

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 745**

51 Int. Cl.:

C12C 12/00 (2006.01)

C12C 12/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014 PCT/EP2014/054415**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14135673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014 E 14709239 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2964742**

54 Título: **Producción de cerveza con bajo contenido en alcohol o sin alcohol con cepas de levadura de Pichia kluyveri**

30 Prioridad:

07.03.2013 EP 13158261

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

19.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SAERENS, SOFIE y
SWIEGERS, JAN HENDRIK**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 659 745 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

Producción de cerveza con bajo contenido en alcohol o sin alcohol con cepas de levadura de *Pichia kluyveri*

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de preparación de una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol por fermentación.

10 En concreto, la invención se refiere a un método de preparación de una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol con un contenido de alcohol de no más de 1.2% (vol/vol) y un contenido de acetato de isoamilo de al menos 0.5 ppm que incluye las etapas de a) proporcionar un mosto; y b) fermentar el mosto con al menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri* para obtener una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol bajo condiciones estériles y con *Pichia kluyveri* como las únicas especies de cepa de levadura adicionadas.

15 Antecedentes de la invención

[0002] Debido a la creciente demanda de alimentos y bebidas más saludables, la reducción de etanol en bebidas alcohólicas, especialmente, cerveza y vino es de un interés comercial considerable.

20 [0003] Las cervezas bajas en alcohol, sin alcohol o de alcohol reducido (también llamada cerveza ligera, sin alcohol, cerveza libre de alcohol, cerveza pequeña, cerveza de alta fermentación pequeña, casi cerveza) son cervezas sin alcohol o un contenido de alcohol bajo cuyo objetivo es reproducir el sabor completo de cervezas estándar que normalmente contienen más del 4% de (vol/vol) de alcohol.

25 En la mayor parte de cervezas de países de la UE con bajo contenido de alcohol se dividen en cervezas sin alcohol que no contienen más del 0.5% (vol/vol) de alcohol y en cervezas de bajo contenido en alcohol sin más del 1.2% (vol/vol) de alcohol.

En Estados Unidos, cerveza sin alcohol significa que no presenta alcohol, mientras el límite superior de 0.5% (vol/vol) alcohol corresponde a cerveza denominada sin alcohol o casi cerveza (Montanari et al. 2009).

30 [0004] La conversión de mosto en una cerveza alcohólica es el resultado de un proceso de fermentación por levadura *Saccharomyces ssp.* dando como resultado la producción de alcohol y compuestos de sabor derivados de fermentación, tales como ésteres (por ejemplo, acetato de isoamilo) y alcoholes más altos.

El acetato de isoamilo es un compuesto de sabor clave en la cerveza (Saerens et al. 2010).

35 La combinación del sabor de las materias primas, en su mayoría malta y frutos del lúpulo, con el proceso de fermentación produce el sabor único y gusto a cerveza (Swiegers et al. 2007, Saerens et al. 2010).

[0005] Hoy cervezas con bajo contenido alcohólico frecuentemente se hacen produciendo cerveza de alta graduación (con una concentración alcohólica de por encima de 4% (vol/vol)) y luego eliminando el alcohol por procesos físicos (ebullición del alcohol/destilación u ósmosis inversa).

40 En el caso de algunas cervezas no alcohólicas o sin alcohol no tiene lugar ninguna fermentación y en algunos casos las cervezas se producen sencillamente diluyendo cervezas de alta graduación con agua.

45 Como los procesos físicos suponen la evaporación, pérdida o dilución de compuestos de sabor derivados de fermentación (o una falta completa de compuestos de sabor derivados de fermentación como en el caso con cerveza sin alcohol no fermentada o sin alcohol), estos tipos de cervezas son frecuentemente caracterizados como menos sabrosas que la cerveza de alta graduación o pueden tener un sabor tipo mosto indeseable (Zufall y Wackerbauer. 2000).

[0006] La patente alemana DD 288619 A5 describe el uso de cepas de levadura *Pichia farinosa* para fermentar un mosto de cerveza no lupulizada para obtener una bebida sin alcohol con aroma afrutado.

50 [0007] Sin embargo, existe la necesidad de métodos mejorados para preparar una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol fermentada donde se mejora la presencia de compuestos de sabor deseable, tales como ésteres y alcoholes más altos.

55 Resumen de la invención

[0008] La presente invención se basa en conclusiones sorprendentes por los inventores los cuales cepas de levadura *Pichia kluyveri*, solo capaces de fermentar la glucosa en el mosto de cerveza, es capaz de producir concentraciones altas de compuestos de sabor deseable con una producción solo pequeña de etanol.

60

[0009] Las levaduras de elaboración de cerveza de *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces carlsbergensis* y *Saccharomyces cerevisiae* utilizan ambas glucosa al igual que maltosa, los azúcares principales en el mosto (Boulton y Quain. 2010) que dan como resultado la formación de alcohol y compuestos de sabor durante la fermentación.

5 Para producir menos alcohol, una solución es usar una levadura que solo fermenta glucosa y no maltosa, así solo produce alcohol de la glucosa.

La glucosa está presente en concentraciones muy inferiores a maltosa en el mosto (tabla 1) y por lo tanto menos alcohol se producirá de la misma cantidad de mosto en comparación con cuando se usa una levadura de elaboración de cerveza convencional, por ejemplo *Saccharomyces pastorianus* o *Saccharomyces carlsbergensis*.

10 Estos tipos de levaduras existen y los ejemplos incluyen ciertas cepas de levadura *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*, tales como *Saccharomyces ssp* (Liu et al. 2011).

Sin embargo, solo una cantidad relativamente pequeña de sabor se producirá por estas cepas de levadura de la cantidad limitada de glucosa dando como resultado una cerveza con concentraciones de compuestos más bajas de sabor clave que cervezas con más del 4% (vol/vol) de alcohol.

15

Tabla 1. Espectro de azúcar típico de mosto (Stewart. 2010)

Porcentaje de composición	
Glucosa	10 - 15
Fructosa	1 - 2
Sacarosa	1 - 2
Maltosa	50 - 60
Maltotriosa	15 - 20
Dextrinas	20 - 30

[0010] Una manera de solucionar este problema es identificar una levadura altamente aromática, que no es capaz de utilizar maltosa, para producir altas concentraciones de compuestos de sabor derivados de fermentación importante de cantidades limitadas de glucosa, dando como resultado concentraciones más altas o similares de compuestos de sabor clave que cuando la fermentación completa tiene lugar.

20 Los inventores de la presente invención han descubierto que usando este método y cepas de levadura *Pichia kluyveri* es posible producir cerveza sin alcohol y cerveza con bajo contenido en alcohol (según la legislación UE) con el mismo sabor que cervezas estándar, de alta graduación.

25 Esto no es posible utilizando levadura de elaboración de cerveza convencional tal como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* o *Saccharomyces carlsbergensis*, dilución, procesos de eliminación de alcohol físico o cervezas no producidas de sustratos no fermentados.

[0011] Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de preparación de una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol con un contenido en alcohol de no más de 1.2% (vol/vol) y un contenido de acetato de isoamilo de al menos 0.5 ppm que incluye las etapas de:

- 30 a) proporcionar un mosto; y
 b) fermentar el mosto con al menos una cepa de levadura *Pichia kluyveri* para obtener una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol bajo condiciones estériles y con *Pichia kluyveri* como las únicas especies de
 35 cepa de levadura añadidas.

Breve descripción de los dibujos

[0012]

40 La Figura 1 ilustra un proceso de elaboración de cerveza optimizado para cerveza *Pichia kluyveri*. La comparación de la (izquierda) estándar contra el proceso de elaboración de cerveza de (derecha) *Pichia kluyveri*.

Las etapas que son diferentes del proceso de elaboración de cerveza de estándar se subrayan.

45 La Figura 2 ilustra la comparación de perfil de sabor de 5 cervezas sin alcohol diferentes: 3 horses. Hollandia, Bavaria (todos con 0% alcohol) y las cervezas producidas con la cepa *Pichia kluyveri* A (0.1% (vol/vol) alcohol) y cepa B (0.2% (vol/vol) alcohol).

La cerveza Carlsberg pilsner con 4.6 % (vol/vol) alcohol se usó como una cerveza de pilsner de referencia y otras dos cervezas de pilsner se muestran también: Stella (5.2% (vol/vol) alcohol) y Heineken (5.0% (vol/vol) alcohol). 5 compuestos de sabor diferentes se midieron con headspace GC-FID: acetato de isoamilo, alcohol de isoamilo, butirato de etilo, octanoato etilo y hexanoato etilo.

50 Las concentraciones de compuesto de sabor en la cerveza Carlsberg pilsner fueron usadas como una referencia y fueron estandarizadas para ser 1. Las concentraciones de sabor en todas las cervezas se aplicaron en la misma escala con el objetivo de ser capaces de comparar los dos valores.

La Figura 3 muestra la comparación de perfil de sabor de 4 cervezas diferentes: cerveza sin alcohol con cepa de *Pichia kluyveri* A (0.1% (vol/vol) de alcohol), cerveza de bajo contenido en alcohol con cepa A *Pichia kluyveri* (0.7% (vol/vol), de alcohol) cerveza Carlsberg pilsner (4.6% (vol/vol) alcohol) que se usó como una cerveza de pilsner de referencia (control) y cerveza de malta (1.8% (vol/vol) alcohol). 5 Compuestos de sabor diferente se midieron con headspace-GC-FID: acetato de isoamilo, alcohol de isoamilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo.

Las concentraciones de compuesto de sabor en la cerveza de pilsner de Carlsberg se usaron como una referencia y fueron estandarizados para ser 1. Las concentraciones de sabor en las 3 cervezas se aplicaron en la misma escala con el objetivo de ser capaces de comparar los valores.

La Figura 4 ilustra las concentraciones de diacetil en las pruebas de cerveza con una cepa de *Pichia kluyveri* A y una levadura de cerveza de *Saccharomyces cerevisiae*.

La Figura 5 representa el crecimiento de célula de levadura durante la fermentación.

La Figura 6 muestra decanoato de etílico de acetato de isoamilo y concentraciones de acetato de feniletilo en todos los productos de fermentación con *Saccharomyces ludwigii* y *Pichia kluyveri*, como wll en el mosto básico (con y sin frutos del lúpulo). w/o = sin.

La Figura 7 ilustra acetato de isobutilo y concentraciones de acetato de butilo en todos los productos de fermentación con *Saccharomyces ludwigii* y *Pichiakluyveri*, al igual que en el mosto básico (con y sin frutos de lúpulo). w/o = sin.

La Figura 8 muestra isobutanol, 1-butanol y concentraciones de alcohol de isoamilo en todos los productos de fermentación con *Saccharomyces ludwigii* y *Pichia kluyveri*, al igual que en el mosto básico (con y sin frutos del lúpulo). w/o = sin.

La Figura 9 representa concentraciones de ácido hexanoico, octanoico y decanoico en todos los productos de fermentación con *Saccharomyces ludwigii* y *Pichia kluyveri*, al igual que en el mosto básico (con y sin frutos de lúpulo). w/o = sin.

Descripción detallada de la invención

[0013] Los inventores de la presente invención han descubierto de forma imprevista que las cepas de levadura de *Pichia kluyveri* son capaces de mejorar la presencia de compuestos de sabor deseable en bebidas preparadas por fermentación de mosto con las cepas de levadura de *Pichia kluyveri*.

En particular, se ha observado que las concentraciones de compuestos de sabor deseable para cerveza, tal como acetato de isoamilo, alcohol de isoamilo y octanoato etilo fueron aumentadas.

Sorprendentemente, este realce de compuestos de sabor de cerveza está presente cuando las cepas de levadura de especies *Pichia kluyveri* se usan en ausencia de cepas de levadura de elaboración de cerveza convencionales, tales como cepas de levadura de los géneros *Saccharomyces* y *Brettanomyces*.

[0014] El proceso de elaboración de cerveza es bien conocido por la persona experta y se puede dibujar de la siguiente manera (ver Figura 1); malta es preparada de granos de cereal seco, germinado (principalmente cebada o trigo) y en base a una molienda que puede contener complementos no malteados.

La mezcla es molida (mezclada con agua y mojada) para permitir que las enzimas en la malta conviertan el almidón en azúcares.

Las partículas granulares y complementos se separan del mosto líquido en un proceso llamado filtración.

La fabricación de malta y etapas de maceración se pueden saltar añadiendo agua al extracto de malta.

Después de la adición de frutos de lúpulo y/o otros constituyentes tales como hierbas y azúcares, el mosto es hervido (los frutos de lúpulo también se pueden añadir después de la ebullición), enfriado y aireado.

El mosto luego se mueve a un tanque de fermentación y se fermenta por la adición de una levadura de cerveza.

La fermentación primaria, que dura típicamente 5 a 10 días se puede seguir por un paso de fermentación secundaria utilizando una levadura de cerveza.

Después de la fermentación, la cerveza fresca o cerveza "verde" se acondiciona, opcionalmente filtra y carbonata.

La cerveza se rellena en botellas y opcionalmente se pasteuriza.

[0015] Los frutos de lúpulo se pueden añadir al mosto para equilibrar el dulzor de la malta con amargor y proporcionar a la cerveza sabores y aromas deseables.

Existen diferentes variedades que incluyen pero no están limitadas a Ahtanum, Amarillo, Apollo, Bravo, Calypso, Cascade, Centennial, Chelan, Chinook, Citra, Cluster, Columbus, Comet, Crystal, El Dorado, Eroica, Galena, Glacier, Greenburg, Horizon, Liberty, Millenium, Mount Hood, Mount Rainier, Mosaic, Newport, Nugget, Palisade, San Juan, Santiam, Satus, Simcoe, Sonnet Golding, Sterling, Summit, Super Galena, Tillicum, Tomahawk, Ultra, Vanguard, Warrior, Willamette, Zeus, Admiral, Brewer's Gold, Bramling Cross, Bullion, Challenger, First Gold, Fuggles, Goldings, Herald, Northdown, Northern Brewer, Phoenix, Pilgrim, Pilot, Pioneer, Progress, Target, Whitbread Golding Variety (WGV), Hallertau, Hersbrucker, Saaz, Tettnang, Spalt, Ella, Feux-Coeur Francais, Galaxy, Green Bullet, Hallertau Aroma, Kohatu, Motueka, Nelson Sauvin, Pacific Gem, Pacific Jade, Pacifica, Pride of Ringwood, Rakau, Riwaka,

Southern Cross, Sticklebract, Summer, Super Alpha, Super Pride, Topaz, Wai-iti, Hallertau Herkules, Hallertau Magnum, Hallertau Taurus, Magnum, Merkur, Opal, Perle, Saphir, Select, Smaragd, Tradition, Bor, Junga, Lublin, Marynka, Premiant, Sladek, Strisselspalt, Styrian Atlas, Styrian Aurora, Styrian Bobek, Styrian Celeia, Styrian Golding, Sybilla, Tardif de Bourgogne y Sorachi Ace.

5 [0016] El método para la preparación de una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol con un contenido en alcohol de no más de 1.2% (vol/vol) y un contenido de acetato de isoamilo de al menos 0.5 ppm de la presente invención comprende las etapas de:

10 a) proporcionar un mosto; y
b) fermentar el mosto con al menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri* para obtener una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol bajo condiciones estériles y con *Pichia kluyveri* como las únicas especies de cepa de levadura añadidas.

15 [0017] El término "bebida con bajo contenido en alcohol" aquí se define como un líquido para beber con un contenido en alcohol superior a 0.5% (vol/vol) de alcohol y no más de 1.2% (vol/vol) de alcohol.

[0018] El término "bebida sin alcohol" aquí se define como un líquido para beber con un contenido de alcohol de no más de 0.5% (vol/vol) de alcohol.

20 [0019] El término "mosto" aquí tiene el significado convencional en la técnica y se refiere al líquido azucarado extraído del proceso de maceración de elaboración de elaboración de cerveza.

25 [0020] La concentración de glucosa en el mosto es crítica para el porcentaje de alcohol resultante de la bebida y se puede ajustar cambiando el proceso de maceración, añadiendo enzimas y por otros métodos conocidos por la persona experta.

[0021] En una forma de realización preferida, el mosto tiene una concentración de glucosa entre 0.01 % a 3% (W/vol), tal como entre 0.5% a 1.0% (w/vol).

30 [0022] La persona experta fácilmente será capaz de determinar una concentración de inoculación de la cepa de levadura de *Pichia kluyveri* adecuada para la preparación de una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol según el método.

35 En una forma de realización preferida, la cepa de levadura de *Pichia kluyveri* se inocula en una concentración de al menos 1×10^4 UFC/mL (unidades formación de colonia/ml), tal como al menos 5×10^4 UFC/mL, tal como al menos 1×10^5 UFC/mL, tal como al menos 5×10^5 UFC/mL, tal como al menos 1×10^6 UFC/mL, tal como al menos 5×10^6 UFC/mL.

40 [0023] En otra forma de realización preferida, el método además comprende la etapa de a1) adición al mosto de al menos una variedad de lúpulo antes de la fermentación del mosto con al menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri*.

45 [0024] En otra forma de realización preferida, la fermentación del mosto con la al menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri* se realiza durante al menos 7 días, tal como durante al menos 14 días, tal como durante al menos 21 días, tal como durante al menos 28 días.

[0025] En otra forma de realización preferida, la fermentación del mosto con la al menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri* se realiza a una temperatura de entre 18°C y 22°C.

50 [0026] En otra forma de realización preferida, el método además comprende la etapa c) embotellado y pasteurización de la botella de la bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol.

[0027] Preferiblemente, la al menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri* es capaz de fermentar glucosa pero no maltosa o maltotriosa.

55 Esto se puede evaluar por el crecimiento de la cepa de levadura en un medio de cultivo con solo maltosa o maltotriosa.

60 [0028] En una forma de realización preferida, la menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri* se selecciona del grupo que consiste en *Pichia kluyveri* PK-KR1 (JT1.28 cepa A), que se depositó el 24 agosto 2006 en el National Measurement Institute, 541-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, by University of Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, bajo el número de registro V06/022711 y la *Pichia kluyveri* PK-KR2 (JT3.71), que fue depositada en 24 agosto 2006 en el National Measurement Institute, 541-65

Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, by University of Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, bajo el número de registro V06/022712.

5 [0029] Preferiblemente, la bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol es una cerveza con bajo contenido en alcohol o sin alcohol.

[0030] El término "cerveza" como se utiliza en este caso se refiere al menos a cervezas obtenidas a partir de trituraciones obtenidas a partir de cereales malteados al igual que trituraciones obtenidas a partir de cereales no malteados y trituraciones obtenidas a partir de una mezcla de cereales malteados y no malteados.
10 EL término "cerveza" también se refiere a cervezas preparadas con complementos y cervezas con todos los contenidos de alcohol posibles.

[0031] El término "cerveza con bajo contenido en alcohol" aquí se refiere a una cerveza con un contenido en alcohol superior a 0.5% y no mayor de 1.2% (vol/vol) de alcohol.
15

[0032] El término "cerveza con alcohol" aquí se refiere a una cerveza con un contenido en alcohol de no más de 0.5% ABV.

[0033] El método de la presente invención se refiere a proporcionar una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol, donde la bebida tiene una concentración de acetato de isoamilo de al menos 0.5 ppm (partes por millón; mg/L), tal como al menos 0.6 ppm, tal como al menos 0.7 ppm, tal como al menos 0.8 ppm, tal como al menos 0.9 ppm, tal como al menos 1.0 ppm, tal como al menos 1.2 ppm, tal como al menos 1.4 ppm, tal como al menos 1.6 ppm, tal como al menos 1.8 ppm, tal como al menos 2.0 ppm, tal como al menos 2.5 ppm, tal como al menos 3.0 ppm, tal como al menos 3.5 ppm, tal como al menos 4.0 ppm, tal como al menos 4.5 ppm, tal como al menos 5.0 ppm.
20
25

Preferiblemente, la bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol tiene una concentración de octanoato etilo de al menos 10 ppb (partes por billón; µg/L), tal como al menos 11 ppb, tal como al menos 12 ppb, tal como al menos 13 ppb, tal como al menos 14 ppb, tal como al menos 15 ppb, tal como al menos 20 ppb, tal como al menos 25 ppb, tal como al menos 30 ppb, tal como al menos 40 ppb, tal como al menos 50 ppb, tal como al menos 60 ppb, tal como al menos 70 ppb, tal como al menos 80 ppb, tal como al menos 90 ppb, tal como al menos 100 ppb.
30

[0034] En una forma de realización preferida, la bebida tiene una concentración en alcohol superior a 0.5% (vol/vol) de alcohol y no más de 1.2% (vol/vol) de alcohol.

35 [0035] En otra forma de realización preferida, la bebida tiene una concentración en alcohol de no más de 0.5% (vol/vol) de alcohol.

[0036] Preferiblemente, la bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol es una cerveza con bajo contenido en alcohol o libre de alcohol.
40

Ejemplos

Ejemplo 1

45 Materiales y métodos

Configuración de fermentación

50 [0037] Tanto la cerveza con bajo contenido en alcohol como sin alcohol se produjeron con 2 cepas de *Pichia kluyveri* diferentes (cepa A y cepa B).

En total 2 pruebas han sido realizadas:

- 1) cerveza sin alcohol con cepa A y cepa B de *Pichia kluyveri* comparadas una con otra.
- 2) cerveza con bajo contenido en alcohol con *Pichia kluyveri*, cepa A.

55 [0038] La receta de elaboración de cerveza fue inicialmente la misma para ambas pruebas, salvo la adición de lúpulo. La cerveza sin alcohol se produjo en una escala de 1500 litros.

Las cervezas con bajo contenido en alcohol con *Pichia kluyveri*, cepa A y cepa B se produjeron en una escala de 1000 litros.

60 La base para todas las cervezas fue una mezcla de 4 tipos diferentes de malta: malta pilsner 20%, malta de trigo 38%, malta de Múnich 38% y malta Cara 50 4%.

La concentración de azúcar inicial se midió a 8.3° Plato con un Alcoalyzer Beer de Anton Paar.

[0039] Todas las cepas de levadura fueron inoculadas a 5×10^6 UFC/mL.

5 [0040] Para la cerveza sin alcohol, con una comparación entre cepa A y cepa B de *Pichia kluyveri*, solo se usó extracto de lúpulo para el amargor.
La fermentación se efectuó a 20°C durante tres semanas.

10 [0041] Para la cerveza con bajo contenido en alcohol, el extracto de lúpulo se usó para el amargor y al final de la cocción de mosto, los frutos del lúpulo Tettnang y Amarillo se usaron como frutos del lúpulo aromático.
La fermentación se efectuó a 21°C. La fermentación se efectuó durante tres semanas y en medio de la fermentación, los frutos del lúpulo Tettnang y Amarillo se añadieron como infrutescencias (conos) del lúpulo para lupulización en seco.
La temperatura de fermentación bajó a 4°C en el curso de la lupulización en seco.

15 [0042] Después de la fermentación, todas las cervezas se enfriaron hasta 4°C durante diferentes días, se filtraron y pasteurizaron.
La cerveza luego se rellenó en botellas.

20 [0043] La concentración de glucosa inicial fue > 1% en la primera prueba, pero alrededor de 0.5% en las últimas dos pruebas y la concentración de glucosa disminuyó muy lentamente durante la fermentación.
Al final de la fermentación, casi toda la glucosa fue consumida por la levadura y convertida a etanol.

[0044] Una visión de conjunto del proceso de elaboración de cerveza se da en la figura 1, donde este se compara con un proceso de elaboración de cerveza normal.

25 Las etapas importantes en el proceso de elaboración de cerveza 'nuevo' son:

- 1) reglaje de las condiciones de maceración para optimizar la concentración de glucosa en el mosto
- 2) asegurar que el fruto de lúpulo añadido es estéril, utilizando así gránulos de lúpulo o extractos de lúpulo, ninguna lupulización en seco, como puede resultar en la contaminación de la cerveza final
- 3) un tiempo de fermentación más largo para optimizar el perfil de sabor de la cerveza
- 30 4) pasteurización de botellas para evitar el riesgo de contaminación debido al nivel de maltosa alta en la cerveza final.

[0045] Como las cepas de *Pichia kluyveri* son cepas de fermentación muy lentas, resulta importante mantener el mosto y la cerveza estériles.

35 Cualquier adición de frutos del lúpulo debería hacerse de una manera estéril, lo que significa al menos 30 min. antes del fin de ebullición del mosto.

La lupulización en seco (adición de frutos del lúpulo después de la ebullición) no debería ser usada para la producción de cervezas con bajo contenido en alcohol o sin alcohol, ya que existe el riesgo de contaminar la cerveza. Como queda una cantidad de azúcar en la cerveza final, se debería tener un cuidado extra para evitar alteraciones

40 Prueba de elaboración de cerveza Lab

[0046] Las pruebas de fermentación a escala laboratorio fueron efectuadas en 500 ml de mosto.
El mosto se preparó con extracto de malta de trigo (Brewferm). El extracto de malta se mezcló con agua para alcanzar un contenido de azúcar inicial de 10°P (Plato) medido con un Alcozyzer Beer de Anton Paar.
45 Los gránulos de lúpulo Amarillo se añadieron en un filtro de café cerrado al mosto y este se hirvió durante 30 min. para extraer el sabor a lúpulo y para añadir amargor a la cerveza.
Los gránulos de lúpulo se añadieron para alcanzar 23 EBU (unidades de amargor europeas).
50 Después de la ebullición, el filtro de café se eliminó del mosto y el mosto fue transferido a botellas de 1L, que fueron cerradas por cierres hidráulicos.
La fermentación se efectuó a 20°C. Después de 5 días de fermentación se tomó una muestra para medición de diacetil.

55 Análisis de sabor

[0047] La cromatografía de gases de espacio de aire acoplada con la detección de ionización de llama (HSGC-FID) se usa para la medición de ésteres de acetato, ésteres etilos y alcoholes más altos en las muestras.

Las muestras se analizan con un sistema Perkin Elmer calibrado GC con un muestreador de espacio de aire.

El GC se equipa con una columna HP-FFAP (25 m x 0.20 mm x 0.33 µm, Agilent Technologies, Germany).

60 El inyector split-splitless se usa y se mantiene a 180°C. Las muestras se calientan durante 30 min. a 70°C en el automuestreador de espacio de aire antes de la inyección (temperatura de aguja: 110°C).

El helio se usa como el gas portador.

El programa SOF funciona de la siguiente manera: después del inicio a 60°C, la temperatura del horno se eleva después de 2 min. De 60°C a 230°C a 45°C/min y finalmente se mantiene a 230°C durante 5 min. Durante el programa de GC se mantiene un caudal constante (10 mL/min) del gas portador (He).

5 La temperatura FID se mantiene constante a 220°C. Los resultados se analizan con el software Turbochrom.

[0048] El espacio de aire GC-MS se usó para el análisis de diacetil.

10 En principal, este método es el mismo que el método usado para detectar compuestos de sabor, pero una división extra transporta helio adicional, lo que lleva a un caudal aumentado y da como resultado una concentración más alta del compuesto en la columna.

Otras diferencias fueron que el frasco presurizado actúa durante 0.03 min. como un almacenamiento de gas portador y el GC programa comienza a una temperatura de 90°C.

Etanol y análisis de densidad

15 [0049] El etanol y análisis de densidad se realizó con un sistema de análisis AlcoLyzer Beer de Anton-Paar.

Resultados

20 [0050]

Tabla 2: concentraciones (en ppm; mg/L) de butirato de etilo, acetato de isoamilo, alcohol de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo en 6 cervezas comerciales y cerveza preparada con cepa de *Pichia kluyveri* A y cepa de *Pichia kluyveri* B.

25

	Butirato de etilo	Acetato de isoamilo	Alcohol de isoamilo	Hexanoato de etilo	Octanoato de etilo
Carlsberg	1,10	1,00	34,0	0,04	0,10
Stella	2,14	0,71	50,0	0,11	0,10
Heineken	2,02	4,87	46,0	0,10	0,09
3 horses	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
Hollandia	0,00	0,26	3,2	0,00	0,00
Bavaria	0,00	0,18	2,0	0,00	0,00
Cerveza de malta	0,71	0,21	11	0,01	0,01
Pichia A – sin alcohol	0,43	1,96	2,00	0,03	0,12
Pichia B –	0,26	4,94	2,00	0,07	0,13

sin alcohol					
Pichia A – baja en alcohol	0,27	2,50	1,80	0,02	0,13

Cerveza sin alcohol producida por el uso de *Pichia kluyveri* durante la fermentación

30 [0051] Para producir una cerveza sin alcohol, un proceso de elaboración de cerveza se efectuó con cepas de levadura de *Pichia kluyveri* (ver materiales y métodos).

Las cepas de *Pichia kluyveri* se usaron para producir una cerveza con un porcentaje de alcohol de menos del 0.5%. En términos europeos, esta se considera una cerveza sin alcohol.

Esta prueba de elaboración de cerveza se realizó en una escala de 1000 litros, con *Pichia kluyveri* cepa A y cepa B y una temperatura de fermentación ligeramente inferior de 20°C (ver figura 1 para detalles de proceso de elaboración de cerveza).

5 Toda la glucosa se consumió al final de la fermentación y la cerveza producida con la cepa A tuvo un porcentaje alcohólico de 0.1%.

La cerveza producida con cepa B tuvo un porcentaje de alcohol de 0.2%.

El tiempo de fermentación fue tres semanas.

Las dos cervezas finales fueron usadas para análisis de sabor.

10 Para tener una idea del perfil de sabor de cervezas sin alcohol comercial, 4 cervezas sin alcohol comercial fueron incluidas en el análisis de sabor.

Las 3 cervezas fueron 3 horses, Hollandia y Bavaria.

Los constituyentes siguientes se mencionaron en las cervezas:

- cerveza sin alcohol clásica 3 horses: agua, cebada, malta, maíz y frutos de lúpulo.
- cerveza sin alcohol de malta Hollandia: agua, cebada, malta, maltosa y extracto de frutos de lúpulo.
- 15 - cerveza sin alcohol Bavaria: agua mineral pura, malta de cebada, maltosa y frutos de lúpulo.

Como control, se usó el perfil de sabor de una cerveza Carlsberg pilsner (4.6% (vol/vol) de alcohol).

Para comparar las cervezas de prueba fermentadas con *Pichia kluyveri* con otras cervezas pilsner comerciales, se midió el perfil de sabor de 2 otras cervezas pilsner: cerveza de baja concentración Stella premium (5.2% (vol/vol) de alcohol) y cerveza de baja fermentación Heineken (5.0% (vol/vol) de alcohol).

20 Como se puede observar desde la lista de arriba, los constituyentes principales para las cervezas sin alcohol son agua, malta (a veces con cebada no malteada como complemento) y frutos de lúpulo.

Estos son los mismos constituyentes principales que en las pruebas con *Pichia kluyveri*.

25 [0052] El resultado del análisis de sabor se representa en la figura 2. Se muestran las concentraciones de los 5 compuestos de sabor acetato de isoamilo, alcohol de isoamilo, butirato de etilo, octanoato de etilo y hexanoato de etilo y octanoato de etilo, cada una estandarizada de modo que la concentración del compuesto de sabor respectivo para la cerveza Carlsberg pilsner es 1.

30 [0053] La Figura 2 muestra claramente que todas las cervezas sin alcohol comerciales tienen una concentración muy baja de compuestos de sabor de cerveza típicos, cuando se compara con la cerveza de Carlsberg pilsner y en comparación con otras tres cervezas pilsner.

Sin embargo, la cerveza producida con *Pichia kluyveri* tiene niveles similares de compuestos de sabor de cerveza específicos como la cerveza pilsner de referencia, en particular, alcohol de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo.

35 El butirato de etilo estaba presente en cantidad inferior (mitad de la concentración) y acetato de isoamilo estaba presente en cantidades más altas (concentración de dos o más).

Cuando se compara con las otras cervezas pilsner, parece que la concentración de acetato de isoamilo en la cerveza de *Pichia kluyveri* sigue siendo más alta, al igual que las concentraciones de octanoato de etilo.

40 Sin embargo, butirato de etilo y concentraciones de hexanoato de etilo fueron más altas en las cervezas pilsner que en la cerveza de *Pichia kluyveri*.

Estos compuestos están presentes en concentraciones muy bajas en la cerveza y son menos importantes en comparación con concentraciones de acetato de isoamilo.

Las concentraciones de alcohol de isoamilo no difieren mucho entre la cerveza de *Pichia kluyveri* y las cervezas pilsner, pero estaba prácticamente ausente en las cervezas sin alcohol.

45 Cuando el perfil de sabor general de la cerveza de *Pichia kluyveri* es en comparación con cervezas sin alcohol o pilsner, parece que el perfil de sabor de la cerveza *Pichia kluyveri* está más cerca de una cerveza con 4.6-5.2% (vol/vol) de alcohol que el perfil de sabor según cualquiera de las cervezas sin alcohol comercial medidas.

[0054] Como estos compuestos de sabor tienen un sabor afrutado similar funcionan en sinergia.

50 La cata de la cerveza *Pichia kluyveri* reveló que el sabor fue muy de tipo a cerveza y esta cerveza se prefirió sobre las cervezas sin alcohol comerciales por un panel de sabor que consiste en cerveceros y consumidores de cerveza.

Cerveza con bajo contenido en alcohol producida con *Pichia kluyveri*

55 [0055] Esta cerveza se fermentó de 1500 litros de mosto y la temperatura de fermentación fue 21 °C (ver figura 1 para detalles de proceso de elaboración de cerveza).

Esta prueba se efectuó con *Pichia kluyveri* cepa A. Toda la glucosa se consumió al final de la fermentación y el nivel de etanol final fue 0.7%.

60 El tiempo de fermentación fue de tres semanas.

[0056] Como se puede observar de la figura 3, la cerveza sin alcohol y con bajo contenido en alcohol preparada con *Pichia kluyveri* cepa A tienen un perfil de sabor similar, lo que significa que la cerveza sin alcohol y con bajo contenido en alcohol están muy cerca de un perfil de sabor de cerveza pilsner normal.

5 Nuevamente los ésteres principales de acetato de isoamilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y alcohol de isoamilo determinan el perfil de sabor.

Medición de diacetil producida por *Pichia kluyveri*

10 [0057] Para estar seguros de que *Pichia kluyveri* no produce ningún sabor desagradable significativo en la cerveza, la producción del sabor desagradable más importante en la cerveza, diacetil, se midió en una prueba de elaboración de cerveza de laboratorio con solo *Pichia kluyveri* cepa A, en comparación con una cerveza con una cepa de cerveza de *Saccharomyces cerevisiae* (figura 4).

15 [0058] Está claro de la figura 4 que la *Pichia kluyveri* produce mucho menos diacetil en comparación con una cepa de elaboración de cerveza de *Saccharomyces cerevisiae*.

Thjs es importante como diacetil es frecuentemente considerado como un sabor desagradable en la cerveza.

Especialmente, en cervezas libres de alcohol y con bajo contenido en alcohol donde ningún alcohol está presente, el nivel de umbral de sabor de diacetil es probablemente muy inferior que en las cervezas normales de alta graduación.

20 **Conclusión**

[0059] Los resultados de perfil de sabor de las cervezas libres de alcohol y con bajo contenido en alcohol producidas con *Pichia kluyveri* muestran que esta cepa de levadura es idealmente adecuada para la producción de cervezas con poco o ningún alcohol.

25 Especialmente, la producción de una alta cantidad de ésteres, que viene de una concentración de glucosa muy baja es una propiedad especial vista en las cepas de *Pichia kluyveri*.

Junto con acetato de isoamilo, otros ésteres se mejoran, lo que da a las cervezas con poco o ningún alcohol un perfil de sabor tipo cerveza.

30 **Ejemplo 2**

[0060] *Saccharomycodes ludwigii* ha sido mencionado en Branyik et al. (2012) como el género más exitoso, diferente del *Saccharomyces*, usado para la producción industrial de cerveza sin alcohol.

35 [0061] Para comparar las propiedades de *Pichia kluyveri* con las propiedades de *Saccharomycodes ludwigii* para la preparación de cerveza con bajo contenido en alcohol se configuró un segundo experimento:

Materiales y métodos

40 **Levadura de cultivo**

[0062] Los dos cultivos de levadura (*Pichia kluyveri* cepa A y cepa de levadura *Saccharomycodes ludwigii*) fueron preparados en el YPD (2% glucosa, 1% peptona y 0.5% extracto de levadura), con un pH ajustado de 5.5. El medio YPD fue sometido a autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

45 [0063] Los cultivos de levadura fueron colocados en placas YGC (Sigma-Aldrich) y una colonia individual fue inoculada en un medio YPD de 5 ml.

Estos cultivos crecieron durante toda la noche en una incubadora de agitación a 30°C y fueron inoculados en 500 ml YPD. Después de 2 días, se tomó una muestra para cuentas celulares para poder inocular los cultivos de levadura en el mismo recuento de células inicial en el medio de mosto.

50 **Prueba de elaboración de cerveza en laboratorio**

[0064] Las pruebas de fermentación a escala laboratorio se efectuaron en 500 ml de mosto.

55 El mosto se preparó con extracto de malta de pilsner (Brewferm). El extracto de malta se mezcló con agua para alcanzar un contenido de azúcar inicial de 7°P (Platón) medido con un Alcozyzer Beer de Anton Paar.

En total, 10 litros de mosto se prepararon de esta manera.

[0065] En la primera configuración, el mosto fue hervido durante 60 minutos sin la adición de frutos de lúpulo.

60 En la segunda configuración,

[0066] 4.5 g de Amarillo, 4.5 g de Cascade y 2 g de Tettnanger gránulos de frutos de lúpulo se añadieron al mosto y se hirvieron durante 60 minutos para dar amargor. 10 Minutos antes del fin de la ebullición, 1.5 g Cascade, 1.5 g Amarillo y 1 g Tettnanger gránulos de frutos de lúpulo fueron añadidos como frutos del lúpulo de aroma.

5 [0067] Después de la ebullición, el mosto fue transferido a 2L botellas (1600 ml de mosto por botella), que fueron cerrados mediante cierres hidráulicos.

[0068] Los cultivos de levadura fueron inoculados a 1×10^6 UFC/mL y la fermentación se efectuó a 20°C. Después de 5 días de fermentación, una muestra se tomó para análisis de sabor.

10 Análisis de etanol

[0069] El etanol se midió con el equipo de bioanálisis enzimático de etanol Boehringer Mannheim.

15 Análisis de sabor

[0070] El análisis de sabor se efectuó a Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (Zaragoza, España). Los compuestos de aroma menor se expresan en $\mu\text{g/L}$ (ppb) y se miden con extracción de fase sólida y cromatografía de gases con la detección espectrométrica de masa, mientras los mayores compuestos de aroma se expresan en mg/L (ppm) y se miden con detección de ionización de llamas cromatográficas de gas después de la extracción de los compuestos en el diclorometano.

Resultados

25 [0071] Las fermentaciones de escala laboratorio se efectuaron en dos tipos de mosto de pilsner: mosto sin la adición de frutos de lúpulo y el mismo mosto pilsner con adición de frutos del lúpulo amargos y de aroma (Cascade, Amarillo y Tettnanger) (ver materiales y métodos).

Dos cepas de levadura diferentes fueron evaluadas: *Saccharomyces ludwigii* y *Pichia kluyveri*.

30 Los cultivos de levadura fueron inoculados a una concentración de células de 1×10^6 UFC/mL después del cultivo de estos en el medio YPD.

En total, 4 fermentaciones diferentes fueron efectuadas:

- 1) *Saccharomyces ludwigii* en el mosto sin frutos de lúpulo (S. Ludwigii w/o frutos del lúpulo)
- 2) *Saccharomyces ludwigii* en el mosto con frutos del lúpulo (S. Ludwigii con frutos del lúpulo)
- 3) *Pichia kluyveri* en el mosto sin frutos del lúpulo (P. kluyveri w/o frutos del lúpulo)
- 4) *Pichia kluyveri* en el mosto con frutos del lúpulo (P. Kluyveri con frutos del lúpulo)

35 4) *Pichia kluyveri* en el mosto con frutos del lúpulo (P. Kluyveri con frutos del lúpulo)

Todas las fermentaciones fueron efectuadas durante 5 días a 20°C.

[0072] Durante la fermentación, las cuentas celulares se midieron a diario para seguir el crecimiento de levadura (figura 5).

40 [0073] Está claro de la figura 5 que ambas cepas de levadura sobrevivieron en el mosto con y sin frutos del lúpulo. La *Pichia kluyveri* está claramente en crecimiento, en comparación con *Saccharomyces ludwigii*, que tiene un conteo de células estables durante toda la fermentación.

45 [0074] Después de 5 días, la concentración de etanol se midió en todos los productos de fermentación (tabla 3).

Tabla 3: concentración de etanol en todos los 4 productos de fermentación

Producto de fermentación	Etanol % /v/v)
S. ludwigii w/ o frutos de lúpulo	0.3
S. ludwigii con frutos de lúpulo	0.3
P. Kluyveri w/ o frutos de lúpulo	0.1
P. Kluyveri con frutos del lúpulo	0.1

50 [0075] La tabla 3 muestra que tanto ludwigii de *Saccharomyces* como *Pichia kluyveri* producen cantidades muy bajas de etanol. La *Pichia kluyveri* parece mejor en la producción de ningún alcohol, ya que esta cepa crece a mayores cuentas celulares, pero produce menos alcohol, en comparación con *Saccharomyces ludwigii*.

55 [0076] Los productos de fermentación el día 5 fueron también analizadas para perfil de sabor (figuras 6, 7,8 y 9).

Los compuestos de sabor más importantes para cerveza son ésteres y alcoholes más altos.

[0077] Las figuras 6 y 7 muestran las concentraciones de éster en todos productos de fermentación final, al igual que en el mosto básico con y sin frutos de lúpulo.

5 Todas las concentraciones de éster son las máximas en los productos de fermentación con *Pichia kluyveri*, ambos con y sin frutos del lúpulo.

En el caso de isoamilo, feniletilo, isobutilo y acetato de butilo, *Pichiakluyveri* produce cantidades más altas de estos ésteres cuando ninguno de los frutos del lúpulo son agregados, en comparación con decanoato de etilo.

Especialmente los niveles de acetato de isoamilo y acetato de feniletilo son muy altos.

10 El acetato de isoamilo produce un aroma de plátano, mientras acetato de feniletilo produce un aroma más de flores, de miel.

Ambos compuestos de éster son compuestos deseados en la cerveza.

Cabe destacar que los resultados representados aquí son concentraciones de éster después de 5 días de fermentación y estas concentraciones se reducirán a lo largo del tiempo en una cerveza final.

15 Resulta importante tener concentraciones de éster altas para empezar, dando como resultado una cerveza afrutada para un periodo de tiempo más largo, ya que estos compuestos de éster se hidrolizan a lo largo del tiempo en la cerveza final.

[0078] Las concentraciones de alcohol de fusel, representadas en la figura 8 son bastante similares entre los productos de fermentación de *Saccharomyces ludwigii* y *Pichia kluyveri*.

20 Solo concentraciones de alcohol de isoamilo son más altas en los productos de fermentación con *Saccharomyces ludwigii*, probablemente porque este compuesto no se convierte en acetato de isoamilo, como es el caso en los productos de fermentación de *Pichia kluyveri*.

[0079] En la figura 9, se representan tres ácidos que son compuestos de sabor negativo en la cerveza.

Ácido decanoico especialmente da un sabor rancio cáseo a la cerveza y por lo tanto no es deseado.

Está muy claro que especialmente *Saccharomyces ludwigii* produce altas cantidades de estos ácidos, lo que las hace menos adecuadas para la producción de cerveza.

30 Conclusión

[0080] La prueba de elaboración de cerveza en laboratorio con las dos cepas de levadura no *Saccharomyces* diferentes indica claramente que *Pichia kluyveri* es más adecuado para la producción de cerveza sin alcohol, en comparación con *Saccharomyces ludwigii*.

35 La *Pichia kluyveri* produce menos alcohol, compuestos de éster más deseados y ácidos menos deseados, en comparación con *Saccharomyces ludwigii*.

Depósitos

40 [0081] La *Pichia kluyveri* PK-KR1 (JT1.28 o cepa A) y cepas PK-KR2 (JT3.71) fueron depositadas el 24 agosto 2006 en el National Measurement Institute, 51-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, by University of Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, y dados los números de registro V06/022711 y V06/022712 como se describe en la WO 2009/110807.

45 Referencias

[0082]

DD 288619

WO 2009/110807

50 Boulton, C.M. and Quain, D. 2010. Brewing yeast and fermentation. Blackwell publishing Ltd.

Branyik, T, Silva, D.P., Baszczyn, M., Lehnert, R., Almeida e Silva, J.B., 2012. A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. Journal of Food Engineering 108,493-506.

Liu, Y., Li, H., Du, J.-H. 2011. Non-alcoholic Beer Production by *Saccharomyces ludwigii*. Food Science, 32: 186-190.

55 Montanari, L., Marconi, O., Mayer, H., Fantozzi, P., 2009. Production of alcohol-free beer. In: Preedy, V.R. (Ed.), Beer in Health and Disease Prevention. Elsevier Inc., Burlington, MA, 61-75.

Saerens S.M., Delvaux F.R., Verstrepen K.J., Thevelein J.M. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Biotechnology 3:165-77.

60 Stewart, G. Wort glucose, maltose or maltotriose - do brewer's yeast strains care which one? Institute of Brewing and Distilling. Asia Pacific Section. 31st Asia Pacific Convention 2010. (<http://www.ibdasiapac.com.au/asia-pacific-activities/convention-proceedings/2010/results.html>)

Swiegers, J.H., S.M.G. Saerens, I.S. Pretorius. 2007. The development of yeast strains as tools to adjust the flavor of fermented beverage to market specifications. Havkin D. and Belanger F. *Biotechnology in flavor production*. Blackwell Publishing Ltd.

5 Zufall C, and Wackerbauer K. 2000. Process engineering parameters for the deacoholisation of beer by means of falling film evaporation and its influence on beer quality. *Monatsschrift fur Brauwissenschaft* 53:124-137.

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol con un contenido en alcohol de no más de 1.2% (vol/vol) y un contenido de acetato de isoamilo de al menos 0.5 ppm que incluye las etapas de
- 5 a) proporcionar un mosto y
b) fermentar el mosto con al menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri* para obtener una bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol bajo condiciones estériles y con *Pichia kluyveri* como la única especie de cepa de levadura adicionada.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de a1) adición al mosto de al menos una variedad de frutos de lúpulo antes de la fermentación del mosto con la al menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri*.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la fermentación del mosto con la al menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri* se realiza durante al menos 7 días.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la fermentación del mosto con la al menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri* se realiza a una temperatura de entre 18-22°C.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la etapa c) embotellado y pasteurización en la botella de la bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la al menos una cepa de levadura de *Pichia kluyveri* es capaz de la fermentación de glucosa pero no maltosa o maltotriosa.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la al menos una cepa de *Pichia kluyveri* se selecciona del grupo que consiste en la *Pichia kluyveri* PK-KR1 (JT1.28 o cepa A) cepa que fue depositada el 24 agosto 2006 en el National Measurement Institute, 541-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, por la University of Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, bajo el número de registro V06/022711 y la *Pichia kluyveri* PK-KR2 (JT3.71) que fue depositada el 24 agosto 2006 en el National Measurement Institute, 541-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, by University of Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, New Zealand, bajo el número de registro V06/022712.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la bebida con bajo contenido en alcohol o sin alcohol es una cerveza.
- 35

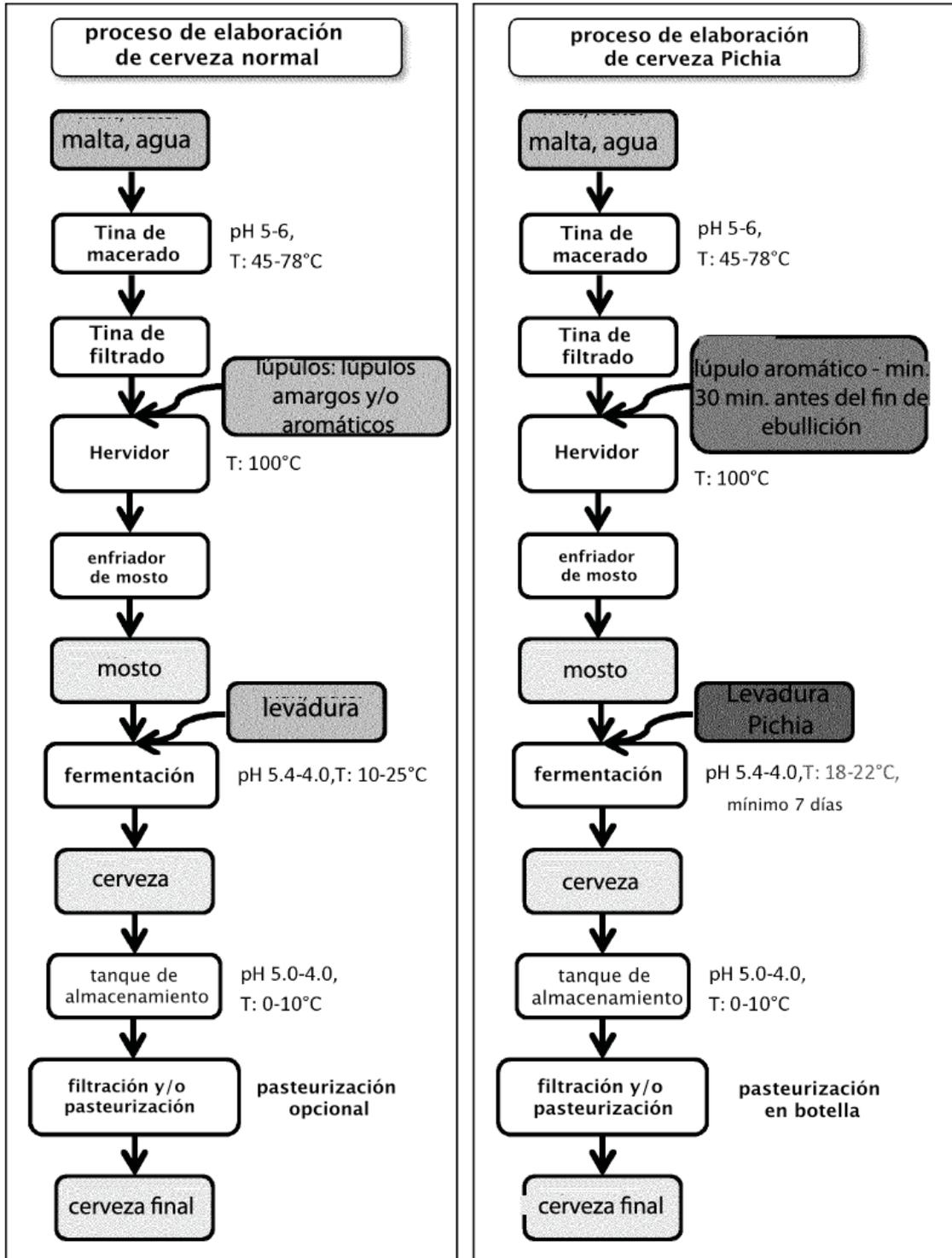


Figura 1

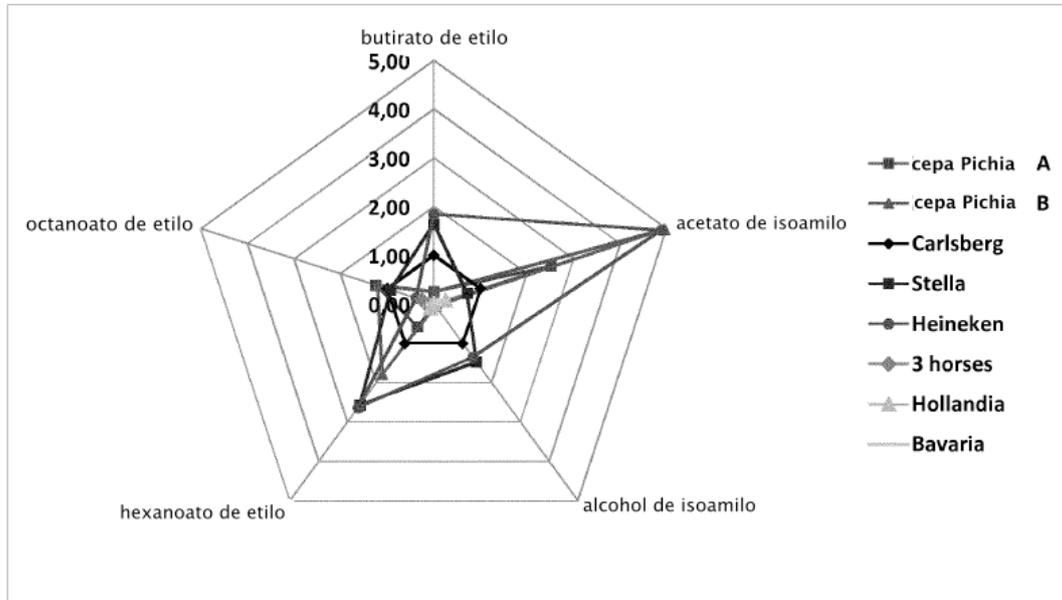


Figura 2

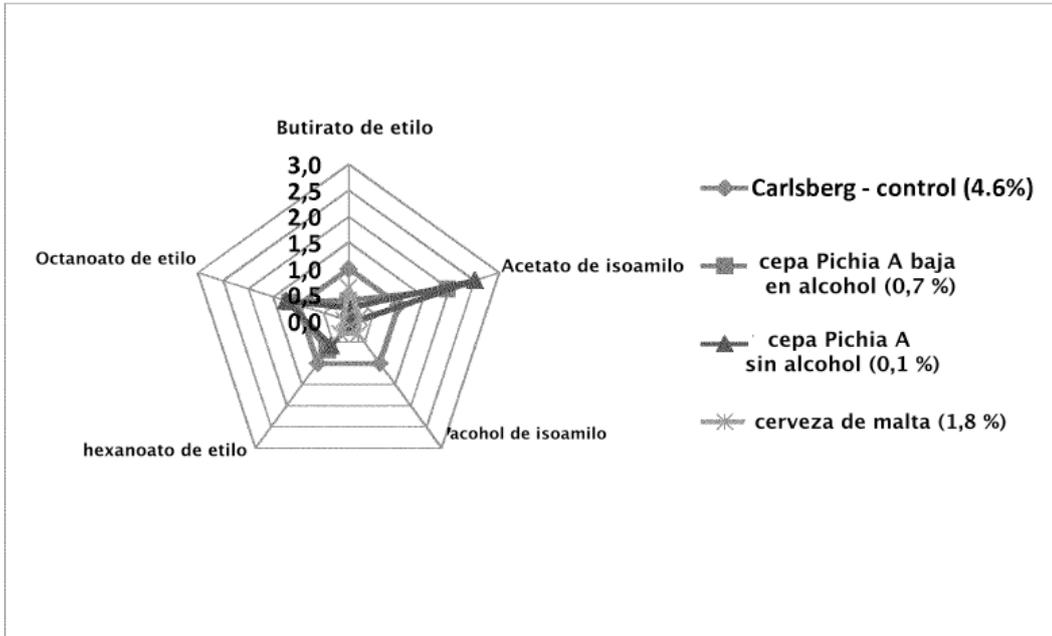


Figura 3

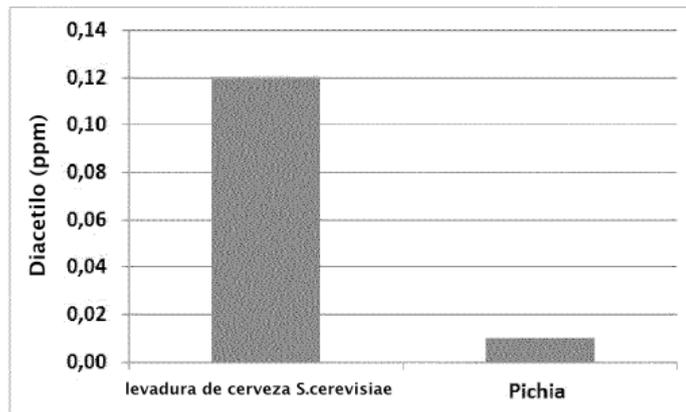


Figura 4

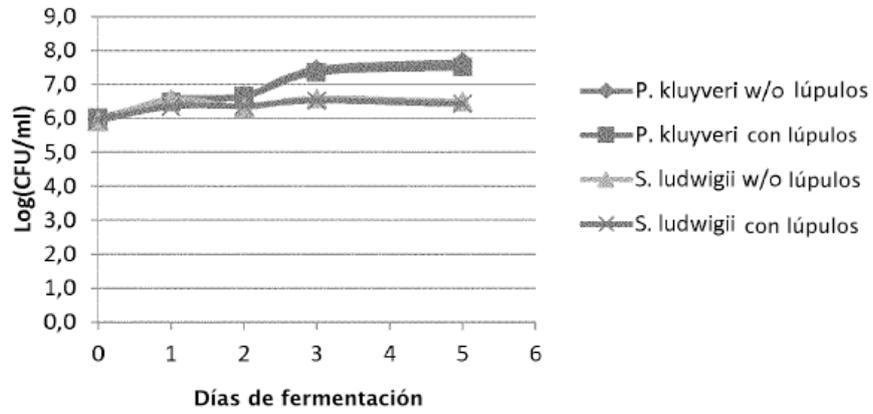


Figura 5

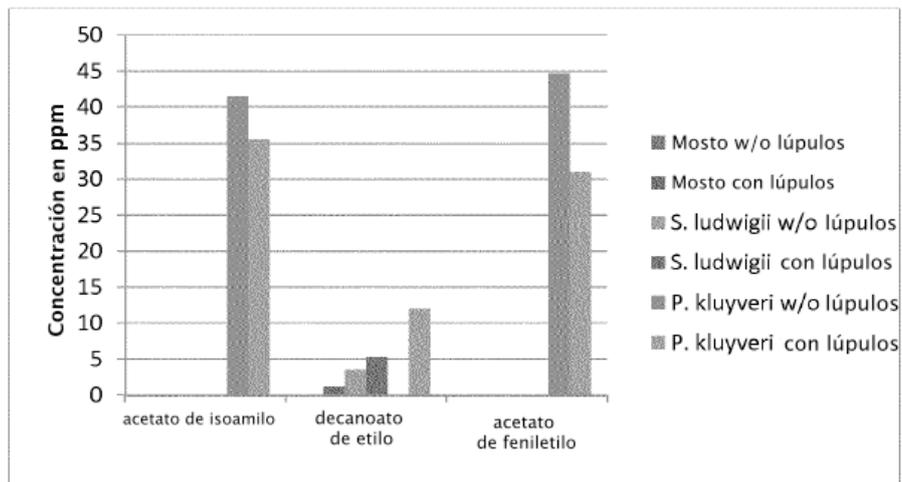


Figura 6

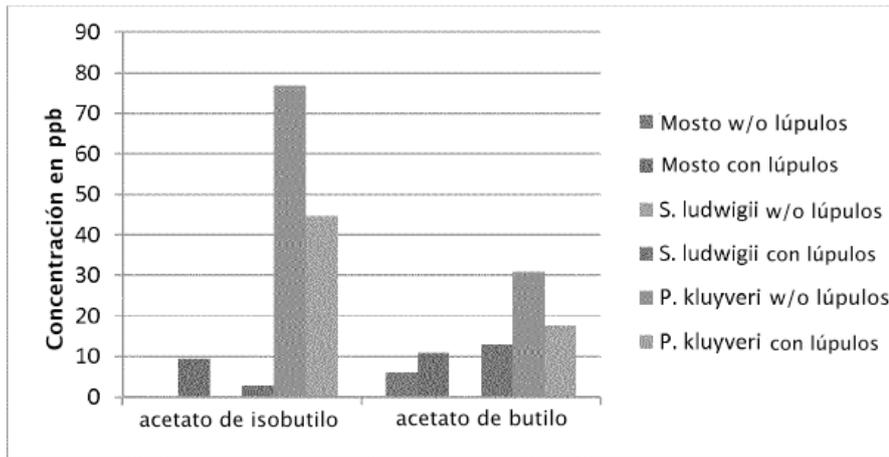


Figura 7

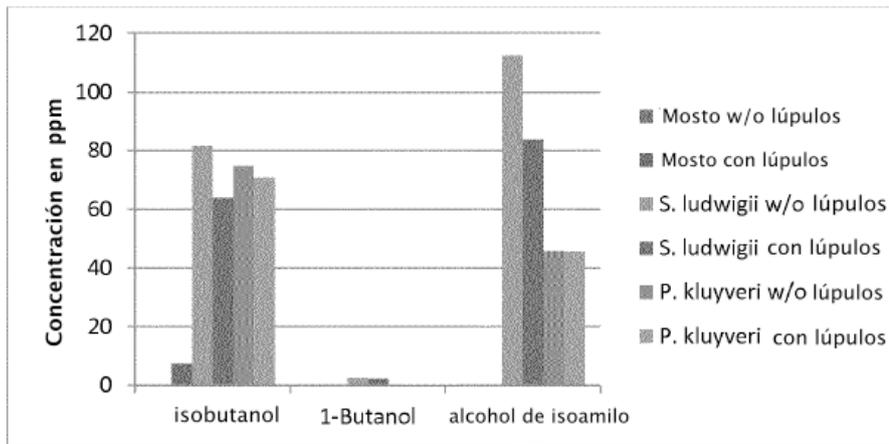


Figura 8

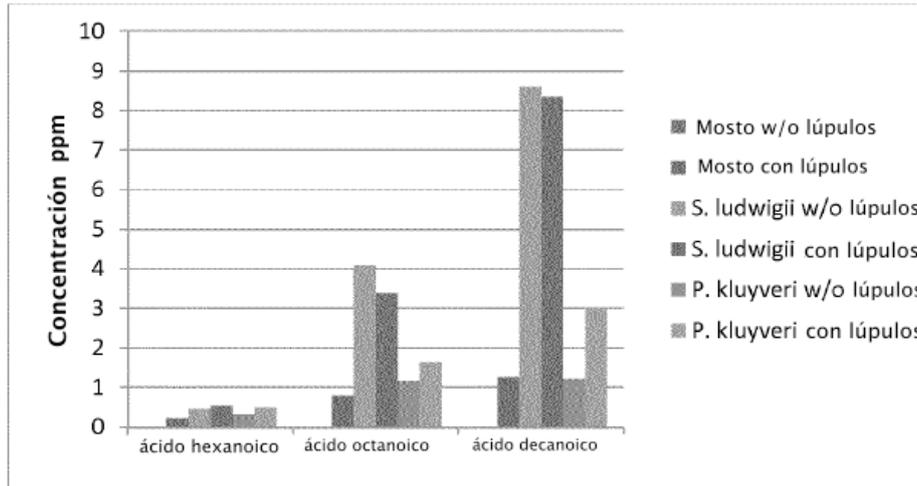


Figura 9