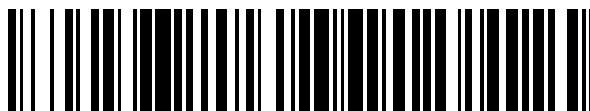


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 601**

51 Int. Cl.:

C12C 12/04 (2006.01)

C12C 12/00 (2006.01)

C12C 7/20 (2006.01)

C12C 7/28 (2006.01)

C12C 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2012 PCT/EP2012/067076**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13030398**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2012 E 12753493 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2751250**

54 Título: **Intensificación del sabor de la cerveza mediante una combinación de levadura Pichia y diferentes variedades de lúpulo**

30 Prioridad:

02.09.2011 EP 11179862

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

02.07.2018

73 Titular/es:

CHR. HANSEN A/S (100.0%)

Boege Allé 10-12

2970 Hoersholm, DK

72 Inventor/es:

SARENS, SOFIE y

SWIEGERS, JAN HENDRIK

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 674 601 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

Intensificación del sabor de la cerveza mediante una combinación de levadura *Pichia* y diferentes variedades de lúpulo

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de la elaboración de cerveza e intensificación del sabor de la cerveza. Específicamente, la invención se refiere a un método de elaboración de cerveza que comprende una etapa de fermentación de un mosto lupulado con una *Pichia kluyveri*, en donde hay una interacción de los lúpulos con la cepa de levadura *Pichia kluyveri* para intensificar el sabor de la cerveza.

Antecedentes de la invención

- 10 Diversas cervezas contienen muchos compuestos de sabor derivados de maltas de cebada, lúpulos, fermentación de levadura y otras materias primas. Sin embargo, la fermentación de levadura forma el núcleo del proceso de elaboración de cerveza, ya que durante la fermentación se forman los compuestos de sabor más importantes. La fermentación es un proceso en el que la levadura metaboliza azúcares simples en el mosto para dar etanol y dióxido de carbono. Sin embargo, estos componentes hacen una contribución relativamente minoritaria al sabor global de la
 15 cerveza. Las características de aroma y sabor de la cerveza resultan de los compuestos volátiles de sabor minoritarios producidos por la levadura durante la fermentación.

Otro factor importante es el lúpulo. Hay dos tipos de lúpulos usados en la elaboración: lúpulos amargos y lúpulos de aroma. Se usan lúpulos amargos para cervezas lager para dar un amargor extra a la cerveza. Se usan lúpulos de aroma para cervezas de especialidad para intensificar el sabor.

- 20 El uso de cultivos iniciadores es una práctica común en industrias de levadura. Sin embargo, una cepa de levadura pura a menudo no combina todos los rasgos óptimos deseados en la elaboración, ya que hay dos objetivos principales para el uso de cepas de levadura en la industria cervecera: mejorar la eficacia del proceso de producción y obtener una buena calidad del producto final (Saerens *et al.* 2010).

- 25 Una tendencia adicional, más reciente en la industria alimentaria y de bebidas, es la producción de bebidas que ayudan a la salud humana. Por ejemplo, la industria cervecera ha invertido en investigaciones centradas en la producción de cervezas con menos alcohol y azúcar.

- Para garantizar una buena calidad de la cerveza, la reducción de “malos” sabores y la intensificación de sabores deseables ha sido un asunto importante en la industria cervecera. La reducción de malos sabores se centra en una
 30 baja producción de diacetilo, un compuesto de sabor indeseable en la cerveza con un aroma a “caramelo duro”. Los compuestos de sabor más deseables en la cerveza son ésteres y alcoholes superiores, que dan un aroma afrutado a la cerveza (Verstrepen *et al.* 2003). Los ésteres activos de sabor más importantes en la cerveza son ésteres de acetato, tales como acetato de etilo (aroma tipo “disolvente”) y acetato de isoamilo (aroma a “plátano”), y ésteres etílicos, tales como octanoato y hexanoato de etilo (aroma a “manzana”). El alcohol superior más importante es alcohol isoamílico (aroma a “plátano”).

- 35 Debido a la creciente demanda de alimentos y bebidas más saludables, la reducción de etanol e hidratos de carbono en bebidas alcohólicas, especialmente cerveza y vino, es de considerable interés comercial. Los métodos de producción actuales de cerveza de bajo contenido en alcohol, de contenido en alcohol reducido o sin alcohol, es decir, fermentación modificada o eliminación de etanol tras la fermentación, dan como resultado un gusto similar al mosto o una pérdida de componentes de aroma, respectivamente (Zufall y Wackerbauer 2000). En una cerveza
 40 lager sin alcohol, la ausencia de etanol (menos del 0,1%) refuerza cualquier sabor no deseado “a mosto” en cervezas producidas por un procedimiento de contacto en frío.

- Puede obtenerse una mejora de la calidad organoléptica de bebidas y el desarrollo de nuevas bebidas a través de biosaborizantes (Vanderhaegen *et al.* 2003). Esta técnica se basa en la producción y conversión de compuestos de sabor y precursores de sabor mediante métodos biológicos, tales como el uso de cepas de levadura especiales.
 45 Tradicionalmente, los fabricantes de cerveza han distinguido dos tipos de levadura de cerveza: levadura ale y lager, según su uso para la producción de cervezas ale y lager, respectivamente. Las levaduras de cerveza ale y lager pertenecen al género *Saccharomyces*: *S. cerevisiae* (levadura ale) y *S. pastorianus* (levadura lager). Se usa levadura lager para la producción de cervezas pilsner, que comprenden el 90% de las cervezas producidas en el mundo. El otro 10% son cervezas de especialidad, producidas mediante la levadura ale. En Bélgica (y ahora también
 50 en EE.UU.) se usa otra especie de levadura para la producción de cervezas lambic y gueuze, *Brettanomyces bruxellensis* (Verachtert *et al.* 1989). Esto contrasta mucho con la industria del vino, en la que se usan muchas cepas distintas de *Saccharomyces* para intensificar el carácter “silvestre” de fermentaciones espontáneas (Domizio *et al.* 2011). Estas cepas están hoy en día disponibles comercialmente para la industria del vino a través de empresas tales como Christian Hansen y Lallemand.

- 55 La solicitud de patente internacional WO 2009/110807 se refiere a cepas de levadura para su uso en procesos de fermentación y a un método de intensificación del sabor en un producto de fermentación mediante el uso de una

cepa de levadura distinta de *Saccharomyces*. El documento WO 2009/110807 se refiere a la fermentación de vino y no menciona el uso de especies distintas de *Saccharomyces* en la elaboración de cerveza.

5 Ningún estudio ha examinado los efectos de especies distintas de *Saccharomyces* sobre el nivel de ésteres y alcoholes superiores en la cerveza. Además, sólo unos pocos estudios notifican la influencia de la levadura sobre el sabor del lúpulo en la cerveza. Hasta ahora, tres estudios notifican la influencia de o bien especies de *Saccharomyces* o bien especies de *Brettanomyces* sobre la intensificación de terpenoides de lúpulo en la cerveza (King y Dickinson, 2003, Daenen *et al.* 2007 y Takoi *et al.* 2010).

10 La solicitud de patente internacional WO 2008/077986 describe un procedimiento para producir bebidas alcohólicas con contenido en terpenos aromáticos aumentado y/o diferente usando microorganismos genéticamente modificados que expresan genes que codifican para monoterpeno sintasa durante la fermentación. En este documento WO 2008/077986 se menciona *Pichia* en una lista de cepas de levadura teóricamente posibles (junto con otras cepas de levadura tales como por ejemplo *Saccharomyces*) para fermentar bebidas alcohólicas (la cerveza se menciona como ejemplo junto con otras bebidas alcohólicas tales como vino, cava, champán, sidra y sake). En otras palabras, en el documento WO 2008/077986 no se da a conocer de manera exacta y sin ambigüedades el uso de *Pichia* spp. para producir cerveza.

15 El documento CN102051289 da a conocer un método para producir cerveza de dátil rojo que comprende la fermentación conjunta de zumo de dátil rojo con las cepas distintas de *Saccharomyces Candida* spp., *Kloeckera* spp., *Hanseniaspora* spp., *Pichia pastoris* y una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para generar materiales aromáticos y componentes de sabor especiales.

20 La patente alemana DD 288619 A5 describe el uso de la levadura *Pichia* para fermentar mosto de cerveza. Al mosto de cerveza no se le añaden lúpulos.

25 Es muy deseable una comprensión de los procesos biológicos que controlan la presencia y cantidad de compuestos en un proceso de fermentación. En particular, poder regular la cantidad y el tipo de ésteres de acetato en la cerveza resultaría muy beneficioso para los fabricantes de cerveza. La regulación de la cantidad de ésteres y alcoholes superiores, y en particular acetato de isoamilo, en combinación con sabores de lúpulo en la cerveza permitiría el desarrollo de nuevas tecnología que permiten que los fabricantes de cerveza alteren con más precisión las cantidades de estos sabores deseables en su producto. Una tecnología de este tipo sería, por tanto, de valor comercial significativo.

30 Además de eso, la intensificación del sabor puede ser una manera útil para producir cervezas de bajo contenido en alcohol, de contenido en alcohol reducido o sin alcohol. El problema con la producción de cervezas de bajo contenido en alcohol, de contenido en alcohol reducido o sin alcohol es el gusto a mosto o la pérdida de compuestos de aroma, o bien debido a la eliminación del etanol o bien debido a la baja densidad del mosto.

Por tanto, existe la necesidad de procedimientos mejorados para la intensificación de sabores deseables en la cerveza.

35 **Sumario de la invención**

El problema que va a solucionarse mediante la presente invención se refiere a la provisión de un nuevo método para elaborar cerveza en el que la presencia de compuestos de sabor deseables, tales como ésteres y alcoholes superiores, se intensifica.

40 La solución se basa en los sorprendentes hallazgos por parte de los inventores de que, usando un método que comprende fermentar mosto lupulado con una cepa de levadura *Pichia kluyveri* antes de o al mismo tiempo que la fermentación del mosto lupulado con una levadura de cerveza convencional, puede producirse una cerveza con un perfil de sabor mejorado.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de elaboración de cerveza que comprende las etapas de:

- 45 a) proporcionar un mosto;
- b) añadir al menos una variedad de lúpulo para obtener un mosto lupulado;
- c) fermentar el mosto lupulado con una primera cepa de levadura, en el que la primera cepa de levadura es una cepa de levadura *Pichia kluyveri*; y
- 50 d) fermentar el mosto lupulado con una segunda cepa de levadura para obtener una cerveza, en el que la segunda cepa de levadura pertenece al grupo que consiste en especies de *Saccharomyces* y especies de *Brettanomyces*.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra concentraciones de acetaldehído en productos de fermentación de fermentaciones secuenciales y

fermentación secuencial.

La figura 19 ilustra concentraciones de octanoato de etilo en productos de fermentación de fermentaciones secuenciales y de control a 20°C, tomadas en el día 5 (d5) y día 13 (d13). Con = fermentación de control y seq = fermentación secuencial.

- 5 La figura 20 ilustra concentraciones de octanoato de etilo en productos de fermentación de fermentaciones secuenciales y de control a 22°C, tomadas en el día 5 (d5) y día 13 (d13). Con = fermentación de control y seq = fermentación secuencial.

- 10 La figura 21 ilustra concentraciones de decanoato de etilo en productos de fermentación de fermentaciones secuenciales y de control a 20°C, tomadas en el día 5 (d5) y día 13 (d13). Con = fermentación de control y seq = fermentación secuencial.

La figura 22 ilustra concentraciones de decanoato de etilo en productos de fermentación de fermentaciones secuenciales y de control a 22°C, tomadas en el día 5 (d5) y día 13 (d13). Con = fermentación de control y seq = fermentación secuencial.

- 15 La figura 23 ilustra concentraciones de isobutanol en productos de fermentación de fermentaciones secuenciales y de control a 20°C, tomadas en el día 5 (d5) y día 13 (d13). Con = fermentación de control y seq = fermentación secuencial.

La figura 24 ilustra concentraciones de isobutanol en productos de fermentación de fermentaciones secuenciales y de control a 22°C, tomadas en el día 5 (d5) y día 13 (d13). Con = fermentación de control y seq = fermentación secuencial.

- 20 La figura 25 ilustra concentraciones de alcohol isoamílico en productos de fermentación de fermentaciones secuenciales y de control a 20°C, tomadas en el día 5 (d5) y día 13 (d13). Con = fermentación de control y seq = fermentación secuencial.

- 25 La figura 26 ilustra concentraciones de alcohol isoamílico en productos de fermentación de fermentaciones secuenciales y de control a 22°C, tomadas en el día 5 (d5) y día 13 (d13). Con = fermentación de control y seq = fermentación secuencial.

La figura 27 ilustra concentraciones de acetaldehído en cervezas terminadas.

La figura 28 ilustra concentraciones de acetato de etilo en cervezas terminadas.

La figura 29 ilustra concentraciones de acetato de isoamilo en cervezas terminadas.

La figura 30 ilustra concentraciones de propionato de etilo en cervezas terminadas.

- 30 La figura 31 ilustra concentraciones de butirato de etilo en cervezas terminadas.

La figura 32 ilustra concentraciones de valerato de etilo en cervezas terminadas.

La figura 33 ilustra concentraciones de hexanoato de etilo en cervezas terminadas.

La figura 34 ilustra concentraciones de octanoato de etilo en cervezas terminadas.

La figura 35 ilustra concentraciones de decanoato de etilo en cervezas terminadas.

- 35 La figura 36 ilustra concentraciones de isobutanol en cervezas terminadas.

La figura 37 ilustra concentraciones de alcohol isoamílico en cervezas terminadas.

La figura 38 ilustra concentraciones de los tioles 3-mercaptohexanol y acetato de 3-mercaptohexilo en cerveza preparada con y sin *Pichia*.

Descripción detallada de la invención

- 40 Definiciones

El término "mosto" en el presente documento tiene el significado convencional en la técnica y se refiere al líquido azucarado extraído a partir del proceso de maceración de elaboración de cerveza.

- 45 El término "cerveza" tal como se usa en el presente documento se refiere al menos a cervezas preparadas a partir de maltas remojadas preparadas a partir de cereales malteados así como maltas remojadas preparadas a partir de cereales no malteados, y maltas remojadas preparadas a partir de una mezcla de cereales malteados y no malteados. El término "cerveza" también se refiere a cervezas preparadas con adjuntos y cervezas con todos los

posibles contenidos en alcohol.

El término “cerveza de contenido en alcohol reducido” en el presente documento se refiere a una cerveza con un contenido en alcohol de entre el 1,2% y el 4,2% de alcohol en volumen (ABV).

5 El término “cerveza de bajo contenido en alcohol” en el presente documento se refiere a una cerveza con un contenido en alcohol de entre el 0,5% y el 1,2% de ABV.

El término “cerveza sin alcohol” en el presente documento se refiere a una cerveza con un contenido en alcohol de menos del 0,5% de ABV.

El término “mosto lupulado” en el presente documento se refiere a un mosto al que se han añadido lúpulos o bien antes de hervir o bien después de hervir el mosto.

10 El término “organismo genéticamente modificado” en el presente documento tiene el significado tal como se define por la Organic Trade Association de 1996 y se refiere a un organismo, tal como un microorganismo, tal como levadura, que se han producido con técnicas que alteran la biología molecular o celular de un organismo por medios que no son posibles en condiciones o procesos naturales. El término “no modificado genéticamente” en el presente documento se refiere a un microorganismo que no contiene genes heterólogos.

15 En el presente contexto, el término “mutante” debe entenderse como una cepa derivada de una cepa de la invención por medio de, por ejemplo, ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico. Se prefiere que el mutante sea un mutante funcionalmente equivalente, por ejemplo, un mutante que tiene sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas, (por ejemplo, respecto a la intensificación de compuestos de sabor de cerveza deseables) que la cepa madre. Un mutante de este tipo es parte de la presente invención. Especialmente, el término “mutante” se refiere a
20 una cepa obtenida sometiendo una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización usado convencionalmente incluyendo tratamiento con un mutágeno químico tal como metanosulfonato de etano (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o a un mutante que se produce de manera espontánea. Un mutante puede haberse sometido a varios tratamientos de mutagenización (un solo tratamiento debe entenderse como una etapa de mutagenización seguida por una etapa de detección/selección), pero en el presente documento se prefiere
25 que no se lleven a cabo más de 20, o no más de 10, o no más de 5, tratamientos (o etapas de detección/selección). En un mutante preferido en el presente documento, menos del 5%, o menos del 1% o incluso menos del 0,1% de los nucleótidos en el genoma de levadura se ha cambiado por otro nucleótido, o eliminado, en comparación con la cepa madre.

30 En el presente contexto, el término “variante” debe entenderse como una cepa que es funcionalmente equivalente a una cepa de la invención, por ejemplo, que tiene sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas, (por ejemplo, respecto a la intensificación de compuestos de sabor de cerveza deseables). Tales variantes, que pueden identificarse usando técnicas de examen apropiadas, son una parte de la presente invención.

35 El uso de los términos “un” y “una” y “el/la” y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) ha de interpretarse que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o lo contradiga claramente el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” han de interpretarse como términos de extremos abiertos (es decir, que significan “que incluye, pero no se limita a,”) a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en el presente documento pretende meramente servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor diferente que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique
40 lo contrario en el presente documento, y cada valor diferente se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otro modo en el presente documento o a menos que lo contradiga claramente el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionados en el presente documento, pretende únicamente ilustrar mejor la invención y no supone una limitación del alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

Implementación y aspectos de la invención

45 El proceso de elaboración de cerveza lo conoce bien el experto en la técnica y puede explicarse resumidamente de la siguiente manera; se prepara la malta a partir de granos de cereales secados, germinados (principalmente cebada o trigo) y se muelen para dar una malta molida que puede contener adjuntos no malteados. La malta molida se macera (se mezcla con agua y se empapa) para permitir que las enzimas en la malta conviertan el almidón en azúcares. Los adjuntos y partículas de granos se separan del mosto líquido en un proceso denominado filtrado (*lautering*). Las etapas de producción y maceración de malta pueden saltarse añadiendo agua al extracto de malta.
55 Tras la adición de lúpulos y/u otros componentes tales como hierbas y azúcares, se hierve el mosto (también pueden añadirse lúpulos tras hervir), se enfría y se airea. Entonces, se mueve el mosto a un tanque de fermentación y se fermenta mediante la adición de una levadura de cerveza. La fermentación primaria, que dura normalmente de 5 a 10 días, puede ir seguida por una etapa de fermentación secundaria usando una levadura de cerveza adicional.

Después de la fermentación la cerveza nueva o cerveza “joven”, se acondiciona, opcionalmente se filtra y se carbonata.

Se añaden lúpulos al mosto para equilibrar el dulzor de la malta con el amargor y conferir a la cerveza sabores y aromas deseables. Existen varias variedades incluyendo pero sin limitarse a Ahtanum, Amarillo, Apollo, Cascade, Centennial, Chinook, Citra, Cluster, Columbus, Crystal, Eroica, Galena, Glacier, Greenburg, Horizon, Liberty, Millenium, Mount Hood, Mount Rainier, Newport, Nugget, Palisade, Santiam, Simcoe, Sterling, Summit, Tomahawk, Ultra, Vanguard, Warrior, Willamette, Zeus, Admiral, Brewer's Gold, Bullion, Challenger, First Gold, Fuggles, Goldings, Herald, Northdown, Northern Brewer, Phoenix, Pilot, Pioneer, Progress, Target, Whitbread Golding Variety (WGV), Hallertau, Hersbrucker, Saaz, Tettang, Spalt, Feux-Coeur Francais, Galaxy, Green Bullet, Motueka, Nelson Sauvin, Pacific Gem, Pacific Jade, Pacifica, Pride of Ringwood, Riwaka, Southern Cross, Lublin, Magnum, Perle, Polnischer Lublin, Saphir, Satus, Select, Strisselspalt, Styrian Goldings, Tardif de Bourgogne y Tradition. Existen variedades adicionales incluyendo pero sin limitarse a Bravo, Calypso, Chelan, Comet, El Dorado, San Juan Ruby Red, Satus, Sonnet Golding, Super Galena, Tillicum, Bramling Cross, Pilgrim, Hallertauer Herkules, Hallertauer Magnum, Hallertauer Taurus, Merkur, Opal, Smaragd, Hallertauer Aroma, Kohatu, Rakau, Stella, Sticklebract, Summer Saaz, Super Alpha, Super Pride, Topaz, Wai-iti, Bor, Junga, Marynka, Premiant, Sladek, Styrian Atlas, Styrian Aurora, Styrian Bobek, Styrian Celeia, Sybilla y Sorachi Ace.

Los inventores de la presente invención han encontrado inesperadamente que determinadas cepas de levadura *Pichia* spp., cuando se combinan con la adición de diferentes variedades de lúpulos al mosto, tienen propiedades ventajosas útiles en el proceso de fermentación de elaboración de cerveza. En particular, las cepas de levadura *Pichia* spp. intensifican sabores deseables de los lúpulos cuando se fermenta el mosto lupulado con las cepas de levadura *Pichia* spp. de manera secuencial a la fermentación del mosto lupulado con una cepa de levadura usada de manera convencional para la elaboración de cerveza, incluyendo levaduras de los géneros *Saccharomyces* y *Brettanomyces*.

A partir del análisis de sabor completo de todas las fermentaciones explicadas resumidamente en los ejemplos a continuación, es evidente que casi todo compuesto medido estaba presente en concentraciones mayores en las fermentaciones secuenciales, en comparación con las fermentaciones de control. Esto significa que la cepa de *Pichia* spp. tiene un gran efecto sobre el perfil de sabor de la cerveza final, ya que la adición de *Pichia* spp. en el comienzo de la fermentación era la única diferencia entre las fermentaciones secuenciales y de control. Puesto que se encontraron enormes aumentos para todos los compuestos de sabor deseables, tales como acetato de isobutilo e isoamilato y valerato y propionato de etilo, esto muestra un enorme potencial del uso de *Pichia* spp. en la industria cervecera. Especialmente para cervezas de bajo contenido en alcohol, de contenido en alcohol reducido o sin alcohol, la intensificación de sabores afrutados puede enmascarar los sabores a mosto presentes normalmente. Puesto que esto es un mercado emergente, está disponible un gran potencial para el uso de *Pichia* spp. en estas fermentaciones de cerveza.

El método para elaborar cerveza de la presente invención comprende las etapas de:

- a) proporcionar un mosto;
- b) añadir al menos una variedad de lúpulo para obtener un mosto lupulado;
- c) fermentar el mosto lupulado con una primera cepa de levadura, en el que la primera cepa de levadura es una cepa de levadura *Pichia kluyveri*; y
- d) fermentar el mosto lupulado con una segunda cepa de levadura para obtener una cerveza, en el que la segunda cepa de levadura pertenece al grupo que consiste en especies de *Saccharomyces* y especies de *Brettanomyces*.

Mediante este método, pueden intensificarse los compuestos de sabor y optimizar el perfil de sabor de la cerveza añadiendo diferentes variedades de lúpulos tal como se muestra en los ejemplos.

En una realización preferida de la presente invención la etapa c) y la etapa d) se llevan a cabo secuencialmente, es decir, el mosto lupulado se inocula en primer lugar con una cepa de levadura *Pichia kluyveri* en condiciones adecuadas para la fermentación y posteriormente el mosto lupulado se inocula con una segunda cepa de levadura en condiciones adecuadas para la fermentación.

En una realización más preferida se permite que la fermentación en la etapa c) avance durante al menos 12 horas, tal como durante al menos 24 horas, tal como durante al menos 36 horas, tal como durante al menos 48 horas, tal como durante al menos 60 horas, tal como al menos 72 horas antes de la inoculación de la segunda cepa de levadura en la etapa d). En la realización más preferida se permite que la fermentación en la etapa c) avance durante al menos 36 horas.

Es parte de la presente invención que puedan lograrse diferentes perfiles de sabor de cerveza usando las diferentes variedades de lúpulos. La al menos una variedad de lúpulo puede seleccionarse de la lista que consiste en Ahtanum, Amarillo, Apollo, Cascade, Centennial, Chinook, Citra, Cluster, Columbus, Crystal, Eroica, Galena, Glacier, Greenburg, Horizon, Liberty, Millenium, Mount Hood, Mount Rainier, Newport, Nugget, Palisade, Santiam, Simcoe,

5 Sterling, Summit, Tomahawk, Ultra, Vanguard, Warrior, Willamette, Zeus, Admiral, Brewer's Gold, Bullion, Challenger, First Gold, Fuggles, Goldings, Herald, Northdown, Northern Brewer, Phoenix, Pilot, Pioneer, Progress, Target, Whitbread Golding Variety (WGV), Hallertau, Hersbrucker, Saaz, Tettnang, Spalt, Feux-Coeur Francais, Galaxy, Green Bullet, Motueka, Nelson Sauvin, Pacific Gem, Pacific Jade, Pacifica, Pride of Ringwood, Riwaka, Southern Cross, Lublin, Magnum, Perle, Polnischer Lublin, Saphir, Satus, Select, Strisselspalt, Styrian Goldings, Tardif de Bourgogne y Tradition, pero el uso de variedades de lúpulos adicionales también es parte de la invención.

En una realización preferida la al menos una variedad de lúpulo se selecciona del grupo que consiste en Saaz, Nelson Sauvin, Cascade y Amarillo.

10 La al menos una variedad de lúpulo también puede seleccionarse de la lista que consiste en Bravo, Calypso, Chelan, Comet, El Dorado, San Juan Ruby Red, Satus, Sonnet Golding, Super Galena, Tillicum, Bramling Cross, Pilgrim, Hallertauer Herkules, Hallertauer Magnum, Hallertauer Taurus, Merkur, Opal, Smaragd, Hallertau Aroma, Kohatu, Rakau, Stella, Sticklebract, Summer Saaz, Super Alpha, Super Pride, Topaz, Wai-iti, Bor, Junga, Marynka, Premiant, Sladek, Styrian Atlas, Styrian Aurora, Styrian Bobek, Styrian Celeia, Sybilla y Sorachi Ace.

15 En otra realización preferida de la presente invención la fermentación en la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura de entre aproximadamente 12°C y aproximadamente 28°C.

En una realización más preferida la temperatura de fermentación en la etapa c) está entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 22°C. Lo más preferiblemente la temperatura de fermentación en la etapa c) es de aproximadamente 20°C.

20 Preferiblemente, la cepa de levadura *Pichia kluyveri* se deja en el cultivo de fermentación durante la fermentación con la segunda cepa de levadura. Sin embargo, la cepa de levadura *Pichia kluyveri* también puede retirarse antes de la inoculación de la segunda cepa de levadura mediante técnicas conocidas por el experto.

En otra realización de la presente invención la etapa c) y la etapa d) se llevan a cabo al mismo tiempo mediante inoculación conjunta de la primera cepa de levadura de la etapa c) y la segunda cepa de levadura de la etapa d).

25 En una realización preferida, se permite que la segunda etapa de fermentación en la etapa d) avance durante al menos 12 horas, tal como al menos 24 horas, tal como al menos 48 horas, tal como al menos 72 horas, tal como al menos 96 horas, tal como al menos 120 horas.

En una realización preferida de la presente invención la cepa de levadura *Pichia kluyveri* es una cepa de levadura no modificada genéticamente.

30 Preferiblemente, la cepa de levadura *Pichia kluyveri* se selecciona del grupo que consiste en las cepas *Pichia kluyveri* PK-KR1 y PK-KR2 tal como se depositaron el 24 de agosto de 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, Nueva Zelanda, y a las que se les dio los números de registro V06/022711 y V06/022712, respectivamente, y mutantes y variantes de las mismas. Las cepas se describen en la solicitud de patente internacional WO 2009/110807.

35 En aún otra realización preferida de la presente invención la segunda cepa de levadura se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* y *Brettanomyces bruxellensis*. Preferiblemente, la segunda cepa de levadura es una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En una realización preferida de la presente invención la cerveza es una cerveza de bajo contenido en alcohol, de contenido en alcohol reducido o sin alcohol.

40 En otra realización preferida, el uso de una cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) aumenta el contenido de al menos un compuesto de sabor seleccionado del grupo que consiste en acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, propionato de etilo, valerato de etilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo en al menos el 50%, tal como en al menos el 100%, tal como en al menos el 150%, tal como en al menos el 200%, tal como en al menos el 250%, tal como en al menos el 300%.

45 Preferiblemente, el uso de una cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) aumenta el contenido de al menos un compuesto de sabor seleccionado del grupo que consiste en acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, propionato de etilo y valerato de etilo en al menos el 50%, tal como en al menos el 100%, tal como en al menos el 150%, tal como en al menos el 200%, tal como en al menos el 250%, tal como en al menos el 300%.

50 En aún otra realización preferida de la presente invención el uso una cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) aumenta el contenido de al menos dos o más compuestos de sabor seleccionados del grupo que consiste en acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, propionato de etilo, valerato de etilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo en al menos el 50%, tal como en al menos el 100%, tal como en al menos el 150%, tal como en al menos el 200%, tal como en al menos el 250%, tal como en al menos el 300%.

Preferiblemente, el uso de una cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) aumenta el contenido de al menos

dos o más compuestos de sabor seleccionados del grupo que consiste en acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, propionato de etilo y valerato de etilo en al menos el 50%, tal como en al menos el 100%, tal como en al menos el 150%, tal como en al menos el 200%, tal como en al menos el 250%, tal como en al menos el 300%.

- 5 En otra realización muy preferida el uso de una cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) aumenta el contenido del tiol acetato de 3-mercaptohexilo en al menos el 10%, tal como en al menos el 20%, tal como en al menos el 30%, tal como en al menos el 40%, tal como en al menos el 50%.

Los términos “aumenta el contenido de al menos un compuesto de sabor” y “aumenta el contenido del tiol acetato de 3-mercaptohexilo” pueden considerarse como propiedades inherentes de usar *Pichia* spp. tal como se comenta a continuación.

- 10 En una realización preferida de la presente invención cuando la al menos una variedad de lúpulo en la etapa b) es Saaz y la fermentación en la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20°C el uso de la cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) aumenta el nivel de decanoato de etilo con al menos el 50% más que cuando la al menos una variedad de lúpulo es Cascade, Nelson Sauvin o Amarillo.

- 15 En otra realización preferida de la invención cuando la al menos una variedad de lúpulo en la etapa b) es Nelson Sauvin y la fermentación en la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20°C el uso de la cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) aumenta el nivel de decanoato de etilo con al menos el 50% más que cuando la al menos una variedad de lúpulo es Cascade o Amarillo.

- 20 En una realización adicional de la invención cuando la al menos una variedad de lúpulo en la etapa b) es Cascade o Nelson Sauvin y la fermentación en la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20°C el uso de la cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) aumenta el nivel de valerato de etilo con al menos el 50% más que cuando la al menos una variedad de lúpulo es Amarillo y Saaz.

- 25 En una realización incluso adicional, cuando la al menos una variedad de lúpulo en la etapa b) es Cascade y la fermentación en la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 20°C el uso de la cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) aumenta el nivel de hexanoato de etilo y octanoato de etilo con al menos el 50% más que cuando la al menos una variedad de lúpulo es Nelson Sauvin, Amarillo o Saaz.

- 30 En aún otra realización de la invención cuando la al menos una variedad de lúpulo en la etapa b) es cualquier variedad seleccionada del grupo que consiste en Ahtanum, Amarillo, Apollo, Cascade, Centennial, Chinook, Citra, Cluster, Columbus, Crystal, Eroica, Galena, Glacier, Greenburg, Horizon, Liberty, Millenium, Mount Hood, Mount Rainier, Newport, Nugget, Palisade, Santiam, Simcoe, Sterling, Summit, Tomahawk, Ultra, Vanguard, Warrior, Willamette, Zeus, Admiral, Brewer's Gold, Bullion, Challenger, First Gold, Fuggles, Goldings, Herald, Northdown, Northern Brewer, Phoenix, Pilot, Pioneer, Progress, Target, Whitbread Golding Variety (WGV), Hallertau, Hersbrucker, Saaz, Tettang, Spalt, Feux-Coeur Francais, Galaxy, Green Bullet, Motueka, Nelson Sauvin, Pacific Gem, Pacific Jade, Pacifica, Pride of Ringwood, Riwaka, Southern Cross, Lublin, Magnum, Perle, Polnischer Lublin, Saphir, Satus, Select, Strisselspalt, Styrian Goldings, Tardif de Bourgogne y Tradition, el uso de la cepa de levadura *Pichia* spp. en la etapa c) dará como resultado un perfil de sabor de niveles de los compuestos de sabor acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, propionato de etilo y valerato de etilo que es diferente de un perfil de sabor que resulta del uso de la cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) cuando la variedad de lúpulo en la etapa b) es cualquier otra variedad seleccionada del grupo que consiste en Ahtanum, Amarillo, Apollo, Cascade, Centennial, Chinook, Citra, Cluster, Columbus, Crystal, Eroica, Galena, Glacier, Greenburg, Horizon, Liberty, Millenium, Mount Hood, Mount Rainier, Newport, Nugget, Palisade, Santiam, Simcoe, Sterling, Summit, Tomahawk, Ultra, Vanguard, Warrior, Willamette, Zeus, Admiral, Brewer's Gold, Bullion, Challenger, First Gold, Fuggles, Goldings, Herald, Northdown, Northern Brewer, Phoenix, Pilot, Pioneer, Progress, Target, Whitbread Golding Variety (WGV), Hallertau, Hersbrucker, Saaz, Tettang, Spalt, Feux-Coeur Francais, Galaxy, Green Bullet, Motueka, Nelson Sauvin, Pacific Gem, Pacific Jade, Pacifica, Pride of Ringwood, Riwaka, Southern Cross, Lublin, Magnum, Perle, Polnischer Lublin, Saphir, Satus, Select, Strisselspalt, Styrian Goldings, Tardif de Bourgogne y Tradition.

- 35 40 45 50 55 En una realización adicional de la invención cuando la al menos una variedad de lúpulo en la etapa b) es cualquier variedad seleccionada del grupo que consiste en Ahtanum, Amarillo, Apollo, Cascade, Centennial, Chinook, Citra, Cluster, Columbus, Crystal, Eroica, Galena, Glacier, Greenburg, Horizon, Liberty, Millenium, Mount Hood, Mount Rainier, Newport, Nugget, Palisade, Santiam, Simcoe, Sterling, Summit, Tomahawk, Ultra, Vanguard, Warrior, Willamette, Zeus, Admiral, Brewer's Gold, Bullion, Challenger, First Gold, Fuggles, Goldings, Herald, Northdown, Northern Brewer, Phoenix, Pilot, Pioneer, Progress, Target, Whitbread Golding Variety (WGV), Hallertau, Hersbrucker, Saaz, Tettang, Spalt, Feux-Coeur Francais, Galaxy, Green Bullet, Motueka, Nelson Sauvin, Pacific Gem, Pacific Jade, Pacifica, Pride of Ringwood, Riwaka, Southern Cross, Lublin, Magnum, Perle, Polnischer Lublin, Saphir, Satus, Select, Strisselspalt, Styrian Goldings, Tardif de Bourgogne, Tradition, Bravo, Calypso, Chelan, Comet, El Dorado, San Juan Ruby Red, Satus, Sonnet Golding, Super Galena, Tillicum, Bramling Cross, Pilgrim, Hallertauer Herkules, Hallertauer Magnum, Hallertauer Taurus, Merkur, Opal, Smaragd, Hallertauer Aroma, Kohatu, Rakau, Stella, Sticklebract, Summer Saaz, Super Alpha, Super Pride, Topaz, Wai-iti, Bor, Junga, Marynka, Premiant, Sladek, Styrian Atlas, Styrian Aurora, Styrian Bobek, Styrian Celeia, Sybilla y Sorachi Ace, el uso de la cepa de levadura *Pichia* spp. en la etapa c) dará como resultado un perfil de sabor de niveles de los compuestos de sabor

acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, propionato de etilo y valerato de etilo que es diferente de un perfil de sabor que resulta del uso de la cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) cuando la variedad de lúpulo en la etapa b) es cualquier otra variedad seleccionada del grupo que consiste en Ahtanum, Amarillo, Apollo, Cascade, Centennial, Chinook, Citra, Cluster, Columbus, Crystal, Eroica, Galena, Glacier, Greenburg, Horizon, Liberty, Millenium, Mount Hood, Mount Rainier, Newport, Nugget, Palisade, Santiam, Simcoe, Sterling, Summit, Tomahawk, Ultra, Vanguard, Warrior, Willamette, Zeus, Admiral, Brewer's Gold, Bullion, Challenger, First Gold, Fuggles, Goldings, Herald, Northdown, Northern Brewer, Phoenix, Pilot, Pioneer, Progress, Target, Whitbread Golding Variety (WGV), Hallertau, Hersbrucker, Saaz, Tettang, Spalt, Feux-Coeur Francais, Galaxy, Green Bullet, Motueka, Nelson Sauvín, Pacific Gem, Pacific Jade, Pacifica, Pride of Ringwood, Riwaka, Southern Cross, Lublin, Magnum, Perle, Polnischer Lublin, Saphir, Satus, Select, Strisselspalt, Styrian Goldings, Tardif de Bourgogne, Tradition, Bravo, Calypso, Chelan, Comet, El Dorado, San Juan Ruby Red, Satus, Sonnet Golding, Super Galena, Tillicum, Bramling Cross, Pilgrim, Hallertauer Herkules, Hallertauer Magnum, Hallertauer Taurus, Merkur, Opal, Smaragd, Hallertau Aroma, Kohatu, Rakau, Stella, Sticklebract, Summer Saaz, Super Alpha, Super Pride, Topaz, Wai-iti, Bor, Junga, Marynka, Premiant, Sladek, Styrian Atlas, Styrian Aurora, Styrian Bobek, Styrian Celeia, Sybilla y Sorachi Ace.

Un aspecto que no forma una realización de la invención se refiere a una cerveza que puede obtenerse mediante el método del primer aspecto.

La cerveza puede comprender cantidades detectables de levadura *Pichia kluyveri*. Aunque en algunos casos la levadura se elimina de la cerveza tras la fermentación. Sin embargo, el uso de *Pichia kluyveri* dará a la cerveza un perfil de sabor diferente de la técnica anterior tal como se muestra en el presente documento en los ejemplos, y por tanto la cerveza preparada usando *Pichia kluyveri* y diferentes variedades de lúpulo será novedosa en sí misma.

La cerveza elaborada con *Pichia kluyveri* contiene un perfil de sabor diferente cuando se usan diferentes variedades de lúpulo. Como ejemplo, el nivel de decanoato de etilo aumenta al menos el 50% más cuando se usa lúpulo Saaz, en comparación con cuando se usa Cascade, Nelson Sauvín o Amarillo y aumenta al menos el 50% cuando se usa Nelson Sauvín, en comparación con cuando se usa Cascade o Amarillo en las fermentaciones realizadas a 20°C (véase la figura 21). La concentración de valerato de etilo aumenta al menos el 50% cuando se usa lúpulo Cascade o Nelson Sauvín, en comparación con cuando se usa Amarillo o Saaz en fermentaciones realizadas a 20°C (véase la figura 15). Las concentraciones de hexanoato de etilo y octanoato de etilo aumentan al menos el 15% cuando se usan lúpulos Cascade, en comparación con cuando se usan lúpulos Nelson Sauvín, Amarillo o Saaz en fermentaciones realizadas a 20°C (véanse las figuras 17 y 19).

También se contempla que la cerveza elaborada usando *Pichia kluyveri* contendrá cantidades detectables de tioles (en particular acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA) y 3-mercaptohexan-1-ol (3MH)) tal como se describió para el vino en el documento WO 2009/110807.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Configuración de fermentación

Se llevaron a cabo ensayos de fermentación a escala de laboratorio en 500 ml de mosto. Se preparó el mosto con extracto de malta de trigo (Brewferm). Se mezcló el extracto de malta con agua para alcanzar un contenido en azúcar inicial de 10°P. Se hirvieron 4 veces 3 litros de mosto con 4 variedades de lúpulo diferentes: Nelson Sauvín, Amarillo, Saaz y Cascade. Se añadieron gránulos de lúpulo en un filtro de café cerrado al mosto y se hirvió esto durante 30 min para extraer el sabor a lúpulo y para añadir amargor a la cerveza. Se añadieron gránulos de lúpulo para alcanzar 23 EBU. Tras hervir, se retiró el filtro de café del mosto y se transfirió el mosto a botellas de 1 l, que se cerraron mediante cierres hidráulicos.

Por variedad de lúpulo, se llevaron a cabo 4 fermentaciones. Se usaron dos temperaturas de fermentación: 20°C y 22°C. Por temperatura de fermentación, se realizaron 2 inoculaciones diferentes: se inoculó una botella con *Pichia kluyveri* PKKR1 (para inoculación secuencial) y se inoculó la segunda botella con una cepa de levadura de trigo de *Saccharomyces cerevisiae* comercial, Safbrew WB-06 (Lesaffre) (fermentación de control) según las recomendaciones del proveedor. Se inocularon ambas cepas de levadura a 5 millones de células por ml. La tabla 1 proporciona un resumen de la configuración de fermentación.

Tabla 1. Configuración de fermentación

20°C/22°C	Inoculación secuencial	Control
Nelson Sauvín	1	1
Amarillo	1	1
Saaz	1	1
Cascade	1	1

Para la inoculación secuencial, se inoculó la cepa de levadura de trigo (Safbrew WB-06) tras 2 días en los fermentos inoculados con *Pichia kluyveri* para completar la fermentación. Se terminaron todas las fermentaciones tras 13 días. Se tomaron muestras en el día 5 y el día 13.

Análisis mediante CG-FID del espacio de cabeza

5 Se usó cromatografía de gases del espacio de cabeza acoplada con detección de ionización de llama (CG-FID) para la medición de acetaldehído, ésteres de acetato, ésteres etílicos y alcoholes superiores en los productos de fermentación. Se centrifugaron las muestras de fermentación, después de lo cual se recogieron 2 ml en viales. Entonces se analizaron las muestras con un sistema de CG calibrado de Perkin Elmer con un inyector de espacio de cabeza. Se equipó la CG con una columna DB-WAXETR (longitud, 30 m; diámetro interno, 0,25 mm; grosor de capa, 0,5 µm; Agilent Technologies, Alemania). Se usó el inyector fraccionado/no fraccionado y se mantuvo a 180°C. Se calentaron las muestras durante 30 min a 70°C en el inyector automático de espacio de cabeza antes de la inyección (temperatura de aguja: 110°C). Se usó helio como gas portador. Tras empezar a 60°C, se elevó la temperatura del horno tras 2 min desde 60°C hasta 230°C a 45°C/min y se mantuvo finalmente a 230°C durante 5 min. Durante el programa de CG se mantuvo una velocidad de flujo constante (10 ml/min) del gas portador (He). La temperatura del FID se mantuvo constante a 220°C respectivamente. Se analizaron los resultados con el software Turbochrom.

Análisis de etanol

Se midió el etanol con el kit de bioanálisis enzimático de etanol de Boehringer Mannheim.

Resultados

20 Se llevaron a cabo fermentaciones a escala de laboratorio en mosto de trigo con diferentes variedades de lúpulo y se inocularon con *Pichia kluyveri* durante 2 días, tras lo cual se añadió una levadura de cerveza de trigo de *Saccharomyces cerevisiae* para investigar el efecto de una inoculación secuencial en combinación con diferentes variedades de lúpulo sobre el sabor de la cerveza. Como control, se llevaron a cabo fermentaciones con sólo levadura de cerveza de trigo de *S. cerevisiae*. Ambas fermentaciones secuenciales y de control se detuvieron tras 13 días. Se tomaron muestras en el día 5 y el día 13 y posteriormente se analizaron para determinar compuestos de sabor y la concentración de etanol

Se llevaron a cabo análisis de sabor de todos los productos de fermentación con CG-FID del espacio de cabeza tal como se describió en materiales y métodos. Se representan los resultados en las figuras 1 y 2 (aldehídos), las figuras 3-10 (ésteres de acetato), las figuras 11-16 (ésteres etílicos de cadena corta), las figuras 17-22 (ésteres etílicos de cadena media) y las figuras 23-26 (alcoholes superiores).

30 Se midieron las concentraciones de etanol con un kit (véase materiales y métodos). Los resultados de las concentraciones de etanol se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de etanol de los productos de fermentación en el día 13 de las fermentaciones de control y secuenciales a 20°C y 22°C

	20°C	22°C
Saaz con	2,9	3,1
Saaz seq	3,3	3,4
Nelson Sauvín con	3,5	3,5
Nelson Sauvín seq	3,7	3,3
Cascade con	3,7	3,3
Cascade seq	3,6	3,0
Amarillo con	4,0	4,2
Amarillo seq	3,8	3,6

con = fermentación de control, seq = fermentación secuencial

35 Conclusión

La inoculación secuencial con *Pichia kluyveri* como primera cepa de levadura y una levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* como segunda cepa de levadura en fermentaciones de cerveza de trigo a pequeña escala de 500 ml con diferentes variedades de lúpulo mostró notables diferencias de sabor por variedad de lúpulo, en comparación con una fermentación de cerveza de control "normal" con sólo una levadura de cerveza *S. cerevisiae*. Esta es la primera vez que se muestra que una inoculación secuencial con *Pichia kluyveri* y *Saccharomyces cerevisiae* tiene un efecto de intensificación del sabor en fermentaciones de cerveza. Además, podían observarse diferencias en el perfil de sabor para todos los compuestos de sabor medidos cuando se usan diferentes variedades de lúpulo.

45 Las concentraciones de acetaldehído fueron siempre mayores en la inoculación secuencial, en comparación con la fermentación de control (véanse las figuras 1-2). Sin embargo, al final de la fermentación, se obtienen valores

similares para la fermentación tanto secuencial como de control. Dado que los fabricantes de cerveza no desean concentraciones demasiado altas de este compuesto en la cerveza, el efecto de la inoculación secuencial es despreciable.

5 Las mayores diferencias de sabor se encontraron para los ésteres. Si se miran con más detenimiento las concentraciones de ésteres de acetato, especialmente la concentración de acetato de isoamilo, que es un compuesto de sabor afrutado deseable, aumentó mucho en la inoculación secuencial, en comparación con el control. La fermentación a 20°C parecía ser más beneficiosa que la fermentación a 22°C. La concentración fue la más alta en la fermentación con adición de lúpulo Amarillo.

10 Además, las concentraciones de acetato de isobutilo aumentaron mucho en las fermentaciones secuenciales. De nuevo, la fermentación a 20°C fue mejor para la producción de este compuesto que la fermentación a 22°C.

El acetato de etilo, que es un compuesto negativo a altas concentraciones, pero fácilmente enmascarado por otros ésteres de acetato, también aumentó en las fermentaciones secuenciales, pero sólo dos veces la cantidad, en comparación con los controles. La fermentación con lúpulo Cascade produjo la menor cantidad de acetato de etilo de todas las fermentaciones.

15 El acetato de hexilo aumentó sólo un poco en todas las fermentaciones secuenciales, en comparación con las fermentaciones de control.

20 Los ésteres etílicos de cadena corta dieron los resultados más sorprendentes, ya que propionato de etilo y valerato de etilo no se produjeron en absoluto o casi no se produjeron en la fermentación de control. Sin embargo, se alcanzaron altas concentraciones con las fermentaciones secuenciales (hasta 1 ppm). Para butirato de etilo, sólo se observó un efecto con adición de lúpulo Saaz y Nelson Sauvin para las fermentaciones secuenciales.

Las concentraciones de octanoato y hexanoato de etilo sólo se intensificaron en las fermentaciones secuenciales con la adición de lúpulos Cascade. Sin embargo, para decanoato de etilo, las concentraciones fueron mucho más altas en las fermentaciones secuenciales con adición de lúpulos Saaz y Nelson Sauvin. La diferencia entre las fermentaciones de control y las secuenciales fue de más de 10 veces.

25 Los alcoholes superiores son los únicos compuestos cuyas concentraciones no aumentaron significativamente en las fermentaciones secuenciales, en comparación con las fermentaciones de control.

Ejemplo 2

Se realizó un ensayo de elaboración de cerveza a gran escala en una fábrica de cerveza para investigar la posibilidad de usar *Pichia kluyveri* para la industria cervecera, especialmente con respecto al sabor.

30 **Materiales y métodos**

Procedimiento de fermentación

35 Se produjeron la cerveza de control y la cerveza de *Pichia* en una escala de 15 hl en una fábrica de cerveza. El mosto consistía en variedades de malta típicas para una cerveza ale clara, y la variedad de lúpulo usado fue Cascade. Se usaron 15 hl de mosto para inocular la *Pichia kluyveri* PK-KR1. Se calculó que la tasa de inoculación estaba entre 1-2 millones de células por ml. Cada día, se tomó una muestra para la medición de los recuentos celulares (véase la tabla 3) y se realizó análisis de sabor en la cerveza final.

Tabla 3. Recuento celular de *Pichia kluyveri* PK-KR1 durante los 3 primeros días de fermentación.

Día	Recuento celular
0	2,00E+06
1	2,00E+06
2	1,00E+07
3	7,00E+05

40 En el día 3, se añadió la levadura de cerveza normal (levadura London Ale de White Labs). Ya se usó la levadura para producir una cerveza y debe, por tanto, ser óptima para esta preparación (2ª generación). Se añadió la levadura mientras se purgaba aire a través de la preparación. Por tanto, fue posible tener una idea del olor de la preparación mientras se añadía la levadura de cerveza. El olor era muy afrutado (de tipo plátano, piña). Se llevó a cabo la fermentación hasta que la levadura había asimilado completamente el azúcar. Después de eso, se maduró la cerveza joven a 7-8°C durante al menos a semana. En el día 8, se completó la fermentación y se redujo la temperatura de fermentación hasta 8°C. Tras la fermentación, se maduró la cerveza durante 7 días con la levadura aún en el fermentador. En el día 15, se sacó la levadura y se disminuyó la temperatura hasta 2°C. Después de otras tres semanas, la cerveza se filtró, se pasteurizó y se embotelló.

Análisis del sabor

Se usó cromatografía de gases de espacio de cabeza acoplada con detección de ionización de llama (CG-FID) para la medición de acetaldehído, ésteres de acetato, ésteres etílicos y alcoholes superiores en los productos de fermentación. Se centrifugaron las muestras de fermentación, después de lo cual se recogieron 2 ml en viales. Entonces se analizaron las muestras con un sistema de CG calibrado de Perkin Elmer con un inyector de espacio de cabeza. Se equipó la CG con una columna DB-WAXETR (longitud, 30 m; diámetro interno, 0,25 mm; grosor de capa, 0,5 µm; Agilent Technologies, Alemania). Se usó el inyector fraccionado/no fraccionado y se mantuvo a 180°C. Se calentaron las muestras durante 30 min a 70°C en el inyector automático de espacio de cabeza antes de la inyección (temperatura de aguja: 110°C). Se usó helio como gas portador. Tras empezar a 60°C, se elevó la temperatura del horno tras 2 min desde 60°C hasta 230°C a 45°C/min y se mantuvo finalmente a 230°C durante 5 min. Durante el programa de CG se mantuvo una velocidad de flujo constante (10 ml/min) del gas portador (He). La temperatura del FID se mantuvo constante a 220°C respectivamente. Se analizaron los resultados con el software Turbochrom.

Análisis de tiol

Se llevaron a cabo análisis de tiol por Hill Laboratories, Hamilton, Nueva Zelanda. Se midieron dos compuestos: 3-mercaptohexan-1-ol (ruibarbo, fruta exótica) y acetato de 3-mercaptohexilo (fruta de la pasión).

15 Resultados

Se realizó análisis de sabor del producto terminado en tres muestras: 1) la cerveza de control = Jubilæum øl, 2) la cerveza filtrada y 3) la cerveza sin filtrar (véanse las figuras 27 a 38). El análisis de sabor muestra claramente que la cerveza fermentada con *Pichia kluyveri* tiene concentraciones aumentadas de compuestos de sabor. Especialmente, los ésteres acetato de isoamilo (figura 29), propionato de etilo (figura 30), valerato de etilo (figura 32), octanoato de etilo (figura 34) y decanoato de etilo (figura 35) aumentan en altas cantidades. Estos ésteres son responsables de los sabores afrutados en las cervezas y son, por tanto, de gran importancia. Estos resultados también muestran que la producción de cerveza a una escala de producción grande (15 hl), que es un aumento enorme en la escala a partir de una escala de laboratorio, confirma el aumento del sabor afrutado en la cerveza. Eso significa que las fábricas de cerveza pueden usar *Pichia kluyveri* en la elaboración de cerveza a escala de producción y aún estar seguras del efecto de la levadura sobre la cerveza.

La cerveza de control y de *Pichia* también se analizaron para determinar los compuestos de sabor de tiol. Se midieron dos compuestos: 3-mercaptohexanol (ruibarbo, fruta exótica) y acetato de 3-mercaptohexilo (fruta de la pasión) (véase la figura 38). Esta es la primera vez que se documenta que *Pichia kluyveri* puede convertir 3-mercaptohexanol en acetato de 3-mercaptohexilo en la cerveza, y esto es en gran medida. Tal como puede observarse a partir de la figura 38, *Pichia kluyveri* usa 3-mercaptohexan-1-ol para producir acetato de 3-mercaptohexilo, y esto es en una mayor medida que cuando sólo se usó la cepa de levadura de cerveza *Saccharomyces* (cerveza de control).

Depósitos

Se depositaron las cepas *Pichia kluyveri* PK-KR1 y PK-KR2 el 24 de agosto de 2006 en el National Measurement Institute, 51-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, por la University of Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, Nueva Zelanda, y a las que se les dio los números de registro V06/022711 y V06/022712, respectivamente, tal como se describió en el documento WO 2009/110807.

Bibliografía

Daenen L, Saison D, Sterckx F, Delvaux FR, Verachtert H, y Derdelinckx G. (2008) Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *J Appl Microbiol* 104:478-488.

Domizio P, Romani C, Lencioni L, Comitini F, Gobbi M, Mannazzu I, y Ciani M. (2011) Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: selection of putative spoilage wine strains to be used in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int J Food Microbiol.* 147:170-80.

King AJ, y Dickinson RJ. (2003) Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Res* 3:53-62.

Saerens SMG, Duong CT, y Nevoigt E. (2010) Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1195-1212.

Takoi K, Koie K, Itoga Y, Katayama Y, Shimase M, Nakayama Y, y Watari J. (2010) Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavour of hopped beer. *J Agric Food Chem* 58:5050-5058.

Verachtert H, Kumara HMC, Dawoud E (1989) Yeast in mixed cultures with emphasis on lambic beer brewing. En: Verachtert H, De Mot R (eds) *Yeast-biotechnology and biocatalysis*. Dekker, Nueva York, págs. 429-478.

Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufour JP, Winderickx J, Thevelein JM, Pretorius IS, y Delvaux FR. (2003) Flavoractive esters: adding fruitiness to beer. *J Biosci Bioeng* 96:110-118.

ES 2 674 601 T3

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

Documento WO 2008/077986

Documento WO 2009/110807

5 Documento DD 288619

REIVINDICACIONES

1. Método de elaboración de cerveza que comprende las etapas de
 - a) proporcionar un mosto;
 - b) añadir al menos una variedad de lúpulo para obtener un mosto lupulado;
- 5 c) fermentar el mosto lupulado con una primera cepa de levadura, en el que la primera cepa de levadura es una *Pichia kluyveri*; y
- d) fermentar el mosto lupulado con una segunda cepa de levadura para obtener una cerveza, en el que la segunda cepa de levadura pertenece a los géneros *Saccharomyces* o *Brettanomyces*.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa c) y la etapa d) se llevan a cabo secuencialmente.
- 10 3. Método según la reivindicación 2, en el que se permite que la fermentación en la etapa c) avance durante al menos 12 horas, tal como al menos 24 horas, tal como al menos 36 horas, tal como al menos 48 horas, tal como al menos 60 horas, tal como al menos 72 horas, antes del inicio de la fermentación en la etapa d).
4. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa c) y la etapa d) se llevan a cabo al mismo tiempo mediante inoculación conjunta de la primera cepa de levadura de la etapa c) y la segunda cepa de levadura de la etapa d).
- 15 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se permite que la etapa d) avance durante al menos 24 horas, tal como al menos 36 horas, tal como al menos 48 horas, tal como al menos 72 horas, tal como al menos 96 horas, tal como al menos 120 horas.
6. Método según cualquiera de las presentes reivindicaciones, en el que la al menos una variedad de lúpulo se selecciona del grupo que consiste en Saaz, Nelson Sauvin, Cascade y Amarillo.
- 20 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fermentación en la etapa c) se lleva a cabo a entre aproximadamente 12°C y 28°C.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la fermentación en la etapa c) se lleva a cabo a entre aproximadamente 20°C y 22°C.
- 25 9. Método según la reivindicación 8, en el que la cepa de *Pichia kluyveri* se selecciona del grupo que consiste en *Pichia kluyveri* PK-KR1 y *Pichia kluyveri* PK-KR2 tal como se depositaron el 24 de agosto de 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, Nueva Zelanda, con los números de registro V06/022711 y V06/022712, respectivamente, y mutantes y variantes de las mismas.
- 30 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda cepa de levadura se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* y *Brettanomyces bruxellensis*.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cerveza es una cerveza de bajo contenido en alcohol, de contenido en alcohol reducido o sin alcohol.
- 35 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el uso de una cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) aumenta el contenido de al menos un compuesto de sabor seleccionado del grupo que consiste en acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, propionato de etilo, valerato de etilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo en al menos el 50%.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el uso de una cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) aumenta el contenido del tiol acetato de 3-mercaptohexilo en al menos el 10%.
- 40 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cuando la al menos una variedad de lúpulo en la etapa b) es cualquier variedad seleccionada del grupo que consiste en Ahtanum, Amarillo, Apollo, Cascade, Centennial, Chinook, Citra, Cluster, Columbus, Crystal, Eroica, Galena, Glacier, Greenburg, Horizon, Liberty, Millenium, Mount Hood, Mount Rainier, Newport, Nugget, Palisade, Santiam, Simcoe, Sterling, Summit, Tomahawk, Ultra, Vanguard, Warrior, Willamette, Zeus, Admiral, Brewer's Gold, Bullion, Challenger, First Gold, Fuggles, Goldings, Herald, Northdown, Northern Brewer, Phoenix, Pilot, Pioneer, Progress, Target, Whitbread Golding Variety (WGV), Hallertau, Hersbrucker, Saaz, Tettang, Spalt, Feux-Coeur Francais, Galaxy, Green Bullet, Motueka, Nelson Sauvin, Pacific Gem, Pacific Jade, Pacifica, Pride of Ringwood, Riwaka, Southern Cross, Lublin, Magnum, Perle, Polnischer Lublin, Saphir, Satus, Select, Strisselspalt, Styrian Goldings, Tardif de Bourgogne, Tradition, Bravo, Calypso, Chelan, Comet, El Dorado, San Juan Ruby Red, Satus, Sonnet Golding, Super Galena, Tillicum, Bramling Cross, Pilgrim,
- 45
- 50

5 Hallertauer Herkules, Hallertauer Magnum, Hallertauer Taurus, Merkur, Opal, Smaragd, Hallertauer Aroma,
 Kohatu, Rakau, Stella, Sticklebract, Summer Saaz, Super Alpha, Super Pride, Topaz, Wai-iti, Bor, Junga,
 Marynka, Premiant, Sladek, Styrian Atlas, Styrian Aurora, Styrian Bobek, Styrian Celeia, Sybilla y Sorachi
 Ace, el uso de la cepa de levadura *Pichia kluyveri* en la etapa c) dará como resultado un perfil de sabor de
 niveles de los compuestos de sabor acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, propionato de etilo y valerato
 de etilo que es diferente de un perfil de sabor que resulta del uso de la cepa de levadura *Pichia kluyveri* en
 10 la etapa c) cuando la variedad de lúpulo en la etapa b) es cualquier otra variedad seleccionada del grupo
 que consiste en Ahtanum, Amarillo, Apollo, Cascade, Centennial, Chinook, Citra, Cluster, Columbus,
 Crystal, Eroica, Galena, Glacier, Greenburg, Horizon, Liberty, Millenium, Mount Hood, Mount Rainier,
 Newport, Nugget, Palisade, Santiam, Simcoe, Sterling, Summit, Tomahawk, Ultra, Vanguard, Warrior,
 Willamette, Zeus, Admiral, Brewer's Gold, Bullion, Challenger, First Gold, Fuggles, Goldings, Herald,
 Northdown, Northern Brewer, Phoenix, Pilot, Pioneer, Progress, Target, Whitbread Golding Variety (WGV),
 Hallertau, Hersbrucker, Saaz, Tettnang, Spalt, Feux-Coeur Francais, Galaxy, Green Bullet, Motueka, Nelson
 15 Sauvín, Pacific Gem, Pacific Jade, Pacifica, Pride of Ringwood, Riwaka, Southern Cross, Lublin, Magnum,
 Perle, Polnischer Lublin, Saphir, Satus, Select, Strisselspalt, Styrian Goldings, Tardif de Bourgogne,
 Tradition, Bravo, Calypso, Chelan, Comet, El Dorado, San Juan Ruby Red, Satus, Sonnet Golding, Super
 Galena, Tillicum, Bramling Cross, Pilgrim, Hallertauer Herkules, Hallertauer Magnum, Hallertauer Taurus,
 Merkur, Opal, Smaragd, Hallertauer Aroma, Kohatu, Rakau, Stella, Sticklebract, Summer Saaz, Super Alpha,
 Super Pride, Topaz, Wai-iti, Bor, Junga, Marynka, Premiant, Sladek, Styrian Atlas, Styrian Aurora, Styrian
 20 Bobek, Styrian Celeia, Sybilla y Sorachi Ace.

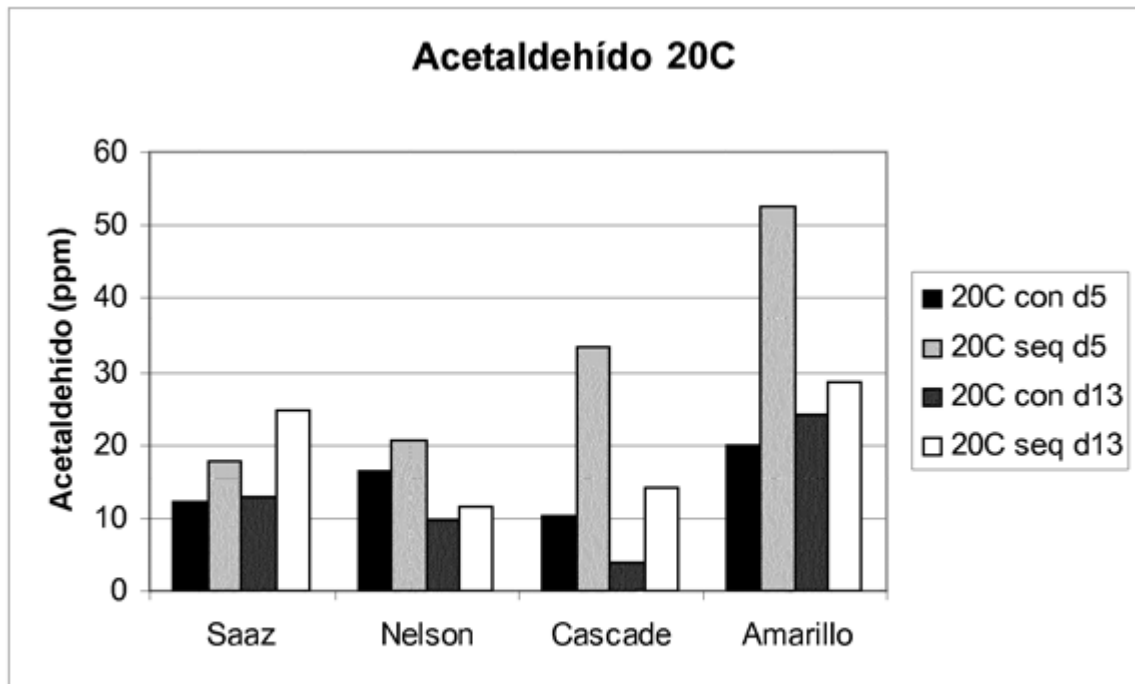


Figura 1

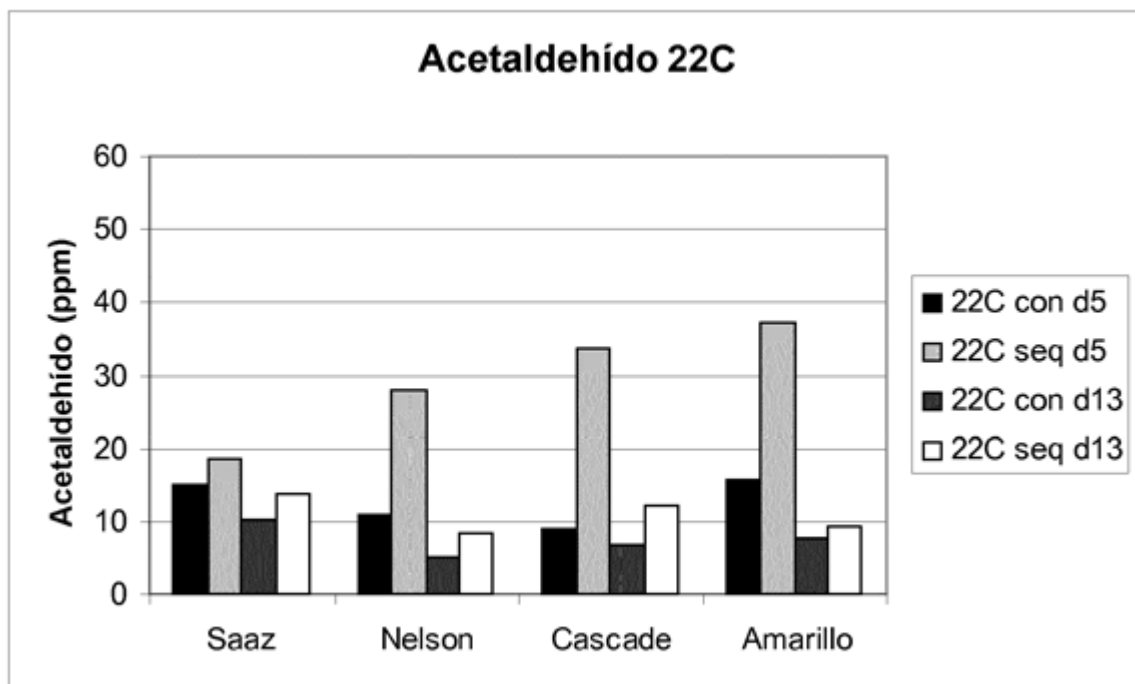


Figura 2

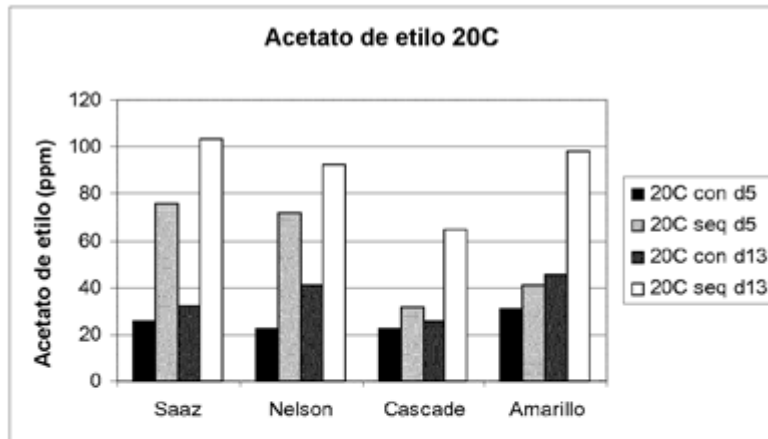


Figura 3

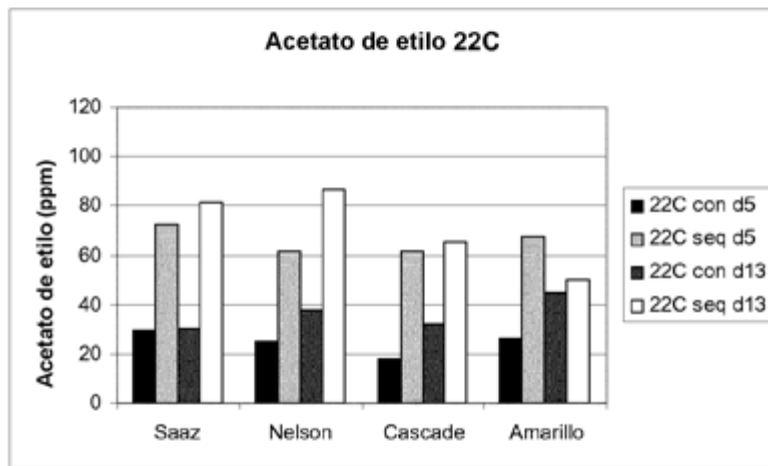


Figura 4

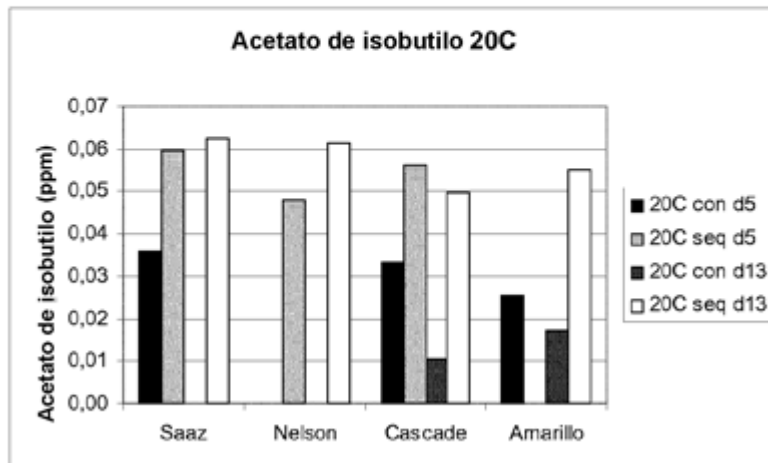


Figura 5

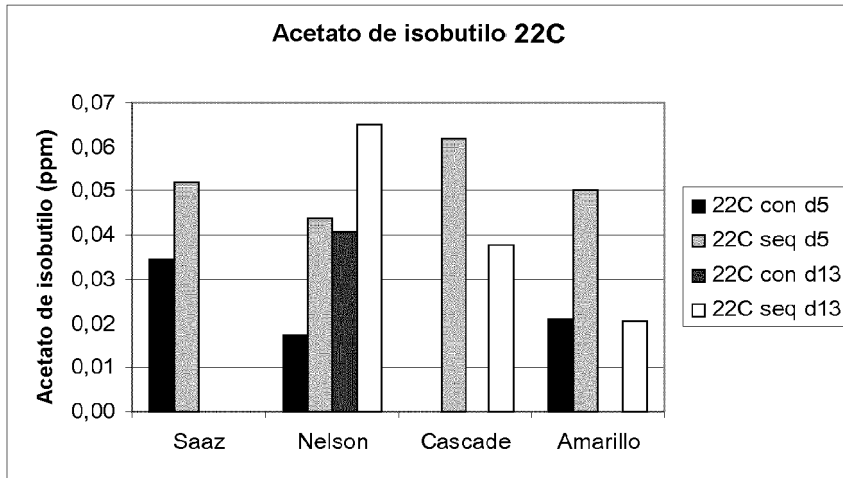


Figura 6

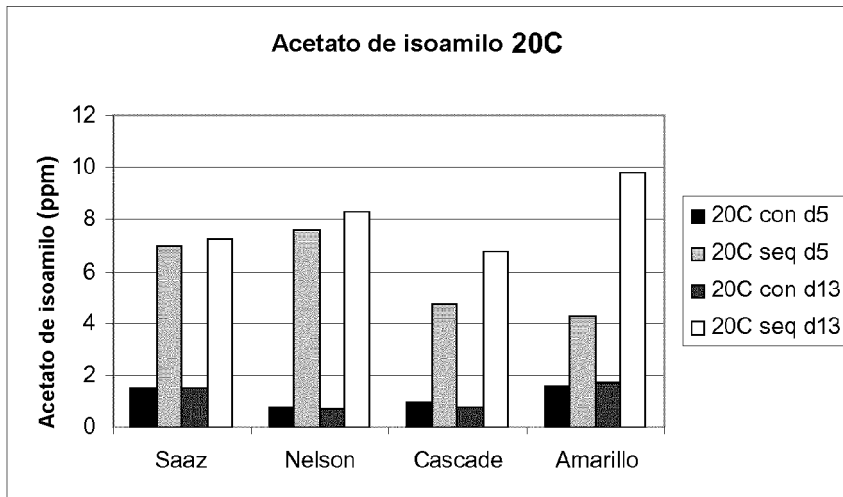


Figura 7

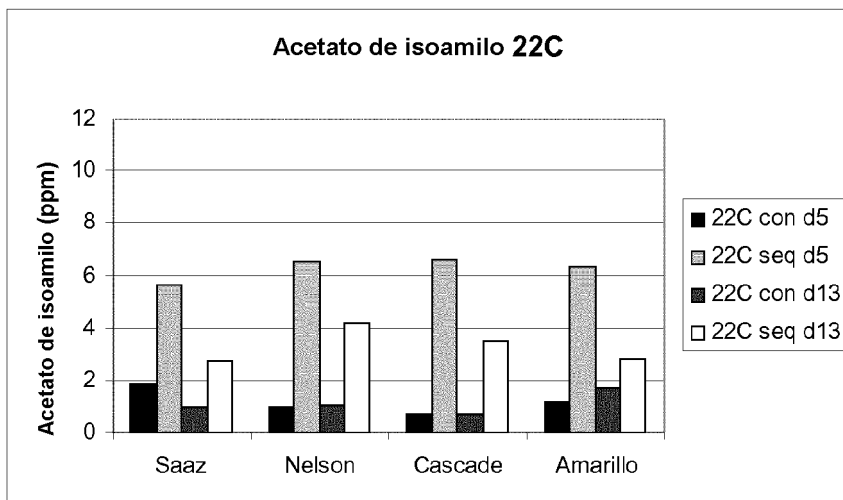


Figura 8

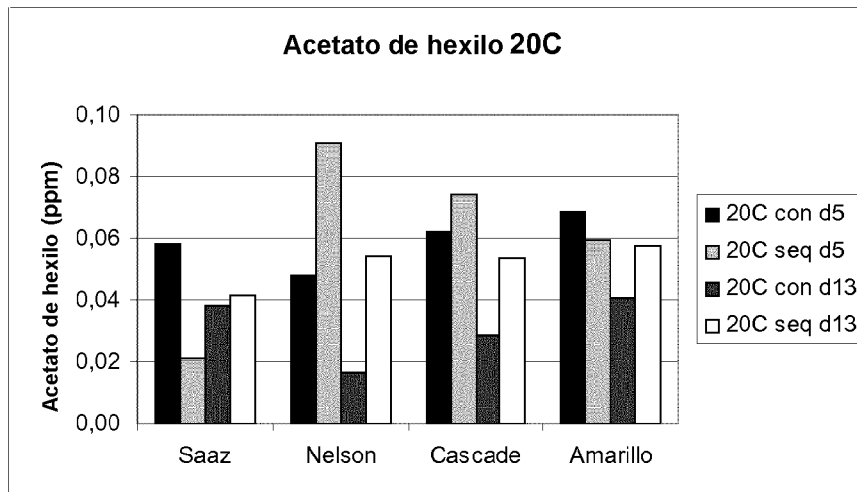


Figura 9

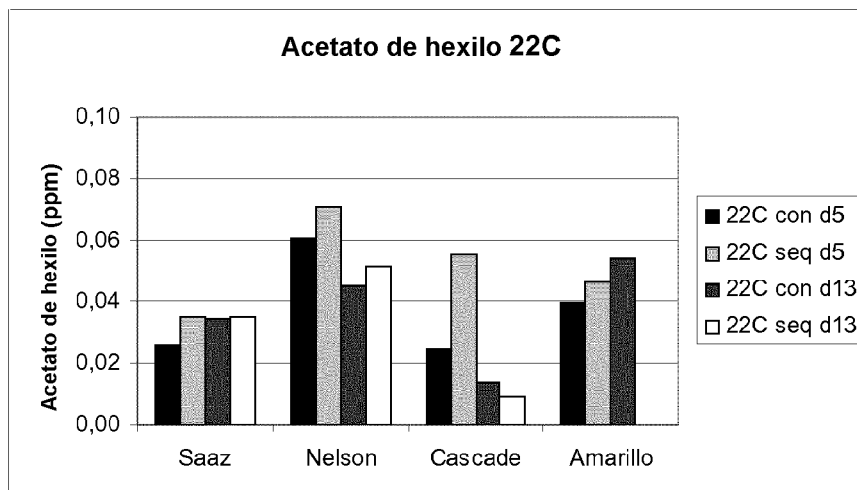


Figura 10

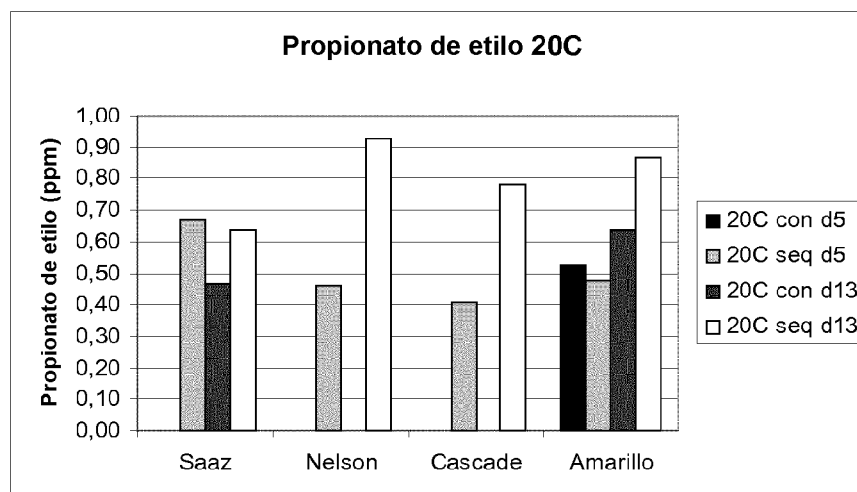


Figura 11

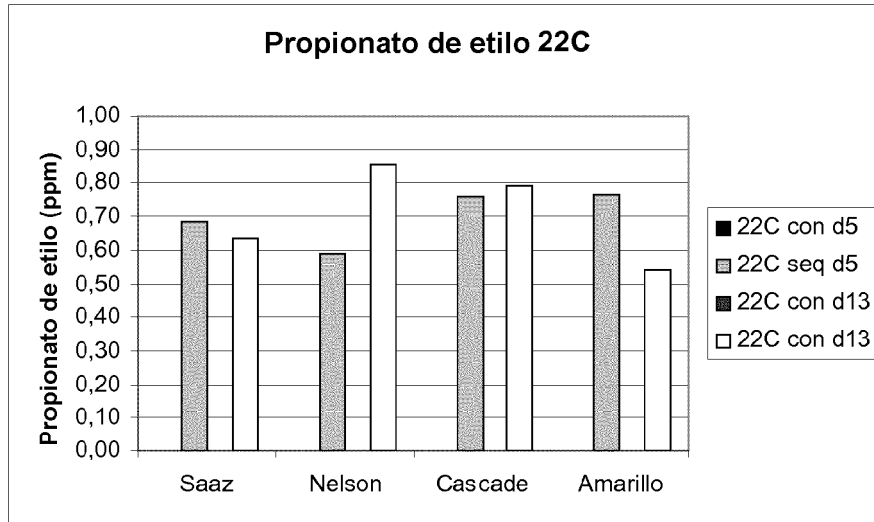


Figura 12

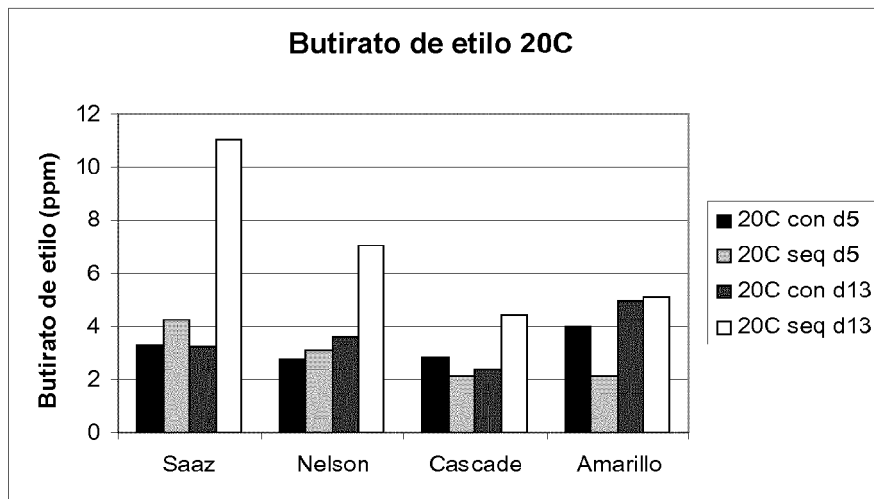


Figura 13

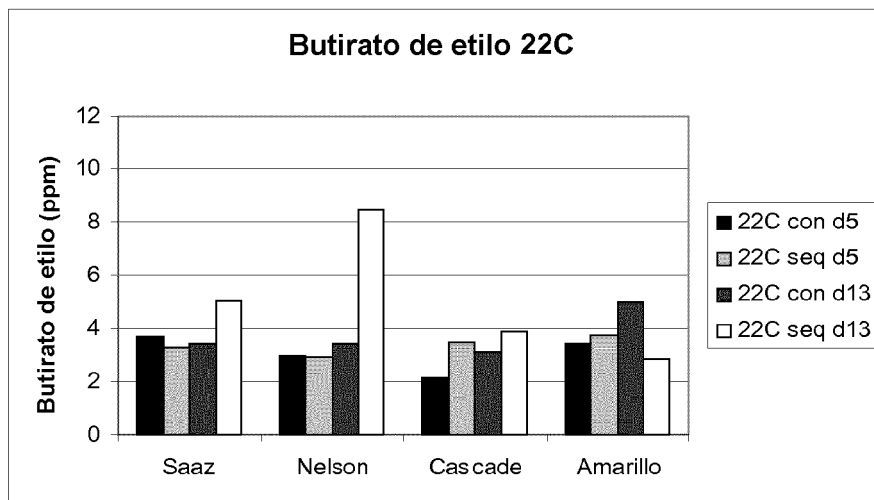


Figura 14

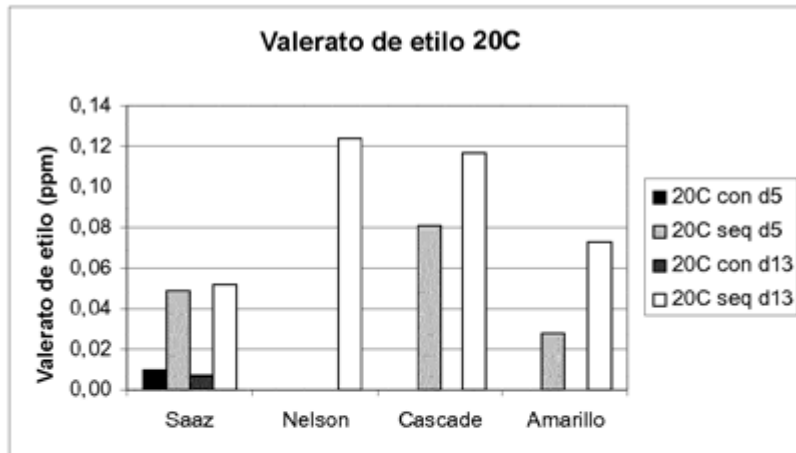


Figura 15

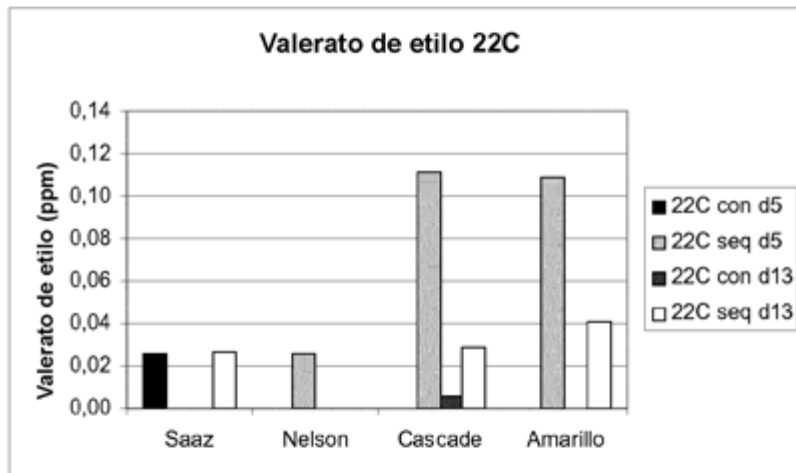


Figura 16

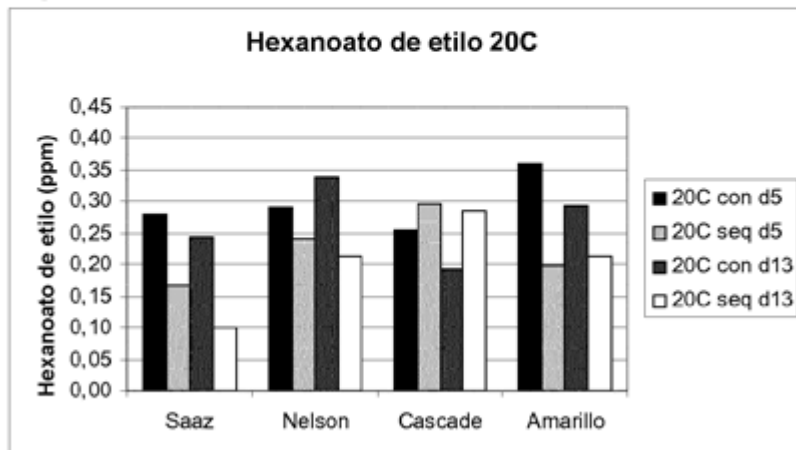


Figura 17

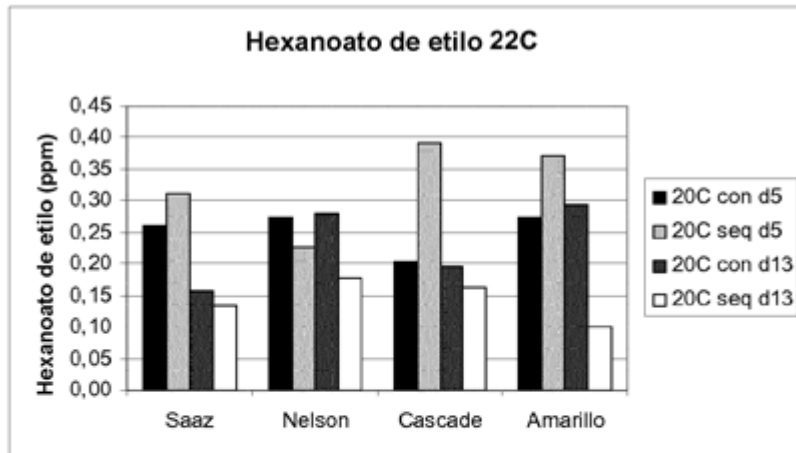


Figura 18

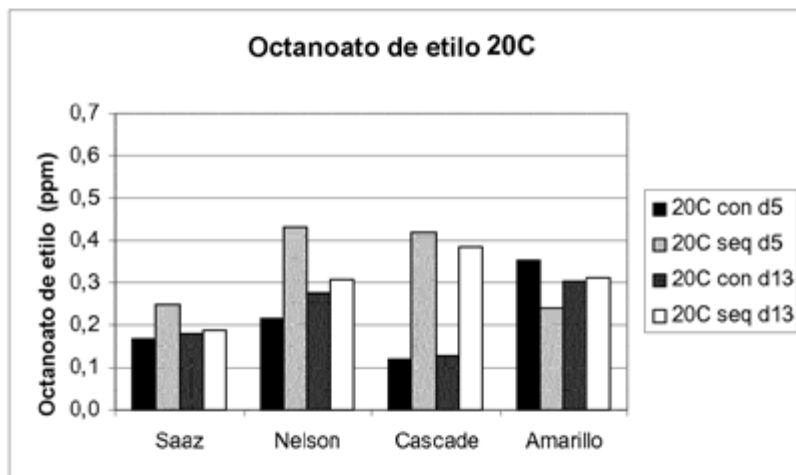


Figura 19

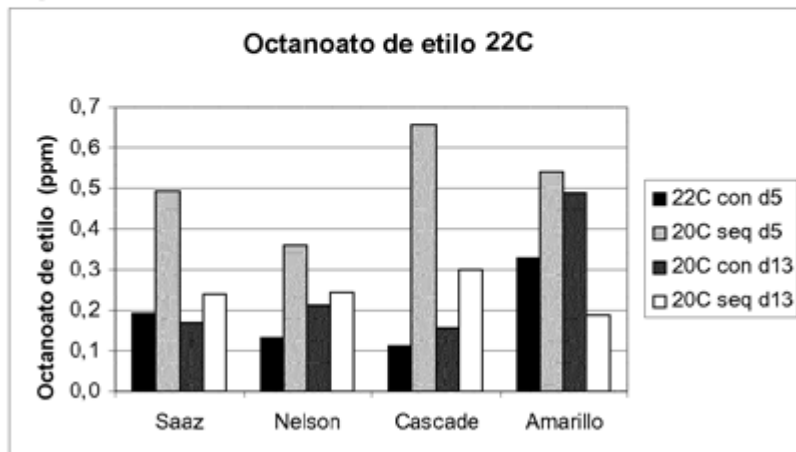


Figura 20

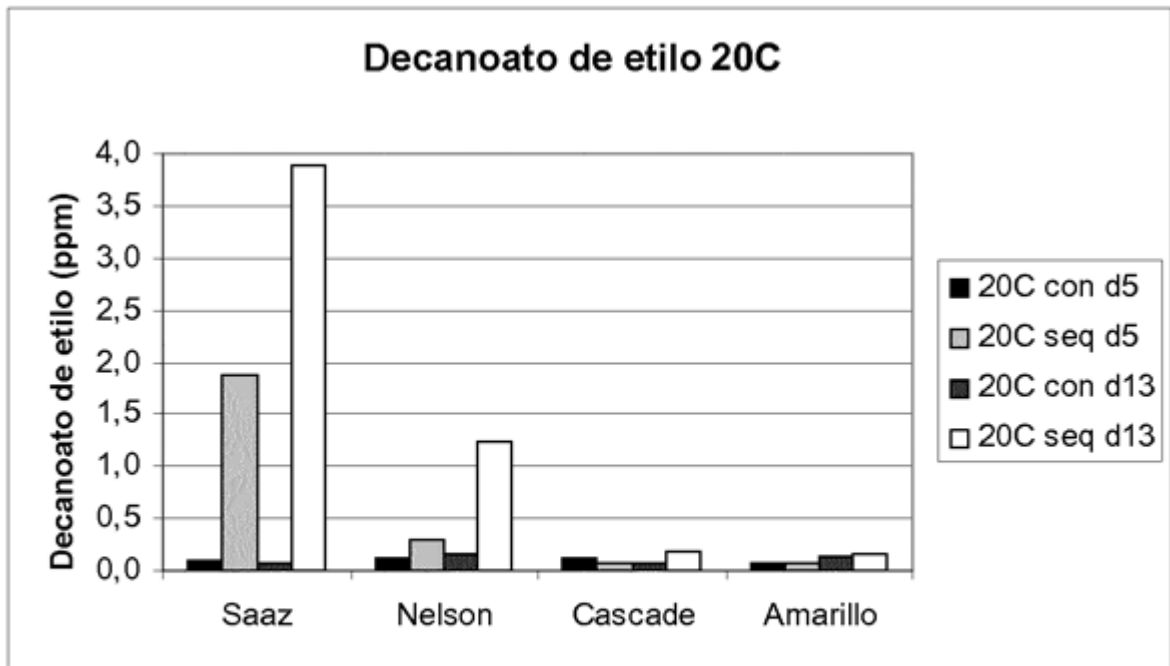


Figura 21

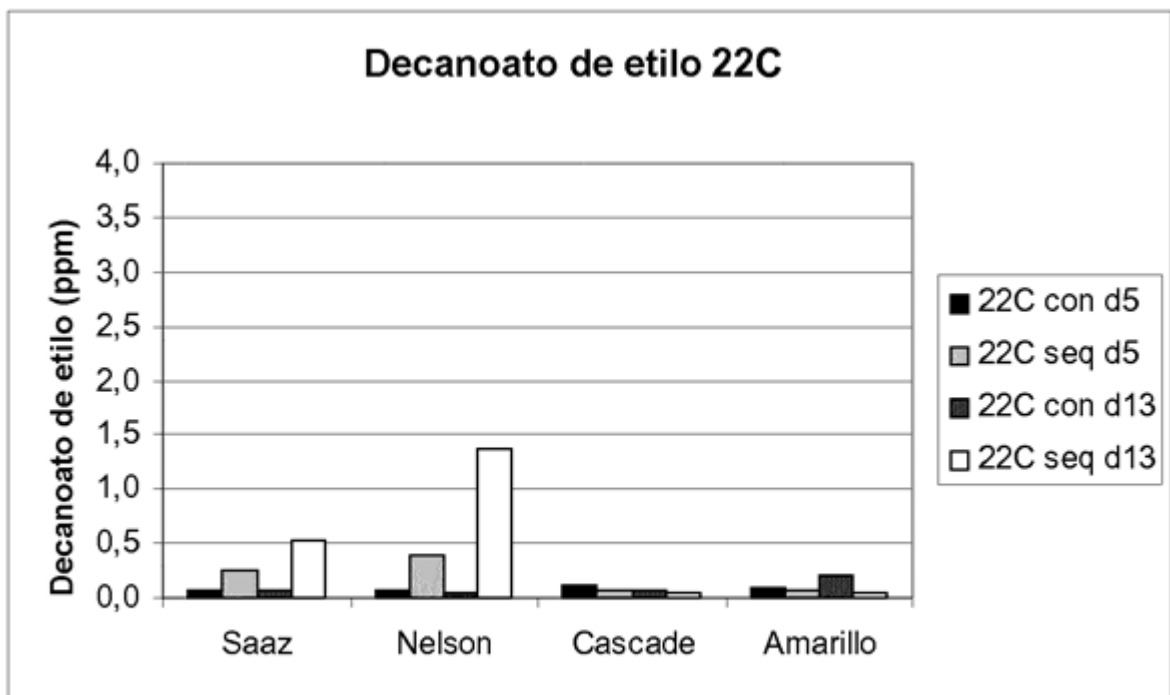


Figura 22

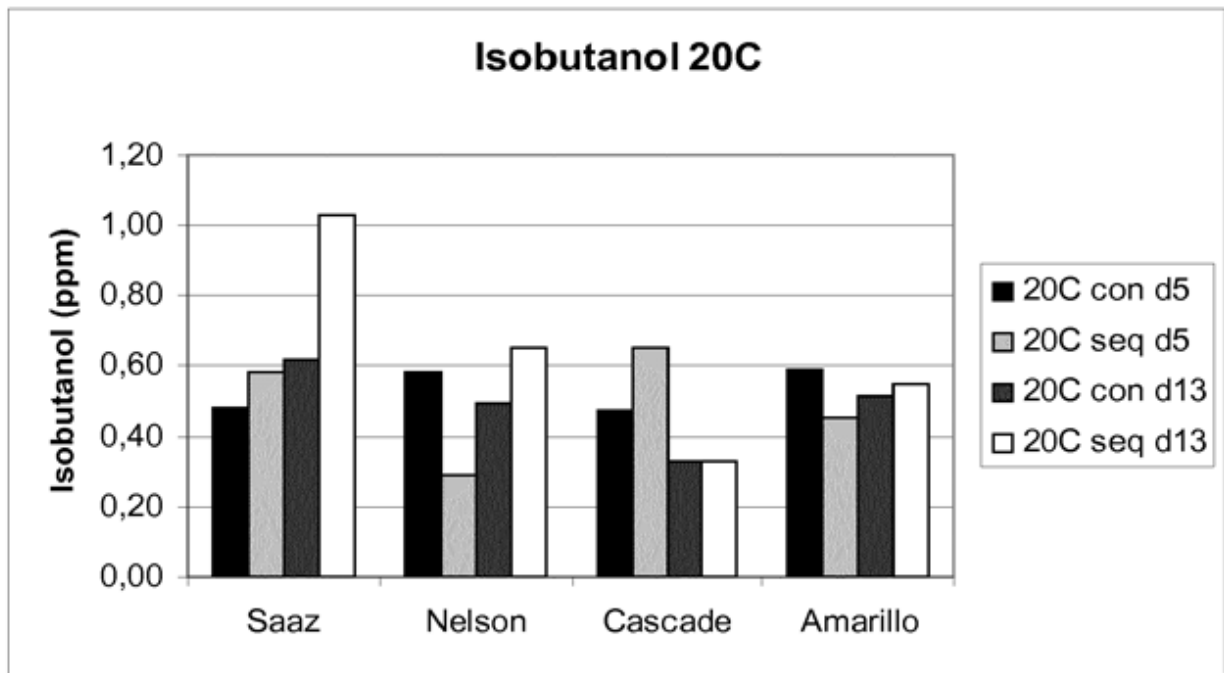


Figura 23

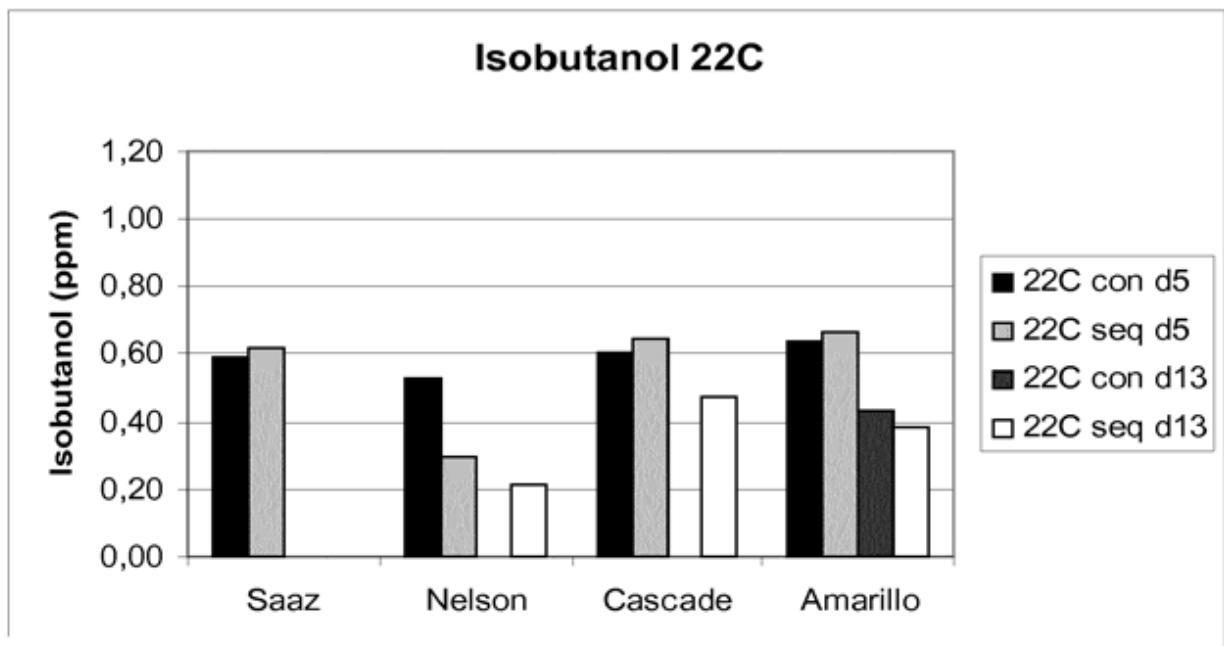


Figura 24

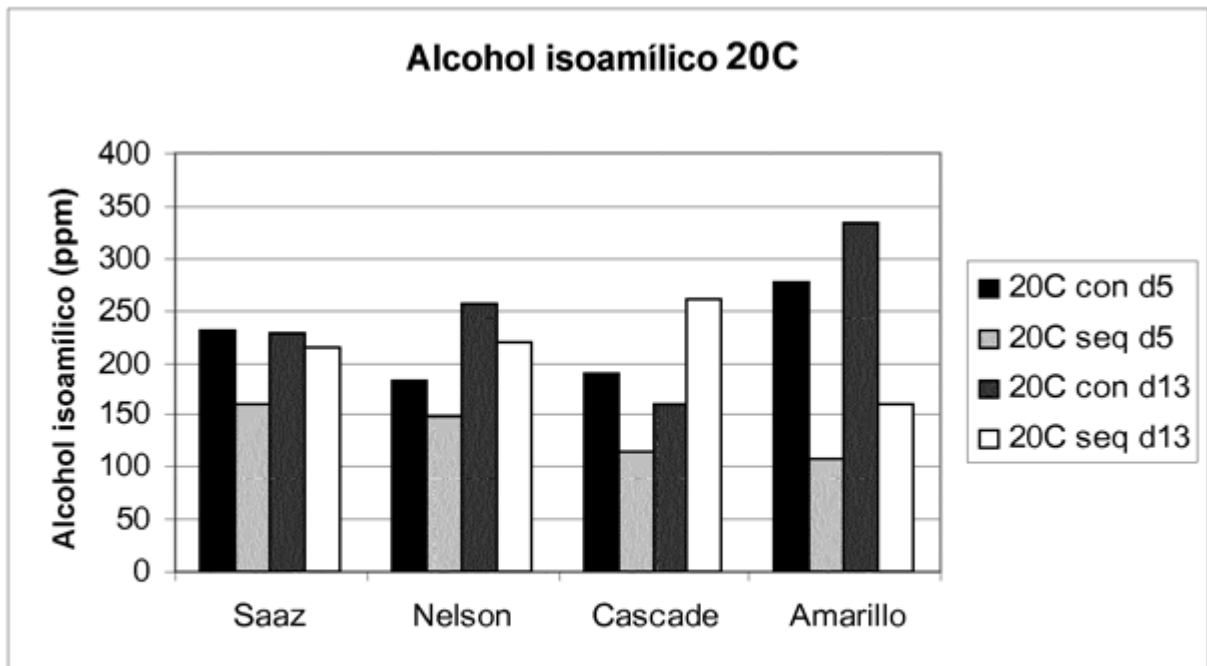


Figura 25

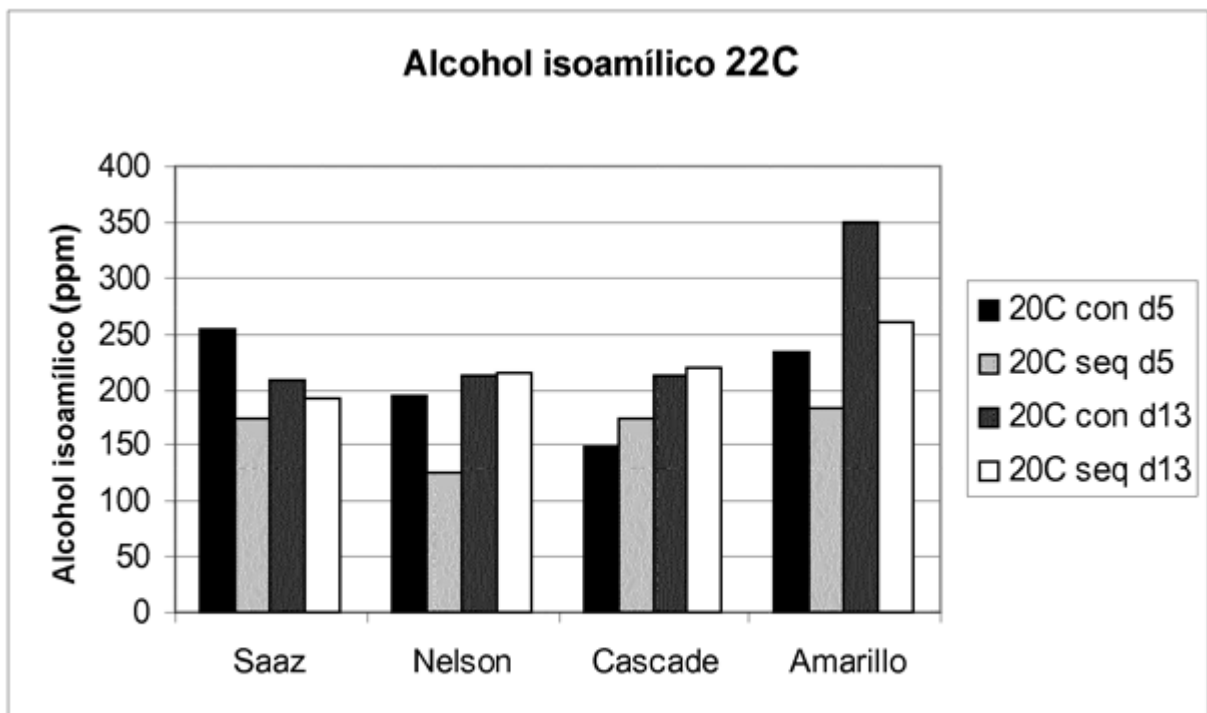


Figura 26

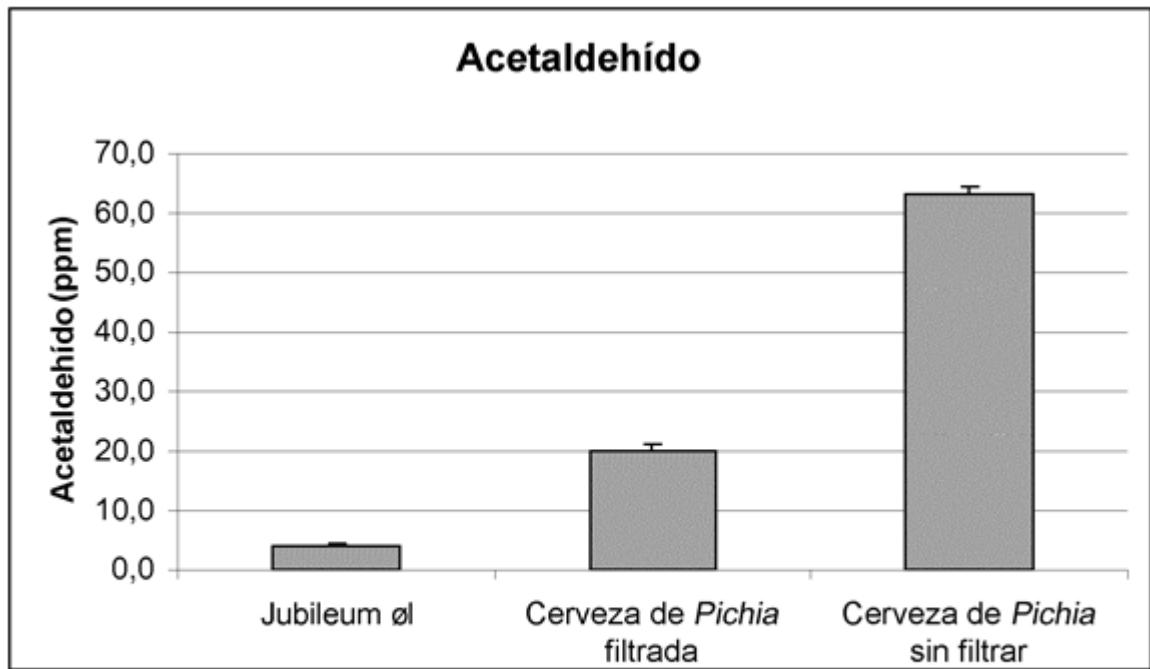


Figura 27

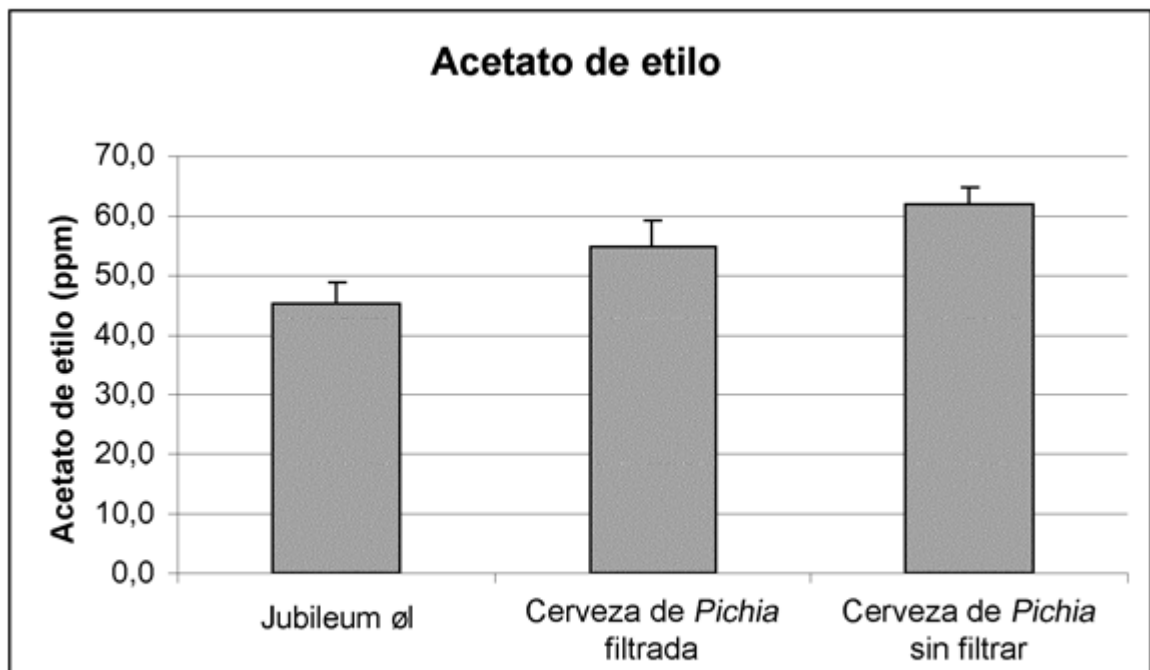


Figura 28

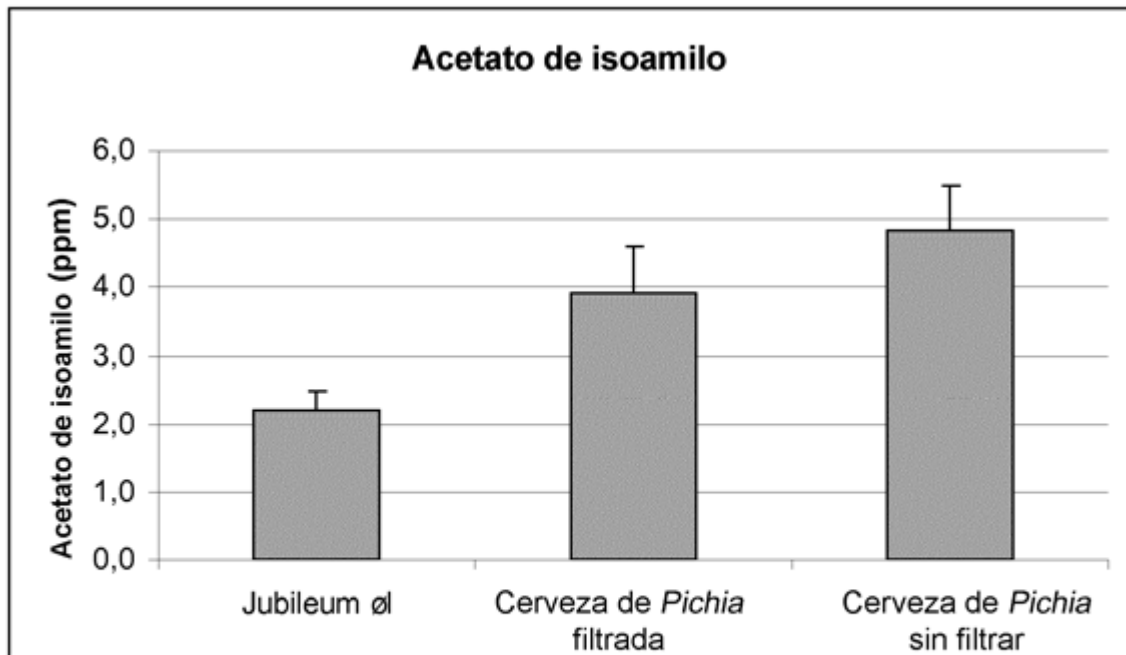


Figura 29

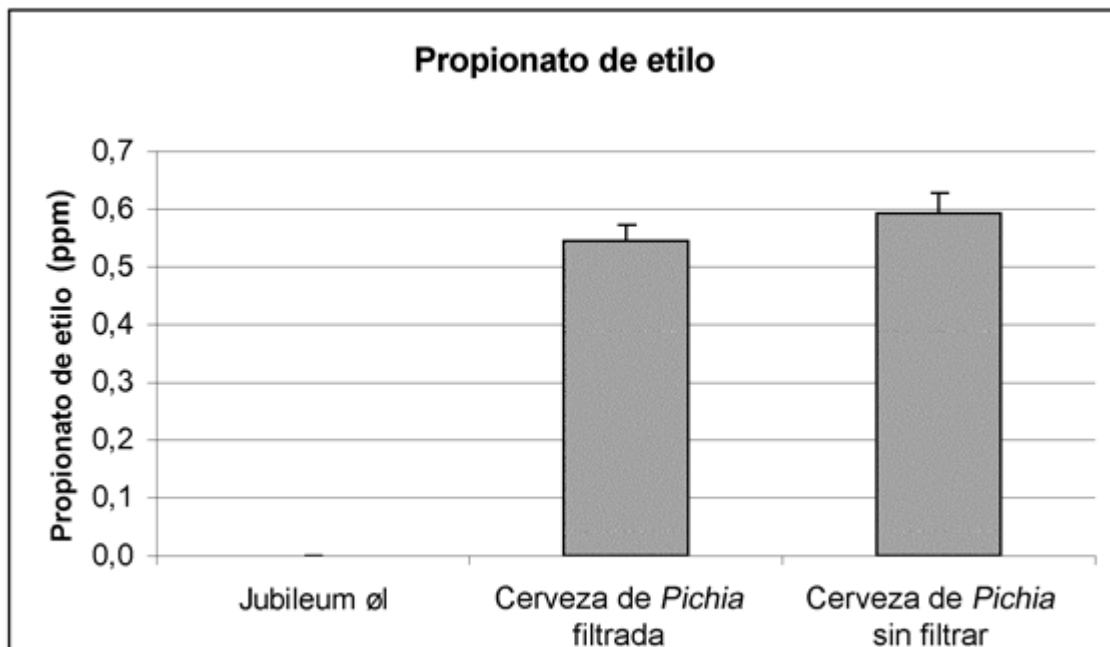


Figura 30

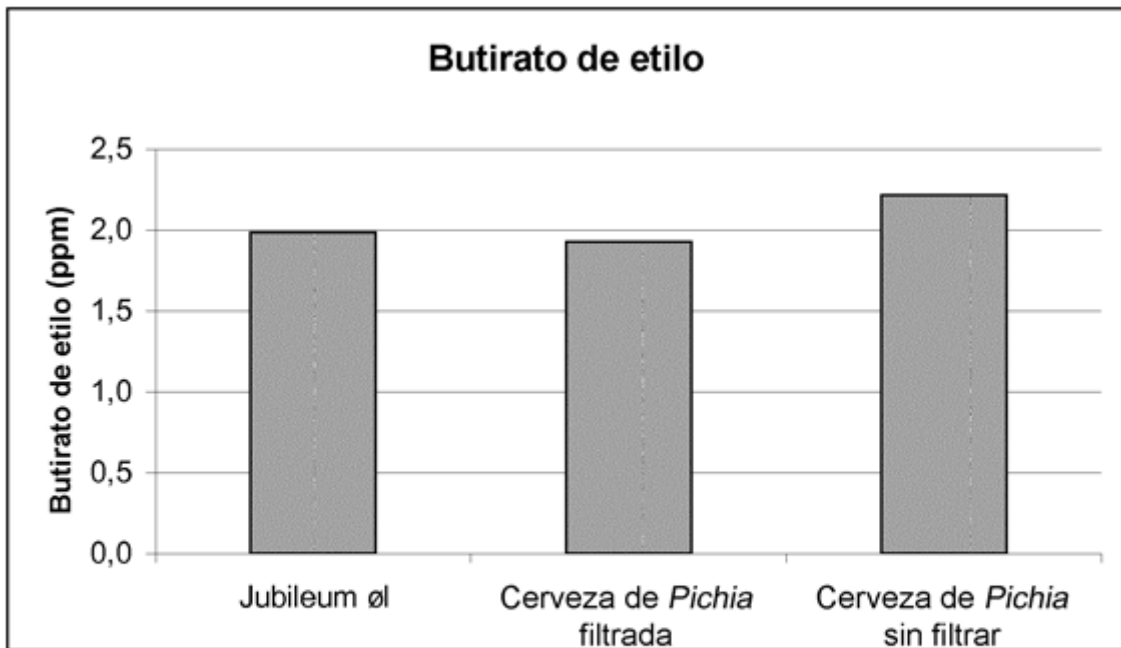


Figura 31

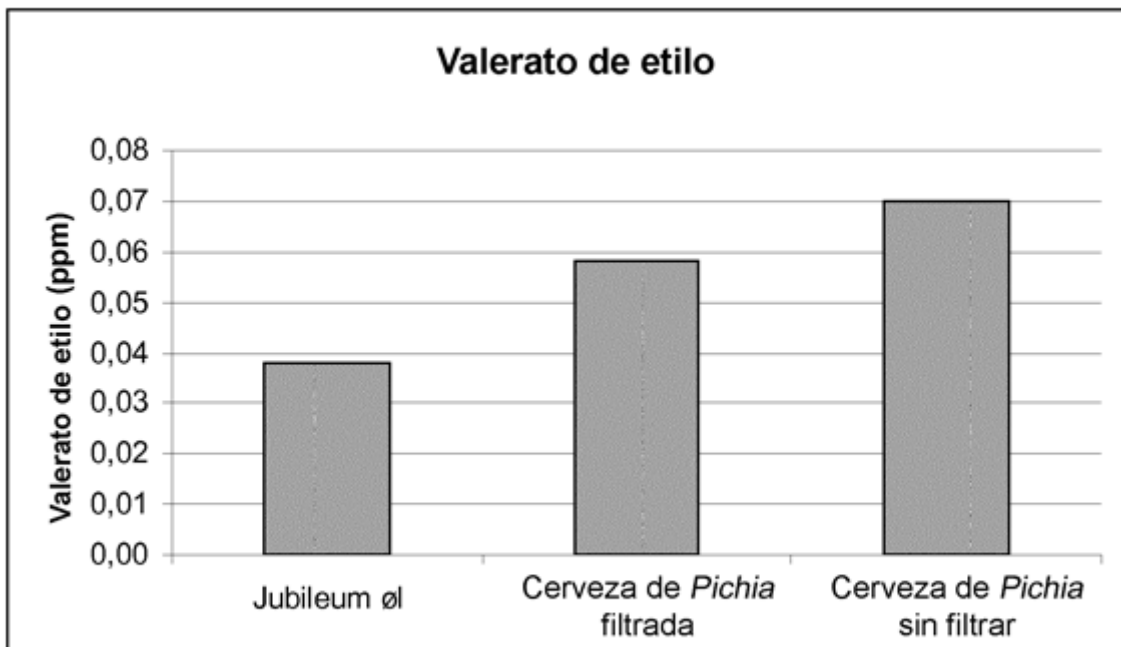


Figura 32

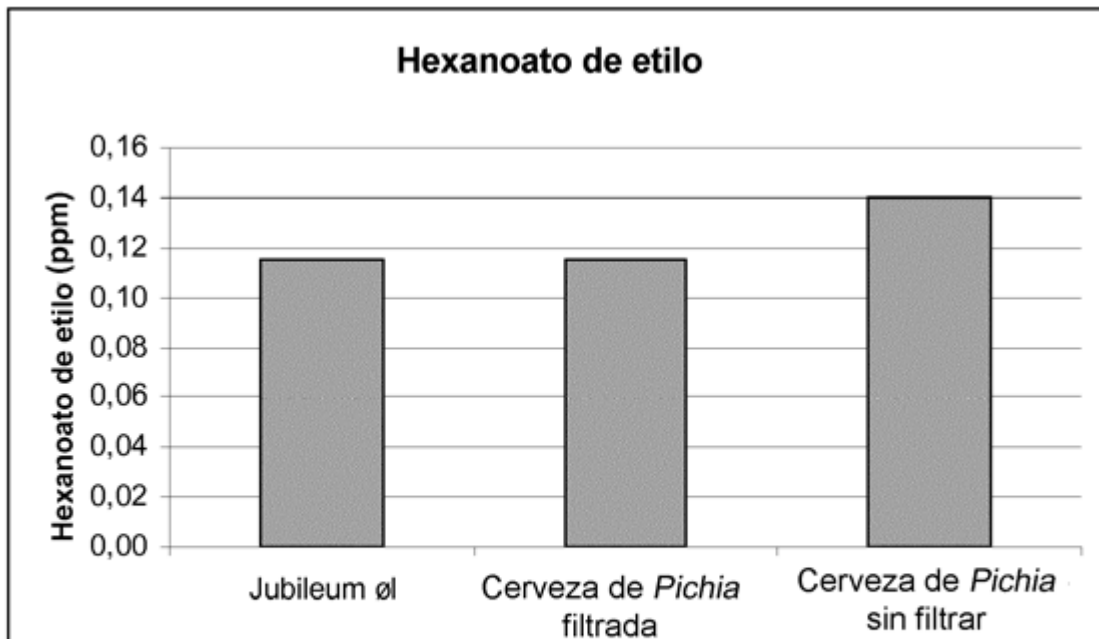


Figura 33

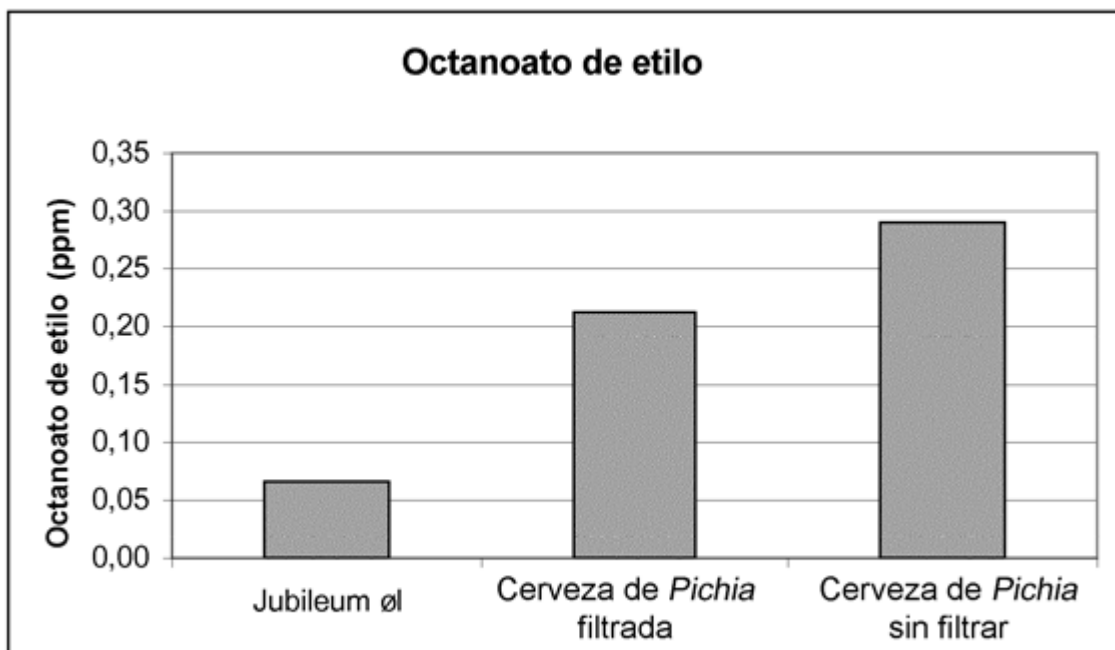


Figura 34

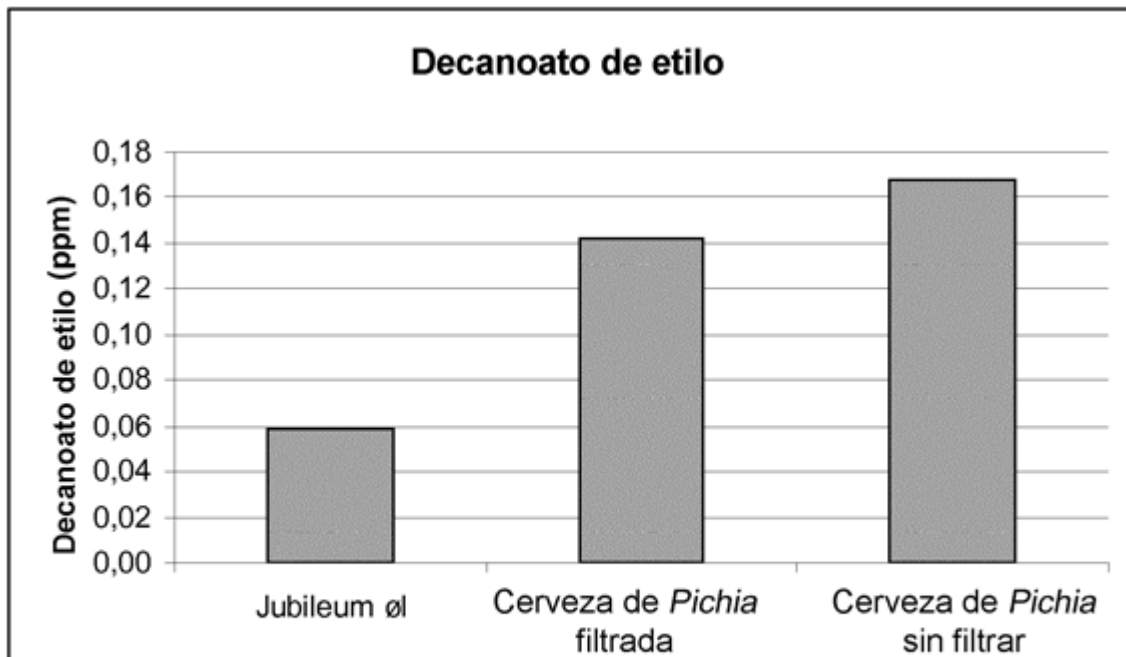


Figura 35

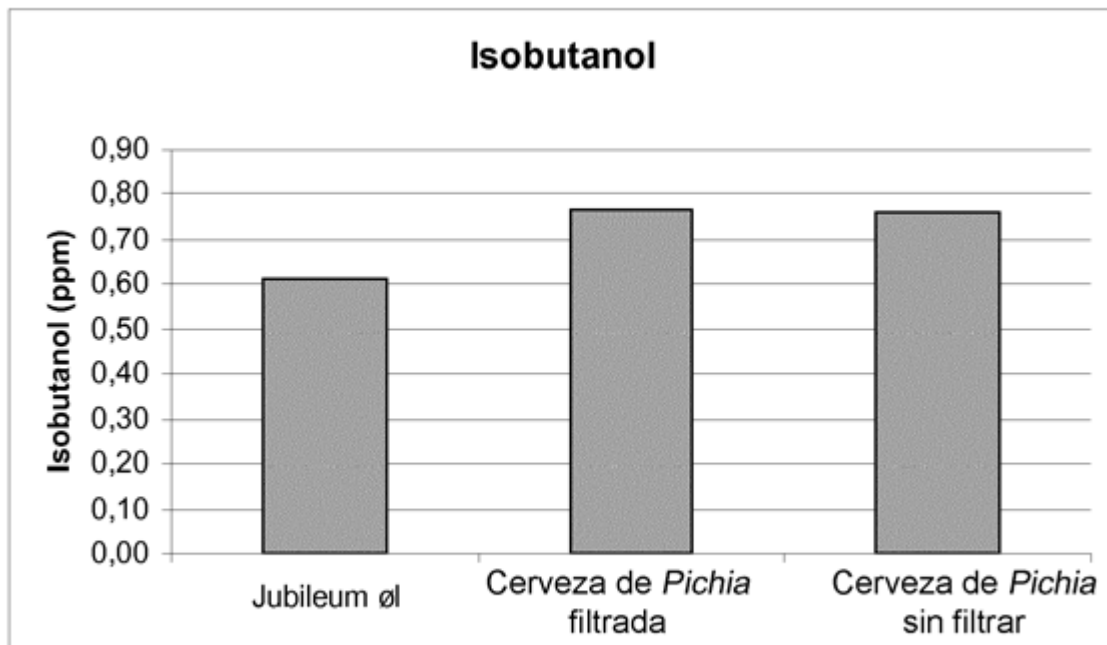


Figura 36

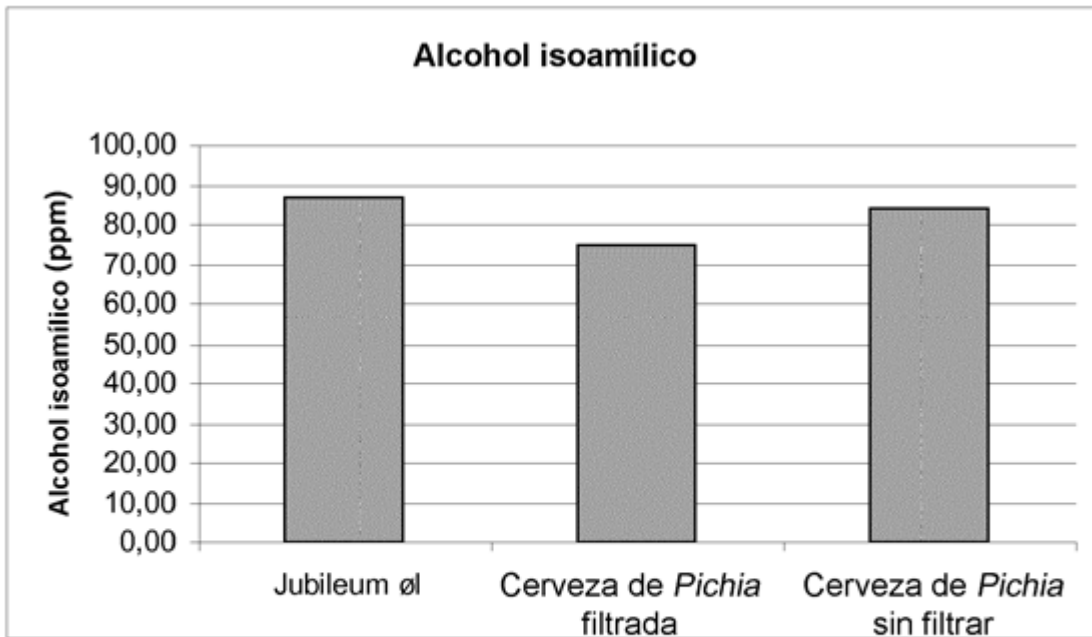


Figura 37

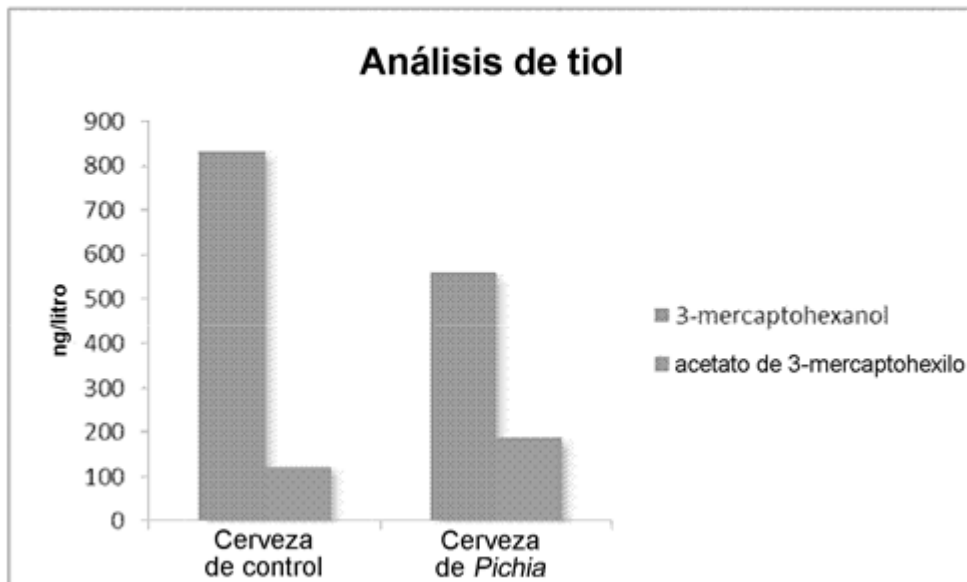


Figura 38