elevados de 3MHA y/o 3MH: la magnitud del aumento depende de las especies usadas y de la proporción del inóculo.

[0100] La cantidad de una cepa de vino *Saccharomyces cerevisiae* disponible comercialmente (VL3) usada para inocular fermentaciones no justifica las cantidades de 3MHA y 3MH producidas en las fermentaciones con cepas de levadura combinadas.

### 5 Ejemplo 3

Micro fermentación con PK-KR1 y una gama de cepas de levadura para vino disponibles comercialmente en cultivos simples y mixtos.

10 [0101] Se llevó a cabo la fermentación usando PK-KR1 como se preparó en el ejemplo 1 y una gama de cepas para vino disponibles comercialmente (VL3, VIN7, X5, SVG, QA23 y EC118). Se efectuó la fermentación según el protocolo detallado en el ejemplo 2 con la variación de que la fermentación fue llevada a cabo a 14 °C y no a 25 °C. (Se encuentra dentro de la temperatura a la que el SB es fermentado comercialmente). La extracción y cuantificación del tiol se efectuó según el protocolo descrito en el ejemplo 2.

15 [0102] La Figura 13a muestra que las fermentaciones mixtas de 10% VL3 y 90% PK-KR1, 10% VIN7 y 90% PK-KR1 así como las de 10% X5 y 90% PK-KR1 produjeron un aumento del 3MHA en comparación con las fermentaciones con una única especie. Experimentos adicionales muestran que aunque la PK-KR1 produjo cantidades razonables de 3MHA sola, la reducción de azúcar en esta fermentación fue mínima lo que indica que el producto puede no tener un sabor altamente deseable.

20 [0103] La Figura 13b muestra que las fermentaciones mixtas de PK-KR1 con la gama de cepas de levadura para vino disponibles comercialmente no resultaron en una producción elevada de 3MH.

25 [0104] Se repitieron las co-fermentaciones con PK-KR1 y con PK-KR2 con VIN7 en volúmenes de 5 litros con cuatro réplicas (n = 4). Se llevaron a cabo los procedimientos y las proporciones de inoculación y el análisis del tiol de acuerdo con lo que se ha descrito anteriormente y los resultados se presentan en la Figura 14. El análisis de varianza muestra que el tratamiento (cepa/mezcla de cepas usada) tuvo un efecto tanto en los niveles de 3MHA (F = 4,02; P = 0,2) como en los de 3MH (F= 4,28; P = 0,02). Las mezclas que incluían solamente PK-KR1 y/o PK-KR2 poseían significativamente más 3MH y 3MHA que las otras mezclas (P>0,05).

### Dinámica de población

35 [0105] Para comprender mejor estas co-fermentaciones con PK-KR1 monitoreamos el cambio en la frecuencia de cada uno de los compañeros de la co-fermentación a lo largo de la fermentación.

### Métodos

40 [0106] Se tomaron asépticamente cada día muestras de 1ml a través del puerto lateral de los matraces de fermentación. Se colocaron las muestras en placas de petri en un medio de cultivo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) agar en diluciones apropiadas las cuales se incubaron a 30 °C durante 24h antes de que se contaran las colonias (n~200). Para las mezclas con la PK-KR1 no es necesario un medio selectivo para distinguir las dos, ya que ambas levaduras tienen una morfología de colonia única que puede distinguirse en las placas de petri con un medio de cultivo YPD agar.

45 [0107] Para monitorear el uso de nitrógeno disponible para la levadura (YAN), y de la glucosa y fructosa, se tomaron asépticamente muestras de 1ml a cada dos días de la fermentación. Se usaron dos equipos de prueba para determinar la cantidad de YAN: 1° Amino Nitrogen-B1 (Unitech Scientific, California) y Ammonia (Unitech Scientific, California). La suma de ambas pruebas presenta el YAN total. Para determinar la cantidad de D-Glucosa y Fructosa en una muestra se usó el Equipo D-Glucose/Fructose (Unitech Scientific California). Todos los equipos de prueba se basan en reacciones enzimáticas simples que se monitorearon usando un espectrofotómetro UV/VIS.

50 [0108] Para el ensayo de prolina se usó un medio definido sintético que consistía en 1,7 g/l de medio de base nitrogenada para levadura sin nitrógeno, aminoácidos y sin una fuente de carbono (YNB), 200 g/l de glucosa y 0,45 g/l de L-prolina (≥99%; reactivo Sigma P0380) - esta cantidad de prolina emula las cantidades encontradas en un zumo de uva normal. Se inoculó el medio con  $2,5 \times 10^6$  células de levadura/ml y las muestras fueron fermentadas en recipientes con válvulas de fermentación a 14 °C y agitados a 100rpm. Se repitieron estos experimentos pero fueron enmendado de las siguientes formas: se privaron las células de levadura de carbono y nitrógeno al colocarlas en un medio limitante durante 48 horas para asegurarse de que las reservas celulares de carbono y nitrógeno habían sido agotadas; se purgó el exceso de O<sub>2</sub> en los matraces utilizando CO<sub>2</sub> sólido (hielo seco) el cual se permitió sublimar en los medios; y, se incluyeron tratamientos donde no se añadía glucosa ni prolina al medio YNB.

## Resultado

## Utilización de nutrientes en la fermentación

5 [0109] Los resultados del experimento de dinámica de población se presentan en la Figura 15 e indican que la PK-KR1 persistió, y alcanzó tamaños de población grandes, en las co-fermentaciones. Ya que se sabe que el nitrógeno es un recurso esencial limitante en el zumo, tratamos de monitorear los cambios de nutrientes en las fermentaciones únicas y co-fermentaciones para averiguar que especies utilizaban que recursos y cuando. Como previsto, en la fermentación simple de VL3 el YAN disminuyó en los primeros cuatro días de la fermentación (Figura 16a) y la cantidad de glucosa/fructosa disminuyó a lo largo de toda la fermentación a medida que iban siendo utilizadas (Figura 16b). La co-fermentación con PK-KR1 muestra un retraso de dos días para la utilización del YAN y también de la glucosa/fructosa. Curiosamente parece que en la co-fermentación solo se usa una parte del YAN y de la glucosa/fructosa que la VL3 utiliza cuando parece estar sola en la cofermentación. No obstante, se observó un resultado intrigante en la fermentación simples de PK-KR1. A pesar de que la PK-KR1 obtuvo tamaños de población tan grandes ( $3,5 \times 10^7$  ufc/ml), estos datos muestran que no se utilizaron las principales fuentes de nitrógeno y carbono presentes en el zumo de uva. Solo fue consumido 16% del YAN y 11% de la glucosa/fructosa, sin embargo la PK-KR1 alcanzó tamaños de población viable grandes.

## Fuente de nutrientes

20 [0110] La *S. cerevisiae* no es capaz de utilizar la prolina bajo condiciones anaeróbicas (la enzima PUTI en la vía de degradación requiere  $O_2$  (Ingledew et al. 1987) y el equipo de prueba para detectar amino nitrógeno primario no es capaz de detectar prolina. No obstante, la prolina es uno de los aminoácidos más abundantes en las uvas (Ough y Stashak 1974; Spayd y Andersen-Bagge 1996). Para probar la hipótesis que la PK-KR1 es capaz de usar prolina bajo condiciones de fermentación fermentamos VL3 y PK-KR1 en un medio definido sintético cuya única fuente de nitrógeno era la prolina. La Figura 17 presenta la dinámica de población durante esos fermentos. Inesperadamente, la PK-KR1 muestra el mismo índice de crecimiento que en los experimentos anteriores en el zumo de uva y alcanza tamaños de población aproximadamente similares ( $3,5 \times 10^7$  ufc/ml y  $2,48 \times 10^7$  ufc/ml). En claro contraste, la VL3 muestra tamaños de población significativamente reducidos a lo largo de toda la fermentación y es incluso incapaz de conseguir dos duplicaciones de población. Estos datos están de acuerdo con relatos anteriores que afirman que la *S. cerevisiae* es incapaz de usar prolina bajo condiciones anaeróbicas (Ingledew et al. 1987). Dado que la cantidad de glucosa y fructosa cambió poco en el zumo de uva cuando estaba presente solamente la PK-KR1, y sin embargo alcanzó tamaños de población elevados, especulamos en cuanto a las posibles fuentes alternativas de carbono que este organismo asimiló. Llevamos a cabo un segundo ensayo del uso de nutrientes. Aquí privamos las células de carbono y nitrógeno para que gastaran sus reservas, y enseguida colocamos cultivos de PK-KR1 duplicados en el mismo medio definido YNB tanto con como sin prolina. Esta vez para garantizar que estaba presente la menor cantidad posible de oxígeno se añadió un granulo de  $CO_2$  sólido (hielo seco): a medida que este se sublimó purgó el aire del matraz. Se incubaron a  $28^\circ C$  durante ocho días y el crecimiento de la población fue evaluado a través de la toma de muestras (sin permitir que el aire atmosférico entrara) y de la estimación del número de unidades formadoras de colonias por ml. Se presentan estos datos en la Figura 18. Dado que no existen fuentes de carbono o nitrógeno, como era de esperar, no tiene lugar crecimiento de la PK-KR1 en el medio YNB por sí solo; no obstante, añadir prolina a los medios permite que la población se expanda desde los inóculos iniciales de  $1,5 \times 10^6$   $ml^{-1}$  a  $2,2 \times 10^7$  al final de cuatro días. Esto corresponde aproximadamente a 14 veces el tamaño de la población. Se infiere que el aumento de la biomasa se logró a través de la asimilación de la prolina que se usó no solo como una fuente de energía para llevar a cabo actividades catabólicas (una fuente de carbono) sino también como una fuente de nitrógeno para llevar a cabo acumulación anabólica de biomasa.

## Referencias

[0111]

- 50 Brandolini, V., Romano, P., Maietti, A., Caruso, M., Tedeschi, P. and Mazzotta, D., 2002. Automated multiple development method for determination of glycerol produced by wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 481-485 .
- 55 Clemente-Jimenez, J. M., L. Mingorance-Cazorla, S. Martinez- Rodriguez, F. J. Las Heras-Vazquez, and F. Rodriguez-Vico. 2004. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 98:301-308 .
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares P., Ramon D and A. Querol. 1998. The role of non-Saccharomyces yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology* 1:143-148 .
- 60 Gachons, C. P. d., T. Tominaga, and D. Dubourdieu. 2000. Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc grapes by assaying S-cysteine conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal

- aroma. *Journal of agricultural and food chemistry* 48:3387-3391.
- 5 Garde-Cerdan, T., and C. Ancin-Azpilicueta. 2006. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine ferments. *European Food Research Technology* 222:15-25 .
- 10 Heard, G.M., Fleet, G.H., 1986. Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technology in Australia* 38 (1), 22-25 .
- 15 Heard, G.M., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 23- 28 .
- Houtman, A.C., Marais, J., Du Plessis, C.S., 1980. Factors affecting the reproducibility of fermentation of grape juice and of the aroma composition of wines: I. Grapes maturity, sugar, inoculum concentration, aeration, juice turbidity and ergosterol. *Vitis* 19, 37-54 .
- 20 Howell, K. S., Swiegers, J. H., Elsey, G. M., Siebert, T. E., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., Pretorius, I. S., de Barros Lopes, M. A. 2004. Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiology Letters* 240, 125-29 .
- 25 Howell, K. S., M. Klein, J. H. Swiegers, Y. Hayasaka, G. M. Elsey, G. H. Fleet, P. B. Høj, I. S. Pretorius, and M. A. de Barros Lopes. 2005. Genetic determination of volatile-thiol release by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5420-5426 .
- Ingledeu WM, Magnus CA, Sosulski FW (1987) Influence of Oxygen on Proline Utilization During the Wine Fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 246-248 .
- 30 Johnson, L. J., V. Koufopanou, M. R. Goddard, R. Hetherington, S. M. Schäfer, and A. Burt. 2004. Population genetics of the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics* 166:43-52 .
- 35 Kurtzman, C. P., and C. J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 73:331-371 .
- Kurtzman C P. and. Fell J W 2006 *Yeast Systematics and Phylogeny - Chapter 2 Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology in Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* Carlos Rosa, Gábor Péter (Eds.), Springer .
- 40 Lambrechts, M. G., and I. S. Pretorius. 2000. Yeast and its importance to wine aroma - a review. *South African Journal for Enology and Viticulture* 21:97-129 .
- 45 Leaw, S. N., Chang, H. C., Sun, H. S., Barton, R., Bouchara, J., Chang, T. C. (2006) Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 4, No 3. pp693-699 .
- 50 Lema, C., Garcia-Jares, C., Orriols, I., Angulo, L., 1996. Contribution of *Saccharomyces* and non- *Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarin\_o wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 206- 216 .
- Nykänen, L., 1986. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture* 37, 84-96 .
- 55 Ough CS, Stashak RM (1974) Further Studies on Proline Concentration in Grapes and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 25, 7-12 .
- Ramano, P., C. Fiore, M. Paraggio, M. Caruso, and A. Capece. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86:169-180 .
- 60 Rapp, A., Versini, G., 1991. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. In: RANTZ (Ed.), *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines*. American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA, pp. 156-164 .
- Ribereau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Doneche, and A. Lonvaud. 2006. *Handbook of Enology*. 2nd edition. John Wiley & Sons, Chicester, UK .

Rojas, V., J. V. Gil, F. Pinaga, and P. Manzanares. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory ferments. *International Journal of Food Microbiology* 86:181-188 .

5 Spayd SE, Andersen-Bagge J (1996) Free Amino Acid Composition of Grape Juice From 12 *Vitis vinifera* Cultivars in Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 389-402 .

Tominaga, T., A. Furrer, R. Henry, and D. Dubourdieu. 1998a. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal* 13:159-162 .

10 Tominaga, T., C. P. d. Gachons, and D. Dubourdieu. 1998b. A new type of flavour precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc: S-cysteine conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:5215-5219 .

15 Tominaga, T., M.-L. Murat, and D. Dobourdieu. 1998c. Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. Cv Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:1044-1048 .

Walsh, P.S., Metzger, D. A., and Higuchi, R. (1991) Chelex(r) 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. Vol 10, No 4. pp506-511 .

20 White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In M. A. Innes, D. H. Gelfand, T. T. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego .

25 Listado de secuencias

[0112]

<110> Auckland Uniservices

30 <120> Cepas de levadura y métodos de utilización de las mismas

<130> 51090WOP00

35 <140> EP 09717572.3

<141> 2009-03-06

<150> NZ566518

<151> 2008-03-07

40 <160> 9

<170> Versión de patentIn 3.5

45 <210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Cebador

<400> 1

tccgtaggtg aacctgagg 19

55 <210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60 <220>



ES 2 531 193 T3

<223> Cebador

<400> 2  
tcctccgctt attgatgac 20

5 <210> 3  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Cebador

<400> 3  
15 gcatatcaat aagcggagga aaag 24

<210> 4  
<211> 19  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador

<400> 4  
25 ggtccgtgtt tcaagacgg 19

<210> 5  
<211> 294  
30 <212> ADN  
<213> Pichia kluyveri

<400> 5

ttgtaataat accagtcact aagttttaac aaaacaaaac tttcaacaac ggatctcttg 60

gttctcgcacat cgatgaagag cgcagcgaac tgcgatacct agtgtgaatt gcagccatcg 120

tgaatcatcg agttcttgaa cgcacattgc gccccatggt attccatggg gcatgcctgt 180

ctgagcgtcg tttccttctt gcgcaagcag agttgagaac aggctatgcc tttttcgaaa 240

tggAACgtcg tggacgaagt gaactaaatt ttagcacgc tttggccgcc gaac 294

35 <210> 6  
<211> 356  
<212> ADN  
<213> Pichia kluyveri

40 <400> 6

ES 2 531 193 T3

cacatgcgtg agcgcaccaa acacctaataa ttgtaaatamt accagtcact aagttttaac 60  
 aaaacaaaac tttcaacaac ggatctcttg gttctcgcac cgatgaagag cgcagcgaac 120  
 tgcgatacct agtgtgaatt gcagccatcg tgaatcatcg agttcttgaa cgcacattgc 180  
 gccccatggt attccatggg gcatgcctgt ctgagcgtcg tttccttctt gcgcaagcag 240  
 agttgagaac aggctatgcc tttttcgaaa tggaacgtcg tggacgaagt gaactaaatt 300  
 tttagcacgc tttggccgcc gaacttttaa ctaagctcga cctcagatca ggtagg 356

<210> 7  
 <211> 367  
 <212> ADN  
 <213> Pichia kluyveri

5

<400> 7  
 tttgaaatct cacctagtgt gcgagttgta aattgcaggt tggagtctcg ggtagacgt 60  
 gtgtgcaagt cccttggaac agggtgccac tgaggggtgag agccccgtat cgtgcatgtc 120  
 gacacctgtg aggcccttct gacgagtcga gttgtttggg aatgcagctc taagtgggtg 180  
 gtaaattcca tctaaggcta aatattggcg agagaccgat agcgaacaag tactgtgaag 240  
 gaaagatgaa aagcactttg aaaagagagt gaaacagcac gtgaaattgt tgaaagggaa 300  
 gggatttggg ctcgacatgg gatttacgca tcgttgccctc tcgtgggcgg cgctctgggt 360  
 ttttcct 367

10

<210> 8  
 <211> 539  
 <212> ADN  
 <213> Pichia kluyveri

15

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (402)..(402)  
 <223> n es a, c, g, o t

20

<400> 8

ES 2 531 193 T3

gatttgaat ctcacctagt gtgcgagttg taaattgcag gttggagtct cgggtagac 60  
 gtgtgtgcaa gtcccttggga acaggggtgcc actgaggggtg agagccccgt agcgtgcatg 120  
 tcgacacctg tgaggccctt ctgacgagtc gagttgtttg ggaatgcagc tctaagtggg 180  
 tggtaaattc catctaaggc taaatattgg cgagagaccg atagcgaaca agtactgtga 240  
 aggaaagatg aaaagcactt tgaaaagaga gtgaaacagc acgtgaaatt gttgaaaggg 300  
 aagggatttg ggctcgacat gggatttacg catcgttgcc tctcgtgggc ggcgctctgg 360  
 gtttttcctg ggccagcacc ggttttcggt gcaggataag ancaattgga atgtggctcc 420  
 tcggagtgtt atagcctttt gtagatgctg cgtatgggga ccgagggctg cggcggactc 480  
 gtttcgtctc ggatgctggc acaacggcgc aataccgcc cgtcttgaaac acggaccaa 539

5 <210> 9  
 <211> 436  
 <212> ADN  
 <213> Pichia kluyveri

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)  
 <223> n es a, c, g, o t

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19)..(19)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 9  
 gtatangata taaatcacng taatgatcct tccgtaggtg gaacctgcgg aaggatcatt 60  
 actgtgattt atatcttata cacatgcgtg agcgcaccaa acacctaaaa ttgtaatamt 120  
 accagtcact aagttttaac aaaacaaaac tttcaacaac ggatctcttg gttctcgcac 180  
 cgatgaagag cgcagcgaaa tgcgatacct agtgtgaatt gcagccatcg tgaatcatcg 240  
 agttcttgaa cgcacattgc gccccatggt attccatggg gcatgcctgt ctgagcgtcg 300  
 tttccttctt gcgcaagcag agttgagaac aggctatgcc tttttcgaaa tggaamgtcg 360  
 tggacgaagg tgaactaaat ttttagcacg ctttggccgc cgaactttaa ctaagctcga 420  
 cctcagatca ggtagg 436

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Cepa de levadura aislada como depositada en el *National Measurement Institute* bajo el número de registro V06/022711 o V06/022712.
2. Método de fermentación que comprende el uso de una levadura según la reivindicación 1.
- 10 3. Cultivo de inicio de levadura para fermentación que comprende al menos dos cepas de levadura que producen un aumento sinérgico en el tior en un producto de fermentación, donde una cepa de levadura es una cepa de levadura depositada en el *National Measurement Institute* bajo el número de registro V06/022711 o V06/022712.
- 15 4. Método para producir un producto de fermentación que comprende el uso del cultivo de inicio según la reivindicación 3 donde dicho método comprende el paso de añadir dicho cultivo de inicio a un cultivo de fermentación.
5. Método para mejorar el sabor de un producto de fermentación, dicho método comprende el uso de una cepa de levadura según la reivindicación 1 o un cultivo de inicio de levadura según la reivindicación 3 en un cultivo de fermentación donde dicho método comprende el paso de añadir dicha cepa de levadura o dicho cultivo de inicio a un cultivo de fermentación.

**Figura 1**

```
AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAAT
-----TTTGAAT
*****

CTCACCTAGTGTGCGAGTTGTAAATTGCAGGTTGGAGTCTCGGGTTAGACGTGTGTGCAA
CTCACCTAGTGTGCGAGTTGTAAATTGCAGGTTGGAGTCTCGGGTTAGACGTGTGTGCAA
*****

GTCCCTTGGAACAGGGTGCCACTGAGGGTGAGAGCCCCGTANCGTGCATGTCGACACCTG
GTCCCTTGGAACAGGGTGCCACTGAGGGTGAGAGCCCCGTATCGTGCATGTCGACACCTG
*****

TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAACTGGGTGGTAAATTC
TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAACTGGGTGGTAAATTC
*****

CATCTAAGGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG
CATCTAAGGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG
*****

AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTG
AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTG
*****

GGCTCGACATGGGATTTACGCATCGTTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGTTTTTCCTG
GGCTCGACATGGGATTTACGCATCGTTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGTTTTTCCT-
```

**Figura 2**

CACCTAAAATTGTAATACTACCAGTCACTAAGTTTTAACAAAACAAAACCTTCAACAACG  
-----TTGTAATAATAACCAGTCACTAAGTTTTAACAAAACAAAACCTTCAACAACG  
\*\*\*\*\*

GATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTG  
GATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTG  
\*\*\*\*\*

CAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCCATGGTATTCCATGGGG  
CAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCCATGGTATTCCATGGGG  
\*\*\*\*\*

CATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCTTCTTGCGCAAGCAGAGTTGAGAACAGGCTATGCCT  
CATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCTTCTTGCGCAAGCAGAGTTGAGAACAGGCTATGCCT  
\*\*\*\*\*

TTTTCGAAATGGAACGTCGTGGACGAAGTGAACATAAATTTTAGCACGCTTGGCCGCCG  
TTTTCGAAATGGAACGTCGTGGACGAAGTGAACATAAATTTTAGCACGCTTGGCCGCCG  
\*\*\*\*\*

AACTTTAACTAAGCTCGACCTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTAA  
AAC-----  
\*\*\*

**Figura 3**

```
AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGGGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAAT
-----GATTTGAAAT
*****

CTCACCTAGTGTGCGAGTTGTAATTGCAGGTTGGAGTCTCGGGTTAGACGTGTGTGCAA
CTCACCTAGTGTGCGAGTTGTAATTGCAGGTTGGAGTCTCGGGTTAGACGTGTGTGCAA
*****

GTCCCTTGGAACAGGGTGCCACTGAGGGTGAGAGCCCGTANCGTGCATGTCGACACCTG
GTCCCTTGGAACAGGGTGCCACTGAGGGTGAGAGCCCGTAGCGTGCATGTCGACACCTG
*****

TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTC
TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTC
*****

CATCTAAGGCTAAATATTGGCGAGGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAPGATG
CATCTAAGGCTAAATATTGGCGAGGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAPGATG
*****

AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAACACAGCAOCTGAAATTGTTGAAAAGGGAAGGGTATTG
AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAACACAGCAOCTGAAATTGTTGAAAAGGGAAGGGTATTG
*****

GGCTCGACATGGGATTTACGCATCGTTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGTTTTTCCTG
GGCTCGACATGGGATTTACGCATCGTTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGTTTTTCCTG
*****

GGCCAGCATCGGTTTTGTTGCAGGATAAGGACAATTGGAATGTGGCTCCTCGGAGTGT
GGCCAGCATCGGTTTTGTTGCAGGATAAGGACAATTGGAATGTGGCTCCTCGGAGTGT
*****

ATAGCCTTTTGTAGATGCTGCGTATGGGGACCGAGGGCTGCGGCGGACTCGFTTCGTCTC
ATAGCCTTTTGTAGATGCTGCGTATGGGGACCGAGGGCTGCGGCGGACTCGFTTCGTCTC
*****
```

**Figura 4**

```

-----AACCTGCGGAAGGATCATT
GTATANGATATAAATCACNGTAATGATCCTTCCGTAGGTGGAACCTGCGGAAGGATCATT
*****

ACTGTGATTTATATCTTATACACATGCGTGAGCGCACCAACACCTAAAATTGTAATACT
ACTGTGATTTATATCTTATACACATGCGTGAGCGCACCAACACCTAAAATTGTAATAMT
*****

ACCAGTCACTAAGTTTTAACAAAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAT
ACCAGTCACTAAGTTTTAACAAAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAT
*****

CGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCG
CGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCG
*****

AGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCCATGGTATTCATGCGGCATGCCTGTCTGAGCGTCG
AGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCCATGGTATTCATGCGGCATGCCTGTCTGAGCGTCG
*****

TTTCCTTCTTGCGCAAGCAGAGTTGAGAACAGGCTATGCCTTTTTCGAAATGGAACGTCG
TTTCCTTCTTGCGCAAGCAGAGTTGAGAACAGGCTATGCCTTTTTCGAAATGGAAMGTCG
*****

TGGACGAAG-TGAAC TAAATTTTAGCACGCTTTGGCCGCCGAACTTTAACTAAGCTCG
TGGACGAAGGTGAAC TAAATTTTAGCACGCTTTGGCCGCCGAACTT-AACTAAGCTCG
*****

ACCTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA
ACCTCAGATCAGGTAGG-----
*****

```



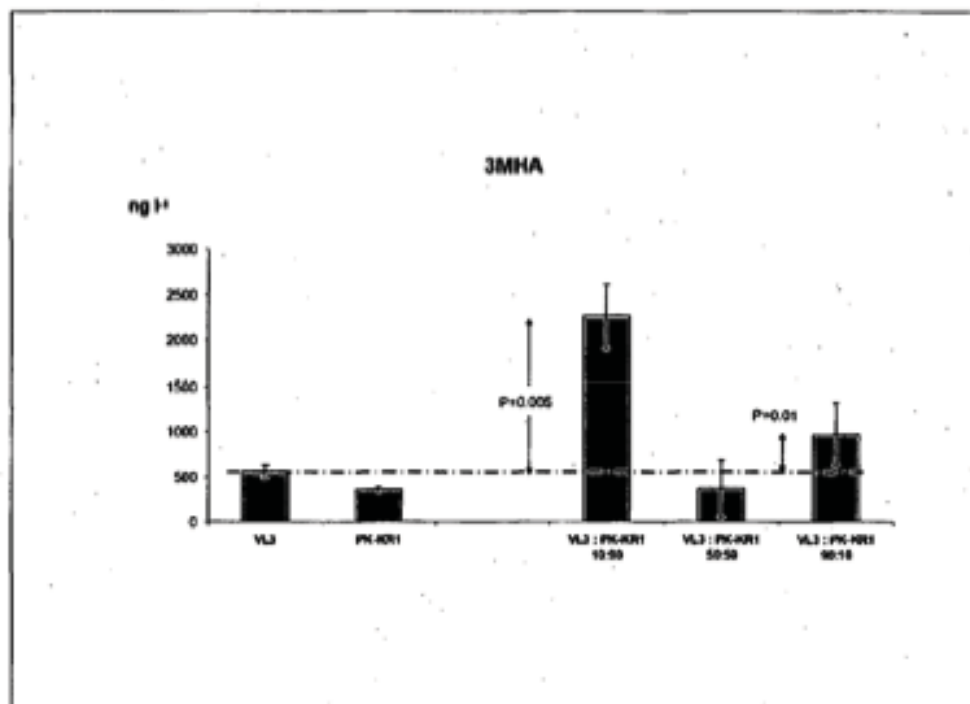


Figura 5

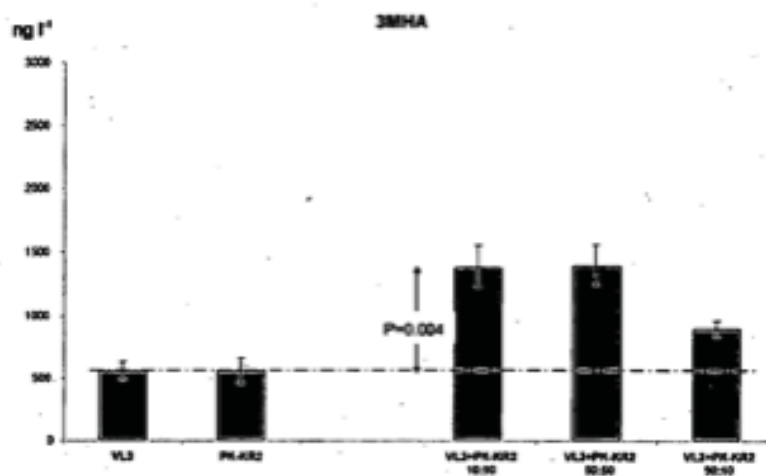


Figura 6

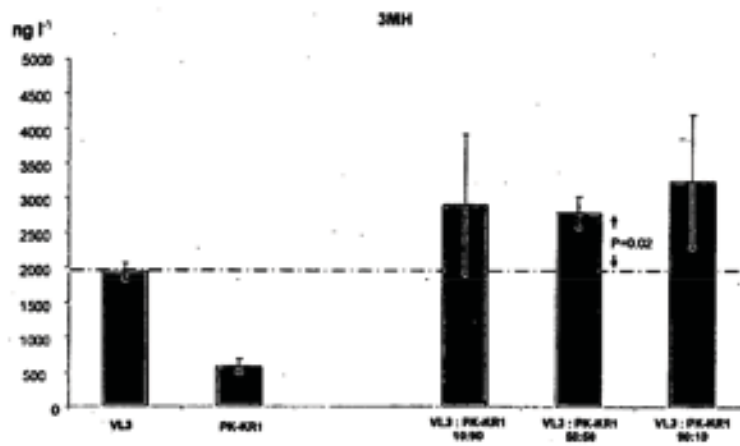


Figura 7

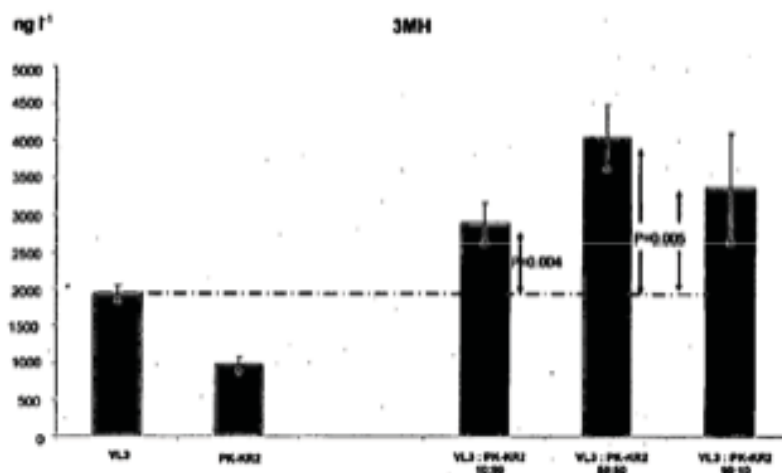


Figura 8

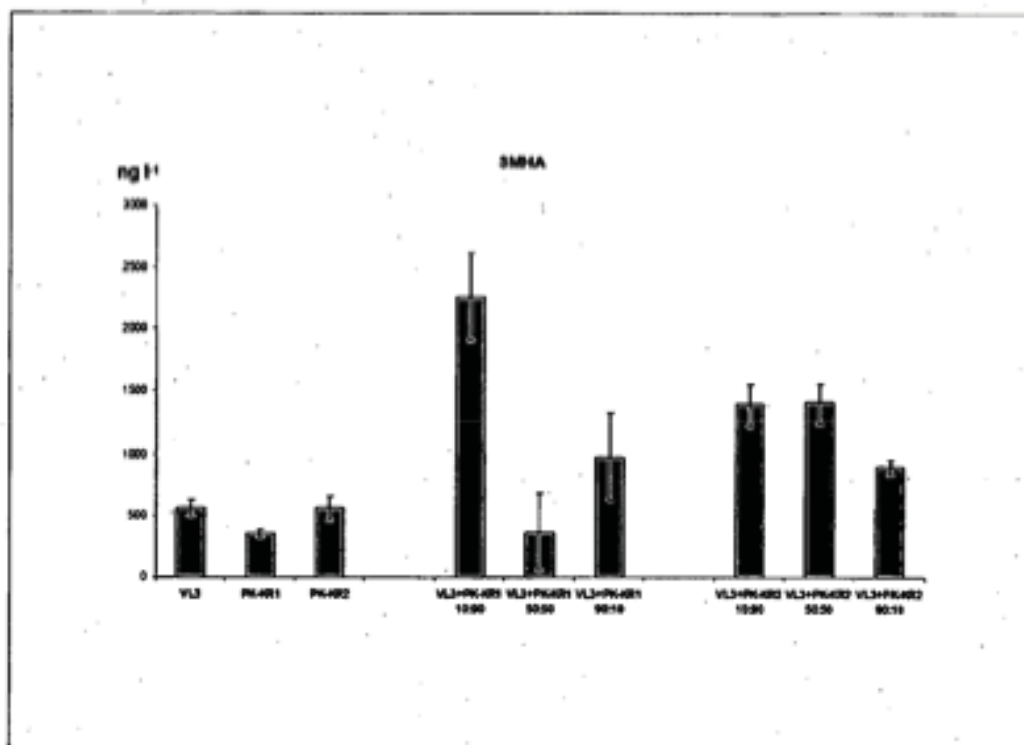


Figura 9

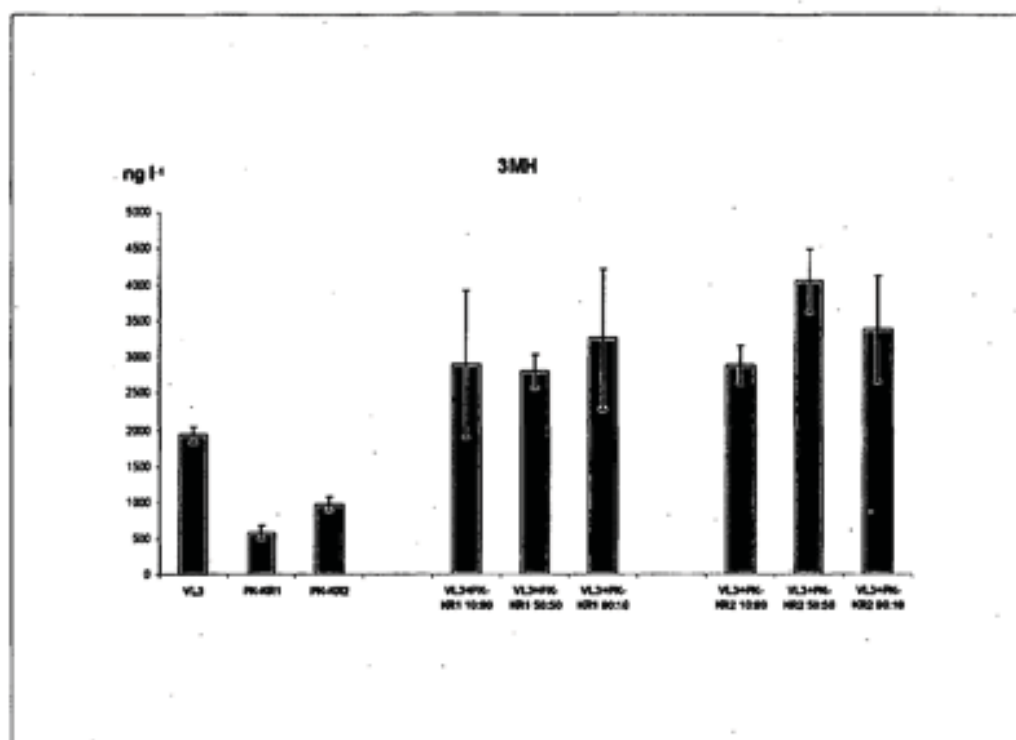


Figura 10

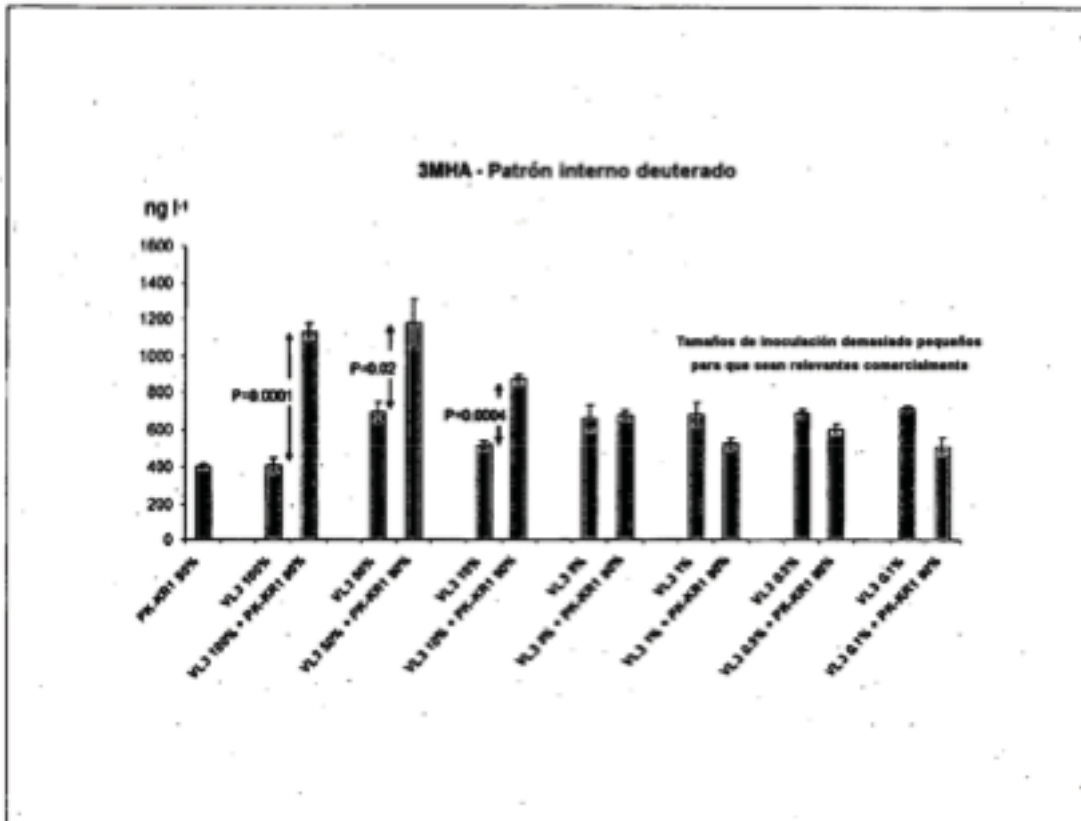


Figura 11

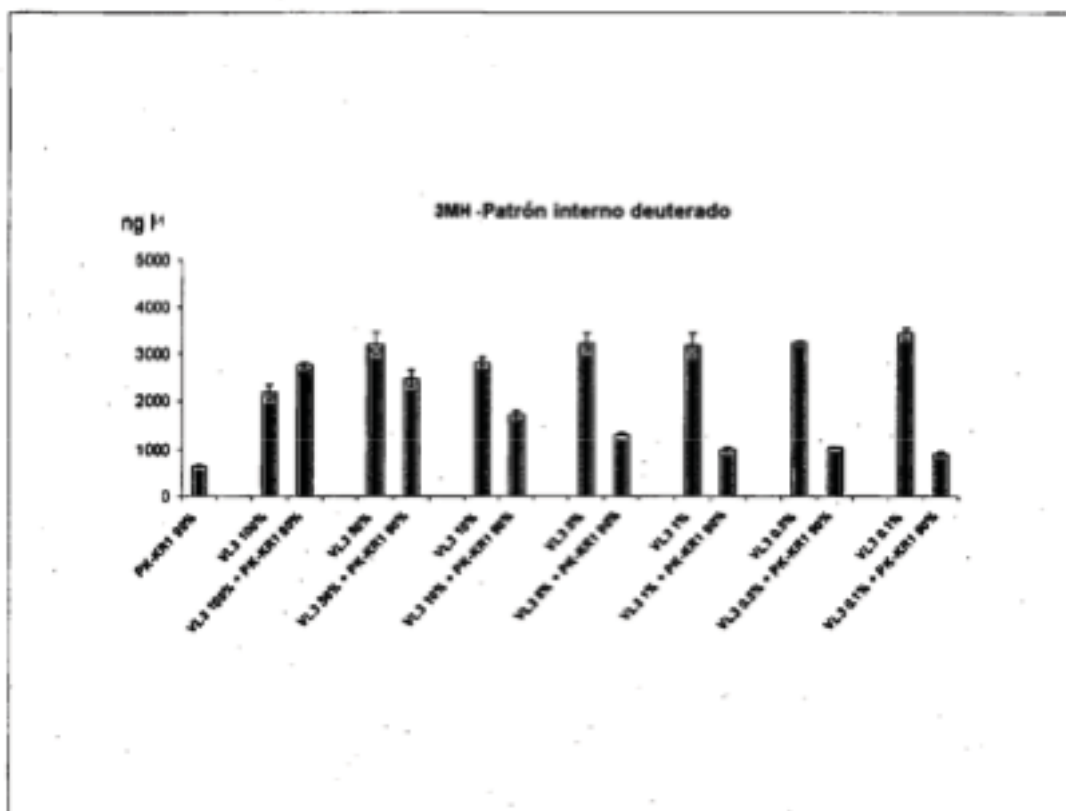


Figura 12



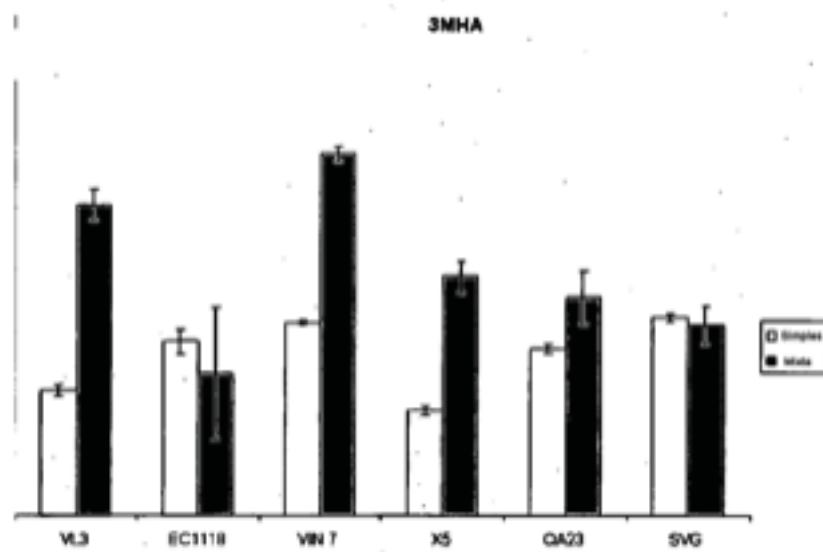


Figura 13a

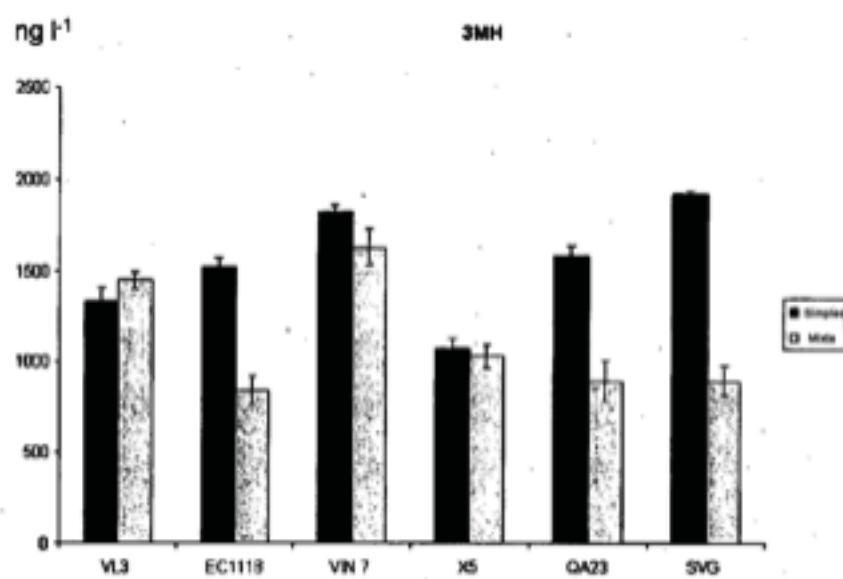


Figura 13b

Figura 14

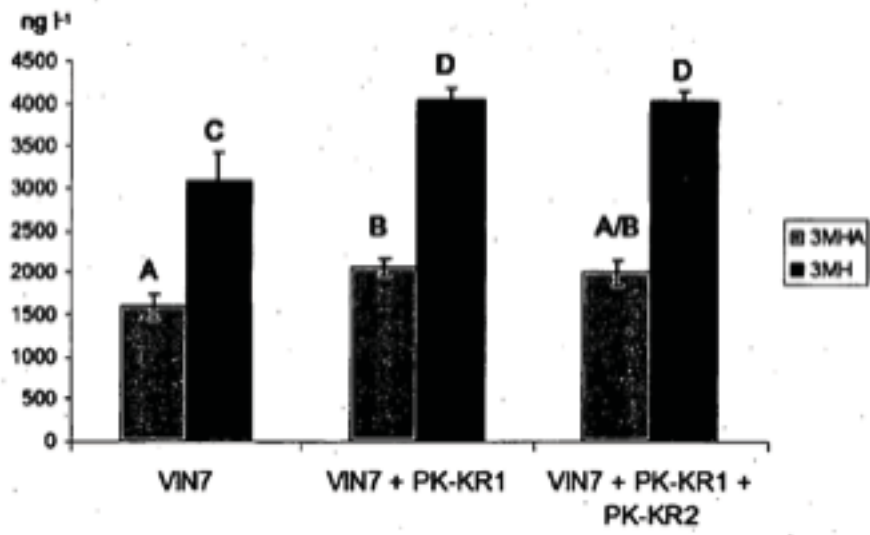


Figura 15

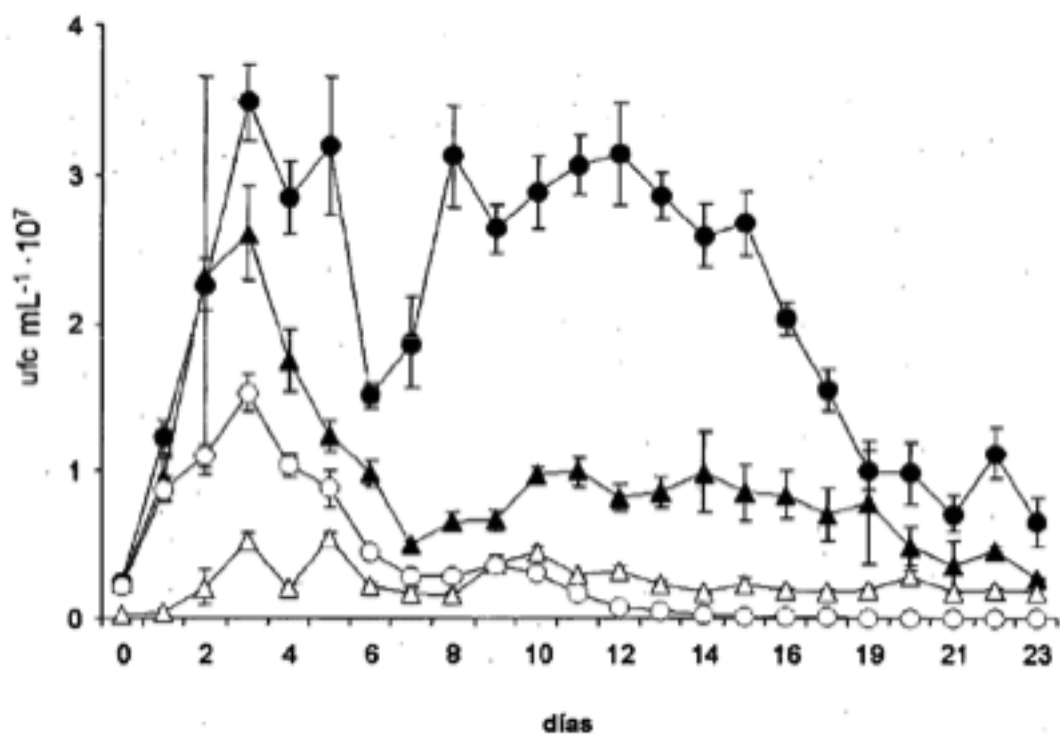


Figura 16

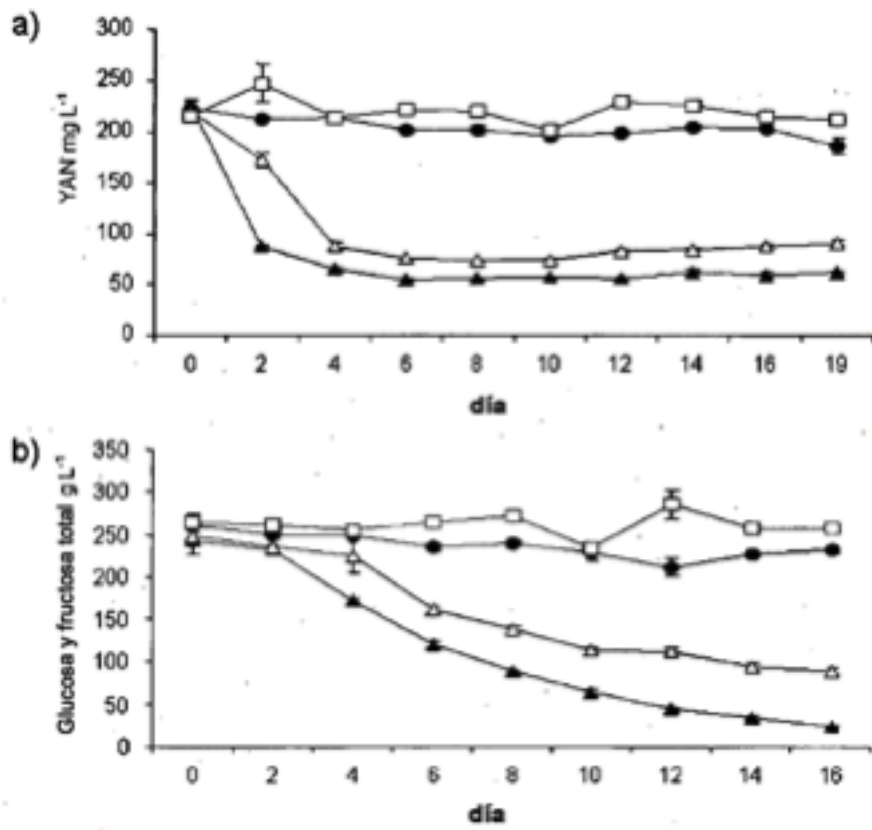


Figura 17

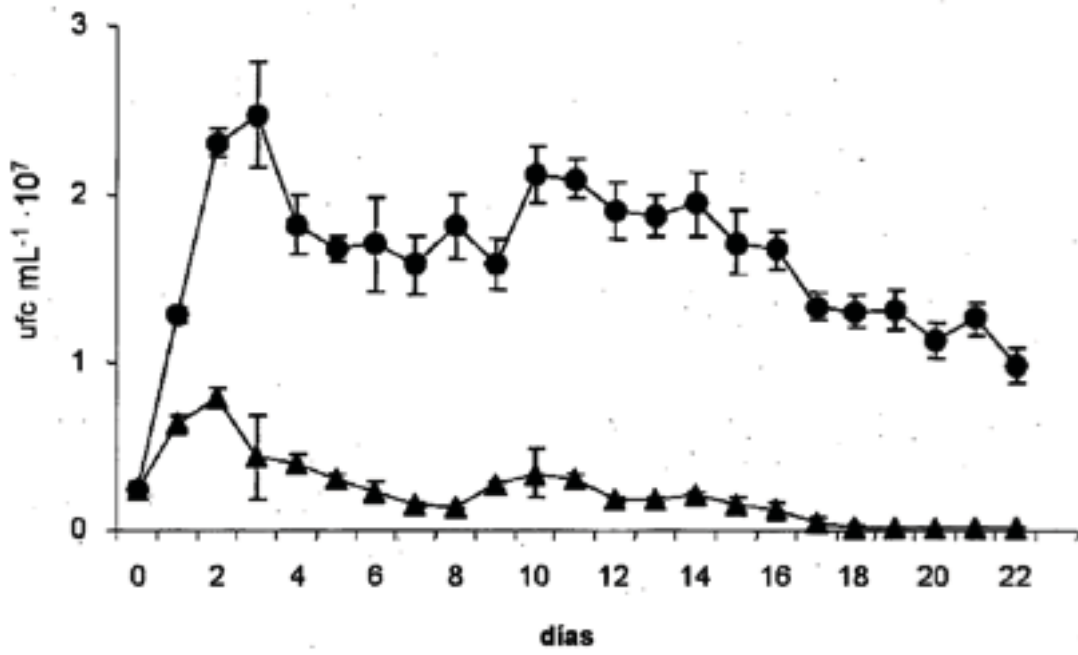


Figura 18

