

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 952**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| C12G 1/022 | (2006.01) |
| A23L 2/02 | (2006.01) |
| A23L 2/38 | (2006.01) |
| A23L 2/52 | (2006.01) |
| A23L 2/84 | (2006.01) |
| C12G 3/02 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2011 PCT/EP2011/056557**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011 WO11134952**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2011 E 11717997 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2563169**

54 Título: **Método para la preparación de una bebida fermentada**

30 Prioridad:

27.04.2010 EP 10161158

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.10.2017

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Boege Allé 10-12
2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**SWIEGERS, JAN, HENDRIK;
BUNTE, ANNICKA;
HOLT, SYLVESTER y
BADAKI, MANSOUR**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 637 952 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

Método para la preparación de una bebida fermentada

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención se refiere a un método para inocular levadura en zumo de frutas o fruta. Esto es importante para la industria de las bebidas en general, especialmente para la industria del vino.

ANTECEDENTES

10 [0002] Durante los últimos 50 años los productores de vino se han habituado a inocular su vino con cultivos puros de levadura. Tales cultivos de inoculación también se pueden denominar "cultivos iniciadores". La levadura se encuentra en una forma deshidratada llamada levadura seca activa (LSA), la cual se ha producido en fermentadores, concentrado y luego secado en un tambor, un proceso llamado secado en lecho fluidizado. En el presente documento también puede denominarse levadura liofilizada.

15 [0003] Como resultado del hecho de que la levadura esté deshidratada, esta necesita, por tanto, rehidratarse para ser activa metabólicamente, antes de aplicarse al sustrato, como el zumo de uva en el caso de la vitivinicultura. Este es un proceso muy delicado para las células de levadura y requiere una cantidad significativa de atención y cuidado para cerciorarse de que la célula de levadura se hidrata de manera que la célula sea viable.

20 [0004] Tal y como se argumenta en la página 124, columna de la izquierda del libro de texto de Roger Boulton et al, 1996 - durante el proceso de secado de la producción de levadura seca activa, las membranas celulares de las células de levadura pierden su función de barrera de permeabilidad. Por lo tanto, para restablecer esta función, resulta importante rehidratar las membranas añadiendo la levadura a agua a 40 °C durante 20 minutos. Por lo tanto, el proceso de rehidratación de la levadura implica típicamente una rehidratación de 20-30 minutos en agua no clorada o en una mezcla de agua/zumo de uva (2:1) a una temperatura de 35-38 °C seguida de la adición de zumo de uva del mismo volumen (mezcla de zumo/agua 50:50), el cual se mantiene durante otros 20-30 minutos antes de añadirlo al vino. Es importante que el zumo de uva no contenga SO₂, que podría matar las células de levadura durante el proceso sensible de rehidratación (O'Kennedy, 2008). Además, la mezcla de la rehidratación se debe enfriar con zumo después de estar 20 min en el agua, de 5 en 5 °C. No enfriar la mezcla desde la temperatura de rehidratación pasados 30 minutos también puede suponer una muerte celular significativa (O'Kennedy, 2008). Además, se debe tener cuidado con usar zumo de uva sin contaminar para el protocolo de rehidratación, ya que la rehidratación con zumo de uva contaminado dará lugar a la contaminación de toda la fermentación del vino inoculada utilizando la mezcla de rehidratación. Diferentes fabricantes proponen variaciones en este protocolo, pero la etapa fundamental radica en que las células deshidratadas necesitan exponerse al agua o a una mezcla de agua/zumo a temperaturas y condiciones específicas y durante tiempos específicos para que se hidraten adecuadamente, y se evita así la muerte celular y la consecuente inactividad. No se recomienda añadir la levadura seca activa directamente al vino, dado que la alta concentración de azúcar, SO₂ y otros compuestos en el zumo de uva no permiten una rehidratación óptima de la levadura. Por esta razón, ninguno de los fabricantes de levadura de vino propone la inoculación directa de la levadura seca activa al mosto de uva.

[0005] Como sabe la persona cualificada, en el presente contexto el término zumo de fruta y mosto de fruta se consideran lo mismo y estos términos pueden usarse indistintamente en el presente documento.

40 [0006] Como se describe en Soubeyrand et al. 2006 - la levadura seca activa (liofilizada) pierde actividad cuando no se rehidrata óptimamente. Una rehidratación incorrecta de la levadura seca activa puede también llevar a una parada de la fermentación alcohólica (O'Kennedy, 2008). Por lo tanto, la rehidratación de la levadura seca activa requiere una cantidad significativa de tiempo y concentración y exige normalmente un gran número de horas de trabajo de personal cualificado en una bodega comercial durante el proceso de elaboración del vino.

45 [0007] EP1645198A1 (Minaki Advance Co Ltd, Japón); EP2090647A1 (Chr. Hansen); y WO2009/095137A1 (Chr. Hansen) se pueden considerar como estado de la técnica previo relevante en el presente documento. Sin embargo, ninguno de esos documentos previos del estado de la técnica describe un método donde la levadura se añada en forma congelada a un zumo de frutas antes de la fermentación.

50 [0008] La presente invención se refiere a un método innovador para inocular levadura en zumo de frutas o fruta, por la cual los inconvenientes anteriormente mencionados se pueden evitar. Los inventores descubrieron que, sorprendentemente, un cultivo congelado (cultivo iniciador congelado) de levadura se puede añadir directamente al zumo de uva y al mismo tiempo mantener un alto índice de supervivencia de las células de levadura.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 [0009] La presente invención proporciona un nuevo producto de levadura de vino en forma congelada. El producto se produce en un fermentador, se concentra y se añaden crioprotectores. Entonces esta mezcla se congela a -50 °C en recipientes adecuados. Lo que hace que este producto sea único es, además del hecho de que está congelado, que se puede añadir directamente al zumo de uva, ya que no se necesita rehidratación debido a que la levadura no se deshidrató en el proceso de producción. El producto se encuentra actualmente en forma de bolsa isotérmica (bolsa térmica de plástico) que contiene 1 kg de cultivo celular de levadura congelada.

10 [0010] Tal y como se muestra en el ejemplo 1 del presente documento, cuando se inocula directamente levadura congelada, para sorpresa de los presentes inventores, se observó solo una reducción relativamente pequeña en la cantidad de células en comparación con la levadura seca activa, donde se observó una reducción mucho mayor en la cantidad de células cuando se inocula directamente en comparación con la correcta rehidratación. Por lo tanto, esta característica hace que la levadura congelada sea adecuada para la inoculación directa, un proceso simple donde una persona inexperta puede abrir el recipiente y directamente añadir el contenido al zumo de uva, sin arriesgarse a una muerte celular significativa y a la consecuente pérdida de actividad, como es el caso de la levadura seca activa. Además, la inoculación directa de levadura previene el potencial deterioro de las fermentaciones del vino por mezclas de rehidratación contaminadas.

[0011] Por consiguiente, basándonos en este hallazgo sorprendente, se puede por tanto entender que el uso de levadura congelada puede ser altamente ventajoso para la producción de vino según la presente invención.

20 [0012] Otra ventaja es que la inoculación directa se traduce en un ahorro significativo de tiempo y mano de obra para los productores de vino, ya que la rehidratación de la levadura seca activa puede llevar hasta una hora y necesita una persona cualificada que prepare sustratos altamente específicos de rehidratación y la inoculación directa de levadura congelada toma unos pocos minutos y no requiere habilidades o preparación especial, sencillamente añadir el producto al zumo de uva o uvas trituradas.

25 [0013] Los resultados proporcionados aquí han sido obtenidos usando la levadura de vino *Pichia kluyveri*. La persona cualificada puede fácilmente transferir la tecnología a otros tipos de levadura, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus*, o *Torulaspora delbreuckii*, *Kluyveromyces thermotolerans*, etc.

30 [0014] El producto también se podría aplicar para producir otras bebidas que no sean vino, tales como cerveza, sidra, sake, kéfir, refrescos y bebidas en las que la acción de la levadura concreta se requiere y se aplica en forma de inoculación directa conveniente. El cultivo iniciador se puede utilizar para fermentar cualquier tipo de medio basado en azúcar, como el zumo de uva, o zumo de manzana, o alternativamente, frutas enteras.

DIBUJOS

[0015] Figuras 1 y 2: estas figuras muestran resultados experimentales relevantes en el presente documento como se argumenta en detalle en el ejemplo práctico 1 del presente documento.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0016] La presente invención se refiere a:

Un método para la producción de una bebida que comprende las fases siguientes:

- 40 a) proveer una fruta o material vegetal,
b) añadir levadura para fermentar dicha fruta o material vegetal,

donde la levadura se añade en forma congelada o donde la levadura congelada se descongela para obtener levadura en forma líquida antes de añadirla a la fruta o material vegetal.

45 [0017] Estos son algunos de los aspectos particulares de la invención:

50 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para inocular una levadura en un zumo de frutas o en una fruta. Dicha levadura provocará una fermentación, y el producto de esta fermentación se puede utilizar en la industria alimentaria, o más específicamente en la industria de bebidas. Las bebidas que se contemplan son, por ejemplo, el vino, la cerveza, la sidra u otras bebidas que se producen fermentando una fruta o material vegetal, como el zumo de frutas, verduras, plantas o fruta. Ejemplos

de fruta o material vegetal son las uvas, el zumo de uva, las manzanas o el zumo de manzana, o la cebada.

5 [0018] La levadura que se usa puede ser cualquier tipo de levadura que se use en la industria alimentaria o de bebidas. Algunos ejemplos son, por ejemplo, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus*, *Torulaspota delbreuckii*, o *Kluyveromyces thermotolerans* etc.

10 [0019] Es común usar levaduras en la industria del vino. Las levaduras típicas que se usan en la producción de vino son de la familia de levaduras *Saccharomycetaceae* (levaduras de tipo Ascomycota). Las levaduras del género *Saccharomyces* [por ejemplo la especie *Saccharomyces cerevisiae* (SC)] se usan comúnmente. Otras levaduras usadas son de la misma familia *Saccharomycetaceae*, pero de otros géneros como *Kluyveromyces* [por ejemplo la especie *Kluyveromyces thermotolerans* (KT)] y el género *Torulaspota* [por ejemplo la especie *Torulaspota delbreuckii* (TD)].

[0020] Para la inoculación para fermentar una fruta o material vegetal, se puede utilizar un cultivo de levadura pura (es decir un cultivo que contiene solo un tipo de levadura), pero también se puede usar como inoculante un cultivo mixto de dos o más tipos de levadura.

15 [0021] Para un cultivo iniciador mixto puede ser importante conocer la cantidad/proporción específica de cada especie de levadura en el cultivo iniciador final disponible comercialmente. Esto es particularmente cierto en un cultivo iniciador de vino que comprende *Saccharomyces*, *ssp. Kluyveromyces ssp.* y/o *Torulaspota ssp.*

20 [0022] El cultivo iniciador se puede producir fermentando levadura y a continuación cosechando la levadura mediante centrifugación. Esto produce una biomasa de levadura líquida. Típicamente, un fermentador de 1000 l produce aproximadamente 100 kg de "levadura en peso húmedo" en forma de una pasta líquida. Basado en el peso en húmedo, esta pasta contiene típicamente aproximadamente 10^{10} UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo. Después de la congelación, aproximadamente quedan 10^9 UFC por gramo.

25 [0023] Para proteger las células de las severas condiciones de congelación, se puede añadir un crioprotector después o antes de la centrifugación. Algunos ejemplos de crioprotectores son la glucosa, la sacarosa o la trehalosa.

[0024] Dichos crioprotectores se añaden típicamente en una cantidad de aproximadamente 5 %-20 %. La cantidad debería ser suficiente para mantener el número de UFC en aproximadamente 10^9 o más.

30 [0025] Después de añadir el crioprotector y recoger la biomasa de levadura líquida, la biomasa se transfiere a un recipiente adecuado, por ejemplo bolsas de plástico. Entonces estos contenedores se congelan a una temperatura de entre -10 °C y -60 °C. Se prefiere un intervalo de temperatura de entre -10 °C y -30 °C.

[0026] El método según la invención implica añadir el cultivo iniciador congelado al medio basado en azúcar en una cantidad que sea suficiente para iniciar y mantener la fermentación del material vegetal.

35 [0027] Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a un método para inocular levadura en zumo de frutas que comprende las fases siguientes:

- a) proveer un zumo de frutas en un recipiente; y
- b) añadir levadura en forma congelada en una cantidad que sea suficiente para iniciar y mantener la fermentación del zumo de frutas.

40 [0028] La persona cualificada en el presente contexto entendería que, cuando se añade levadura en forma congelada al zumo de frutas según la fase b) explicada anteriormente, no tiene lugar aquí una rehidratación de la levadura. Como sabe la persona cualificada, se puede llamar al método de la invención descrito en el presente documento método de inoculación directa.

45 [0029] En el ejemplo práctico 1 se explican experimentos acerca del uso de cultivos iniciadores de levadura congelada para la inoculación. Sorprendentemente, se ha observado que al descongelar el cultivo de levadura congelada antes de añadirlo al zumo de uva, la supervivencia de las células (UFC/ml) en el zumo de uva fue aún mayor que la que se consiguió cuando se inoculó directamente el cultivo de levadura congelada en el zumo de uva.

50 [0030] Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a un método para inocular levadura en zumo de frutas que comprende las fases siguientes:

- i) proveer un zumo de frutas en un recipiente;
- ii) proveer levadura en forma congelada;
- iii) descongelar la levadura congelada para obtener levadura en forma líquida; y
- iv) añadir la levadura en forma líquida en una cantidad que sea suficiente para iniciar y mantener la fermentación del zumo de frutas.

5

[0031] La persona cualificada en el presente contexto entendería que, cuando se descongela la levadura congelada para obtener levadura en forma líquida y luego se añade levadura en forma líquida al zumo de frutas según la fase iii) explicada anteriormente, no tiene lugar aquí una rehidratación de la levadura.

10

[0032] Como sabe la persona cualificada, la temperatura para la fermentación del zumo de fruta en una bodega se lleva a cabo típicamente a entre 15 y 25 °C. Por consiguiente, cuando en una bodega se añade levadura en forma congelada al zumo de frutas [es decir, según la etapa b) explicada anteriormente], a continuación se descongela la forma congelada de la levadura típicamente a una temperatura de entre 15 y 25 °C.

[0033] En el ejemplo práctico 1 del presente documento la temperatura de descongelación fue de 30 °C.

15

[0034] Sin limitarse a la teoría, se cree que se obtienen los mejores resultados si la temperatura de descongelación de la fase iii) explicada anteriormente es de entre 25 y 35 °C.

20

[0035] Como sabe la persona cualificada - la descongelación de la fase iii) explicada anteriormente se puede llevar a cabo, por ejemplo, añadiendo la levadura en forma congelada a, por ejemplo, agua o a una mezcla de zumo y agua, donde el agua o la mezcla de zumo y agua tiene una temperatura adecuada. Como sabe la persona cualificada, de este modo se obtendría levadura en forma líquida que se puede añadir al zumo de frutas según la fase iv) explicada anteriormente.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

25

[0036] La levadura seca activa usada en este ejemplo fue *Saccharomyces bayanus* B52 (Lesaffre). La levadura congelada usada en este ejemplo fue *Pichia kluyveri* (Chr. Hansen). Todas las inoculaciones se llevaron a cabo por triplicado, con el error típico indicado en los gráficos de barras en las figuras 1 y 2 más adelante. Después de la inoculación con levadura, la mezcla se agitó íntegramente para disolver el contenido antes de hacer las diluciones estándar para la distribución en placas. Para determinar el recuento de células de estos productos, se hicieron diluciones en el agua de peptona y se vertió 1 ml en placas de Petri, después de lo cual se vertió un agar con un medio de cultivo de levadura y glucosa (YGM) en forma líquida a 40 °C. Las placas se incubaron durante 3 días a 30 °C, después de lo cual se hizo el recuento de colonias. Las UFC/g tal y como se indica en las figuras 1 y 2 más adelante se calcularon basándose en la adición de LSA y levadura congelada al peso original.

30

35

[0037] Para determinar el recuento de células de levadura después de la inoculación en el medio de zumo de uva sintético, se siguió el mismo protocolo. Una cantidad de 50 g/l de levadura *Pichia kluyveri* congelada o descongelada se inoculó en 200 ml de medio de zumo de uva sintético a temperatura ambiente (21 °C). La levadura seca activa fue o rehidratada (20 min 37 °C, 1 g en 10 ml de agua no clorada), o pesada para llevar a cabo una inoculación directa con 0,3 g/L, que corresponden a $2 \cdot 10^6$ UFC/ml. Para conseguir la inoculación directa y la LSA rehidratada, la temperatura del mosto de uva sintético se ajustó a 30 °C para facilitar una mayor supervivencia debido a la diferencia de temperatura del inóculo y los medios.

40

45

[0038] El mosto de uva sintético se preparó según Costello et al. 2003 con una concentración de azúcar de 250g/L y un pH de 3,5. Después de la inoculación, se llevaron a cabo diluciones en agua de peptona y se vertió 1 ml en placas de Petri, después de lo cual se vertió un agar con un medio de cultivo de levadura y glucosa (YGM) en forma líquida a 40 °C. Las placas se incubaron durante 3 días a 30 °C, después de lo cual se hizo el recuento de colonias. Usando la cantidad de masa de levadura añadida al mosto de uva sintético y el valor UFC/ml obtenido del recuento de las placas, se pudo calcular un valor en UFC/gramo.

Ejemplo 1: Uso de levadura congelada - comparación con levadura liofilizada

50

[0039] La Figura 1 muestra los resultados del efecto perjudicial de la inoculación directa de la levadura seca activa (LSA) cuando se inocula directamente en el zumo de uva sintético (líneas horizontales) en comparación con la rehidratación en primer lugar de la levadura de LSA en el agua a 37°C durante 20 minutos y a continuación su inoculación en el mosto de uva sintético (líneas verticales). Después de la inoculación, se llevó a cabo el recuento de células mediante la distribución en placas y se usaron los datos para calcular un valor medio de UFC/g. Se calculó que la media de UFC/g de la levadura seca activa original fue de $2,40E + 10$ (punteado). La

5 inoculación directa de la levadura seca activa resultó en un valor UFC/g medio de $4,49E + 9$, lo cual significa que un 81,3 % de las células murieron debido a la inoculación directa. Sin embargo, cuando se rehidrató en primer lugar en agua a $37^{\circ}C$ durante 20 min y a continuación se inoculó en zumo de uva sintético, la media de UFC/g fue de $2,35E + 10$, lo cual significa que solo aproximadamente un 2,1 % de las células murieron después de la rehidratación y la inoculación.

10 [0040] La figura 2 muestra el efecto de la inoculación directa de la levadura congelada en mosto de uva sintético con y sin descongelación previa. El recuento de células del producto de levadura congelada original fue de $8,0E + 8$ (punteado). Después de la inoculación directa de la levadura congelada (sin descongelarla) en zumo de uva, el recuento de células fue de una media de $5,1E + 8$ (líneas horizontales) y después de descongelar y a continuación inocular en zumo de uva, el recuento de células fue de una media de $7,1E + 8$ (líneas verticales), lo cual significa que en la inoculación directa congelada (sin descongelarla) solo murieron un 36,3 % de células y en la inoculación directa congelada (después de la descongelación) solo murieron un 11,3 % de las células. Esto resulta muy favorable en comparación con la levadura seca activa, donde murieron un 81,3 % de las células, lo cual indica que la levadura congelada se puede usar para la inoculación directa sin que haya una pérdida significativa en el recuento de células y en la actividad consecuente.

Conclusiones:

20 [0041] Los resultados del ejemplo 1 indican que la levadura seca activa (liofilizada) pierde una cantidad significativa de células viables cuando se inocula directamente (sin rehidratarla) en comparación con la inoculación después de rehidratarla en el agua (a una temperatura específica) y en la dilución de zumo - es decir, estos resultados concordaron con los conocimientos previos del estado de la técnica que se han mencionado anteriormente.

[0042] Sin embargo, cuando se usa levadura congelada directamente inoculada, para sorpresa de los presentes inventores, solo se observó una reducción relativamente pequeña en la cantidad de células como en el caso anterior.

25 [0043] Por consiguiente, basándonos en este hallazgo sorprendente, se entiende que usar levadura congelada puede ser altamente ventajoso para la producción de vino según la presente invención.

[0044] Otra ventaja es que la inoculación directa conlleva un ahorro de tiempo significativo para los productores de vino ya que la rehidratación de la levadura seca activa puede tomar más de una hora y la inoculación directa de levadura congelada toma unos pocos minutos.

30 [0045] Como se indica en el ejemplo anterior, sorprendentemente, se ha descubierto que al descongelar en primer lugar el cultivo congelado y a continuación inocular directamente el zumo de uva, la supervivencia de las células (UFC/ml) fue aún mayor que lo que se consigue cuando se inocula directamente el cultivo de levadura congelada en el zumo de uva sin descongelarla primero.

REFERENCIAS:

35 [0046]

1. EP 1645 198

2. EP 2090 647

3. WO 2009/095137

40 4. Peter Costello, Paul Henschke and Andrew Markides (2003) Standardised methodology for testing malolactic bacteria and wine yeast compatibility. Australian Journal of Grape and Wine Research 9 (2): 127-137.

5. Roger Boulton, Vernon Singleton, Linda Bisson and Ralph Kunkee. 1996. Principles and Practices of Winemaking. pp. 124.

6. Karien O'Kennedy. (2008). How to avoid stuck fermentations, The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker. November, Issue 538, 103-105.

7. Virginie Soubeyrand, Anne Julien and Jean-Marie Sablayrolles (2006) Rehydration Protocols for Active Dry Wine Yeasts and the Search for Early Indicators of Yeast Activity *American Journal of Enology and Viticulture*. 57(4)474-480.

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de una bebida que comprende las fases siguientes:
 - a) proveer una fruta o material vegetal,
 - b) añadir levadura para fermentar dicha fruta o material vegetal,donde la levadura se añade en forma congelada o donde la levadura congelada se descongela para obtener levadura en forma líquida antes de añadirla a la fruta o material vegetal.
2. Método según la reivindicación 1, donde la bebida es vino, cerveza, sidra, sake, kéfir o refrescos.
3. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, donde la fruta o material vegetal es zumo de frutas.
4. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, donde la fruta o material vegetal es zumo de uva, y donde la bebida es vino.
5. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, donde la fruta o material vegetal es cebada, y donde la bebida es cerveza.
6. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, donde la levadura es seleccionada de entre los géneros *Saccharomycetaceae*, *Kluyveromyces* y *Torulaspota*.
7. Método según la reivindicación 5 o 6, donde la levadura es seleccionada de entre *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus*, *Torulaspota delbreuckii*, o *Kluyveromyces thermotolerans*.
8. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, donde la levadura en la forma congelada contiene un crioprotector.
9. Método según la reivindicación 8, donde el crioprotector está presente en una cantidad entre un 5 y un 20 por ciento.
10. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, donde la levadura congelada contiene al menos 10^9 UFC por gramo.
11. Método según una o más de las reivindicaciones anteriores, donde la levadura se puede obtener fermentando levadura, cosechando la levadura por centrifugación para proporcionar una biomasa de levadura líquida y congelando la biomasa de levadura líquida.

Figura 1.

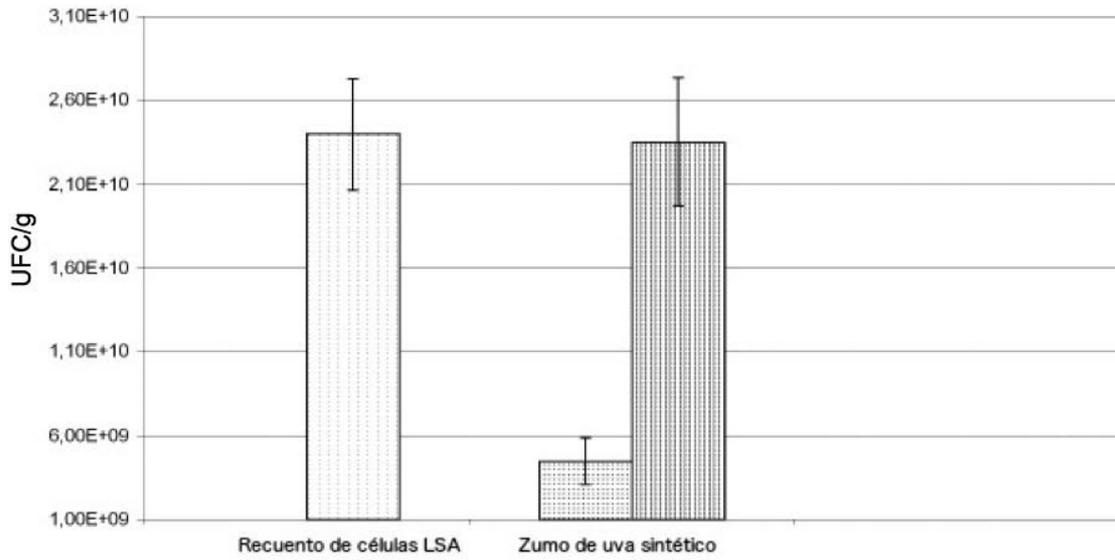


Figura 2:

