

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 078**

51 Int. Cl.:

**C12C 12/00** (2006.01)

**C12C 12/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014 E 17206691 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3354717**

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

30 Prioridad:

**07.03.2013 EP 13158261**

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

**23.12.2020**

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:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 800 078 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 baja en alcohol o sin alcohol con cepas de levadura *Pichia kluyveri*

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la cerveza baja en alcohol o sin alcohol. Específicamente, la invención se refiere a una cerveza baja en alcohol o sin alcohol con un contenido en alcohol de no más del 1,2% (vol/vol) que tiene un contenido en acetato de isoamilo de al menos 0,5 ppm (mg/l) que comprende *Pichia kluyveri* como la única especie de cepa de levadura añadida.

10 **Antecedentes de la invención**

Debido a la demanda creciente de alimentos y bebidas más saludables, la reducción de etanol en bebidas alcohólicas, en especial cerveza y vino, es de interés comercial considerable.

Las cervezas bajas en alcohol, sin alcohol o con alcohol reducido (también llamadas cerveza light, cerveza sin, no alcohólica, cerveza débil, ale débil, casi-cerveza) son cervezas sin alcohol o con un bajo contenido en alcohol cuyo fin es reproducir el sabor completo de cervezas estándar que normalmente contienen más del 4% (vol/vol) de alcohol. En la mayoría de los países de la UE las cervezas con bajo contenido en alcohol se dividen en cervezas sin alcohol que contienen no más del 0,5% (vol/vol) de alcohol, y en cervezas bajas en alcohol con no más del 1,2% (vol/vol) de alcohol. En los Estados Unidos cerveza sin alcohol significa que no hay alcohol presente, mientras que el límite superior del 0,5% (vol/vol) de alcohol corresponde a la denominada cerveza no alcohólica o casi cerveza (Montanari *et al.* 2009).

La conversión del mosto a una cerveza alcohólica es el resultado de un proceso de fermentación por la levadura *Saccharomyces* ssp. que da como resultado la producción de alcohol y compuestos de sabor derivados de la fermentación, tal como ésteres (por ejemplo, acetato de isoamilo) y alcoholes superiores. El acetato de isoamilo es un compuesto de sabor clave en la cerveza (Saerens *et al.* 2010). La combinación del sabor de las materias primas, principalmente malta y lúpulo, junto con el proceso de fermentación, produce el sabor y gusto únicos de las cervezas (Swiegers *et al.* 2007, Saerens *et al.* 2010).

Hoy las cervezas con bajo contenido en alcohol con frecuencia se hacen produciendo cervezas de alta potencia (con una concentración de alcohol de más del 4% (vol/vol)) y después eliminando el alcohol por procesos físicos (eliminar el alcohol por ebullición/destilación u ósmosis inversa). En el caso de algunas cervezas no alcohólicas o sin alcohol no tiene lugar fermentación y en algunos casos las cervezas se producen simplemente diluyendo las cervezas de alta potencia con agua.

Como los procesos físicos producen evaporación, pérdida o dilución de los compuestos de sabor derivados de la fermentación (o una falta completa de compuestos de sabor derivados de la fermentación como en el caso con la cerveza no fermentada no alcohólica o sin alcohol), estos tipos de cervezas con frecuencia se caracterizan por tener menos sabor que la cerveza de alta potencia o pueden tener un sabor de tipo mosto indeseable (Zufall y Wackerbauer, 2000).

El documento WO2010/084018 divulga un método para producir una bebida que tiene un contenido en etanol de menos del 5% en volumen por medio de una levadura negativa en maltosa. *Pichia kluyveri* no se menciona en el mismo.

Kouadio Florent N'Guessan *et al.*, "Identification of yeasts during alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer from Cote d'Ivoire", *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 99, no. 4, 1 de mayo 2011, páginas 855-864, describe que *P. kluyveri* solo se encontraba en momentos específicos de fermentación (página 862, líneas 15-16, tabla 3).

La patente alemana DD 288619 A5 describe el uso de cepas de levadura *Pichia farinosa* para fermentar mosto de cerveza sin lúpulo para obtener una bebida sin alcohol con aroma frutal.

Sin embargo, existe una necesidad para métodos mejorados para preparar una bebida fermentada baja en alcohol o sin alcohol en donde la presencia de compuestos de sabor deseables, tal como ésteres y alcoholes superiores, está aumentada.

60 **Compendio de la invención**

La presente invención se basa en los sorprendentes hallazgos por los inventores de que cepas de levadura *Pichia kluyveri*, solo capaces de fermentar la glucosa en el mosto de cerveza, son capaces de producir altas concentraciones de compuestos de sabor deseables con solo poca producción de etanol.

Las levaduras de cerveza de *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces carlsbergensis* y *Saccharomyces cerevisiae* utilizan tanto glucosa, así como maltosa, los azúcares principales en el mosto (Boulton y Quain, 2010) lo que produce la formación de alcohol y compuestos de sabor durante la fermentación. Cuanto mayor sea la concentración de azúcares del mosto, más alcohol y compuestos de sabor se producirán. Con el fin de producir menos alcohol, una solución es usar una levadura que solo fermente glucosa y no maltosa, produciendo mediante ello solo alcohol de la glucosa. La glucosa está presente en concentraciones mucho menores que la maltosa en el mosto (Tabla 1) y por tanto se producirá menos alcohol a partir de la misma cantidad de mosto comparado con cuando se usa una levadura de cerveza convencional, por ejemplo, *Saccharomyces pastorianus* o *Saccharomyces carlsbergensis*. Estos tipos de levaduras existen y los ejemplos incluyen ciertas cepas de levaduras de *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*, tal como *Saccharomycodes ssp* (Liu *et al.* 2011).

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

**Tabla 1.** Espectro de azúcar típico del mosto (Stewrat. 2010)

Composición en porcentaje	
Glucosa	10-15
Fructosa	1-2
Sacarosa	1-2
Maltosa	50-60
Maltotriosa	15-20
Dextrinas	20-30

Una manera de resolver este problema es identificar una levadura muy aromática, que no sea capaz de utilizar maltosa, con el fin de producir altas concentraciones de compuestos de sabor derivados de la fermentación relevantes a partir de cantidades limitadas de glucosa, produciendo concentraciones similares o mayores de compuestos de sabor clave que cuando tiene lugar la fermentación completa. Los inventores de la presente invención han encontrado que usando este método y cepas de la levadura *Pichia kluyveri*, es posible producir cerveza sin alcohol y cerveza baja en alcohol (según la legislación de la UE) con el mismo sabor que cervezas de alta potencia, estándar. Esto no es posible usando levadura de cerveza convencional tal como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* o *Saccharomyces carlsbergensis*, dilución, procesos de eliminación del alcohol físicos o cervezas producidas a partir de sustratos no fermentados.

La presente invención se refiere a una cerveza baja en alcohol o sin alcohol con un contenido en alcohol de no más del 1,2% (vol/vol) que tiene un contenido en acetato de isoamilo de al menos 0,5 ppm (mg/l) que comprende *Pichia kluyveri* como la única especie de cepa de levadura añadida.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de una cepa de levadura *Pichia kluyveri* en ausencia de cepas de levadura de los géneros *Saccharomyces* y *Brettanomyces* para preparar una cerveza baja en alcohol o sin alcohol con un contenido en alcohol de no más del 1,2% (vol/vol) que tiene un contenido en acetato de isoamilo de al menos 0,5 ppm (mg/l).

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra un proceso de producción de cerveza optimizado para cerveza de *Pichia kluyveri*. Comparación del proceso de producción de cerveza estándar (izquierda) frente a *Pichia kluyveri* (derecha). Las etapas que son diferentes del proceso de producción de cerveza estándar están resaltadas.

La figura 2 ilustra la comparación del perfil de sabor de 5 cervezas sin alcohol diferentes: 3 horses, Hollandia, Bavaria (todas con el 0% de alcohol) y las cervezas producidas con la cepa A (0,1% (vol/vol) de alcohol) y la cepa B (0,2% (vol/vol) de alcohol) de alcohol de *Pichia kluyveri*. Se usó la cerveza pilsner Carlsberg con el 4,6% (vol/vol) de alcohol como una cerveza de tipo pilsner de referencia y también se muestran otras dos cervezas de tipo pilsner: Stella (5,2% (vol/vol) de alcohol) y Heineken (5,0% (vol/vol) de alcohol). Se midieron 5 compuestos de sabor diferentes con GC de espacio de cabeza-FID: acetato de isoamilo, alcohol isoamílico, butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo. Las concentraciones de los compuestos de sabor en la cerveza de tipo pilsner Carlsberg se usaron como referencia y se escalaron para ser 1. Las concentraciones de sabor en todas las cervezas se pusieron en la misma escala con el fin de poder comparar los valores.

La figura 3 ilustra la comparación del perfil de sabor de 4 cervezas diferentes: cerveza sin alcohol con cepa A (0,1% (vol/vol) de alcohol) de *Pichia kluyveri*, cerveza baja en alcohol con cepa A (0,7% (vol/vol) de alcohol) de *Pichia kluyveri*, cerveza pilsner Carlsberg (4,6% (vol/vol) de alcohol) que se usó como cerveza de tipo pilsner de referencia (control) y cerveza de malta (1,8% (vol/vol) de alcohol). Se midieron 5 compuestos de sabor diferentes con GC de espacio de cabeza-FID: acetato de isoamilo, alcohol isoamílico, butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo. Las concentraciones de los compuestos de sabor en la cerveza de tipo pilsner Carlsberg se usaron como referencia y se

escalaron para ser 1. Las concentraciones de sabor en las 3 cervezas se pusieron en la misma escala con el fin de poder comparar los valores.

5 La figura 4 ilustra las concentraciones de dicetilo en ensayos de cerveza con la cepa A de *Pichia kluyveri* y levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae*.

La figura 5 representa el crecimiento celular de levadura durante la fermentación.

10 La figura 6 muestra las concentraciones de acetato de isoamilo, decanoato de etilo y acetato de feniletilo en todos los productos de fermentación con *Saccharomyces ludwigii* y *Pichia kluyveri*, así como en el mosto básico (con y sin lúpulo).

15 La figura 7 ilustra las concentraciones de acetato de isobutilo y acetato de butilo en todos los productos de fermentación con *Saccharomyces ludwigii* y *Pichia kluyveri*, así como en el mosto básico (con y sin lúpulo).

La figura 8 muestra las concentraciones de isobutanol, 1-butanol y alcohol isoamílico en todos los productos de fermentación con *Saccharomyces ludwigii* y *Pichia kluyveri*, así como en el mosto básico (con y sin lúpulo).

20 La figura 9 muestra las concentraciones de ácido hexanoico, octanoico y decanoico en todos los productos de fermentación con *Saccharomyces ludwigii* y *Pichia kluyveri*, así como en el mosto básico (con y sin lúpulo).

### Descripción detallada de la invención

25 Los inventores de la presente invención han encontrado inesperadamente que cepas de la levadura *Pichia kluyveri* son capaces de aumentar la presencia de compuestos de sabor deseables en bebidas preparadas fermentando mosto con cepas de la levadura *Pichia kluyveri*. En particular, se encontró que concentraciones de compuestos de sabor deseables para cerveza, tal como acetato de isoamilo, alcohol isoamílico y octanoato de etilo, estaban aumentadas.

30 Sorprendentemente, este aumento de compuestos de sabor de cerveza está presente cuando se usan cepas de levadura de la especie *Pichia kluyveri* en ausencia de cepas de levadura de cerveza convencionales tal como cepas de levadura de los géneros *Saccharomyces* y *Brettanomyces*.

35 El proceso de producir cerveza lo conoce bien el experto en la materia y se puede resumir de la siguiente manera (véase, la figura 1); se prepara malta a partir de granos de cereal secos, germinados (principalmente cebada o trigo) y se muelen a una molienda que puede contener adjuntos no malteados. La molienda se macera (mezclada con agua y empapada) para permitir que las enzimas en la malta conviertan el almidón en azúcares. Las partículas de granos y adjuntos se separan del mosto líquido en un proceso llamado clarificación. Las etapas de hacer y macerar la malta se pueden omitir añadiendo agua al extracto de malta. Después de la adición de lúpulo y/u otros ingredientes tal como hierbas y azúcares, el mosto se hierve (también se puede añadir el lúpulo después de hervir), se enfría y airea. El  
40 mosto se mueve después a un tanque de fermentación y se fermenta por la adición de una levadura de cervecero. La fermentación principal, que dura típicamente de 5 a 10 días, puede ir seguida de una etapa de fermentación secundaria usando una levadura de cervecero. Después de la fermentación la cerveza fresca o cerveza "verde" se acondiciona, opcionalmente se filtra y carbonata. La cerveza se carga en botellas y opcionalmente se pasteuriza.

45 Se puede añadir lúpulo al mosto para equilibrar el dulzor de la malta con amargor e impartir 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,  
50 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,  
55 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.

60 Un método para preparar una cerveza baja en alcohol o sin alcohol de la presente invención puede comprender las etapas de:

- a) proporcionar un mosto; y
- b) fermentar el mosto con la menos una cepa de la levadura *Pichia kluyveri* para obtener una cerveza baja en alcohol o sin alcohol.

65

El término “bebida baja en alcohol” en el presente documento se define como un líquido para beber con un contenido en alcohol de más del 0,5% (vol/vol) de alcohol y no más del 1,2% (vol/vol) de alcohol.

5 El término “bebida sin alcohol” en el presente documento se define como un líquido para beber con un contenido en alcohol de no más del 0,5% (vol/vol) de alcohol.

El término “mosto” en el presente documento tiene el significado convencional en la técnica y se refiere al líquido azucarado extraído del proceso de maceración de producir cerveza.

10 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, por la adición de enzimas y por otros métodos que conoce el experto en la materia.

15 En una forma de realización preferida el mosto tiene una concentración de glucosa entre el 0,01% al 3% (p/vol), tal como entre el 0,5% al 1,0% (p/vol).

Preferiblemente, la fermentación en la etapa b) se lleva a cabo en condiciones estériles (fermentación controlada) y con *Pichia kluyveri* como la única especie de cepa de levadura añadida.

20 El experto en la materia será capaz fácilmente de determinar una concentración de inoculación de la cepa de levadura *Pichia kluyveri* adecuada para la preparación de una cerveza baja en alcohol o sin alcohol según la presente invención.

25 La cepa de levadura *Pichia kluyveri* se puede inocular a una concentración de al menos  $1 \times 10^4$  UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml), tal como al menos  $5 \times 10^4$  UFC/ml, tal como al menos  $1 \times 10^5$  UFC/ml, tal como al menos  $5 \times 10^5$  UFC/ml, tal como al menos  $1 \times 10^6$  UFC/ml, tal como al menos  $5 \times 10^6$  UFC/ml.

El método puede comprender además la etapa a1) añadir al mosto al menos una variedad de lúpulo antes de fermentar el mosto con la al menos una cepa de levadura *Pichia kluyveri*.

30 La fermentación del mosto con la al menos una cepa de levadura *Pichia kluyveri* se puede llevar a cabo 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.

35 La fermentación del mosto con la al menos una cepa de levadura *Pichia kluyveri* se puede llevar a cabo a una temperatura de entre 18°C y 22°C.

El método puede comprender además la etapa c) embotellar y pasteurizar en botella la bebida baja en alcohol o sin alcohol.

40 Preferiblemente, la al menos una cepa de levadura *Pichia kluyveri* es capaz de fermentar glucosa, pero no maltosa o maltotriosa. Esto se puede ensayar haciendo crecer la cepa de levadura en un medio de cultivo con solo maltosa o maltotriosa.

45 En una forma de realización preferida, la al menos una cepa de levadura *Pichia kluyveri* se selecciona del grupo que consiste en la *Pichia kluyveri* PK-KR1 (JT1.28; cepa A), que se depositó el 24 de agosto 2006 en el National Measurement Institute, 541-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, por la Universidad de Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, Nueva Zelanda, con los números de registro V06/022711, y la *Pichia kluyveri* PK-KR2 (JT3.71), que se depositó el 24 de agosto 2006 en el National Measurement Institute, 541-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, por la Universidad de Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, Nueva Zelanda, con los números de registro V06/022712.

50 El término “cerveza” como se usa en el presente documento se refiere al menos a cervezas preparadas de maceraciones preparadas de cereales malteados, así como maceraciones preparadas de cereales sin maltear, y maceraciones preparadas de una mezcla de cereales malteados y sin maltear. El término “cerveza” también se refiere a cervezas preparadas con adjuntos y cervezas con todos los contenidos en alcohol posibles.

El término “cerveza baja en alcohol” en el presente documento se refiere a una cerveza con un contenido en alcohol de más del 0,5% y no más del 1,2% (vol/vol) de alcohol.

60 El término “cerveza sin alcohol” en el presente documento se refiere a una cerveza con un contenido en alcohol de no más del 0,5% (Alc. Vol.).

65 La presente invención se refiere a una cerveza baja en alcohol o sin alcohol. Más específicamente, la presente invención se dirige a una cerveza baja en alcohol o sin alcohol con un contenido en alcohol de no más del 1,2 % de alcohol que 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.

5 La cerveza baja en alcohol o sin alcohol puede tener una concentración de octanoato de etilo de al menos 10 ppb (partes por mil millones; 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.

10 En una forma de realización preferida, la cerveza tiene una concentración de alcohol de más del 0,5% (vol/vol) de alcohol y no más del 1,2% (vol/vol) de alcohol.

15 En otra forma de realización preferida, la cerveza tiene una concentración de alcohol de no más del 0,5% (vol/vol) de alcohol.

20 La presente invención en un aspecto adicional se refiere al uso de una cepa de levadura *Pichia kluyveri* en ausencia de cepas de levadura de los géneros *Saccharomyces* y *Brettanomyces* para preparar una bebida baja en alcohol o sin alcohol con un contenido en alcohol de no más del 1,2% de alcohol y que tiene una concentración de acetato de isoamilo de al menos 0,5 ppm (mg/l).

## Ejemplos

### Ejemplo 1

25 Materiales y métodos

#### *Configuración de la fermentación*

30 Se produjeron tanto cerveza baja en alcohol como sin alcohol con 2 cepas diferentes de *Pichia kluyveri* (cepa A y cepa B). En total se han llevado a cabo dos ensayos:

- 1) Cerveza sin alcohol con la cepa A y la cepa B de *Pichia kluyveri* comparadas entre sí,
- 2) Cerveza baja en alcohol con *Pichia kluyveri*, cepa A.

35 La receta de la producción de cerveza era inicialmente la misma para ambos ensayos, excepto por la adición de lúpulo. La cerveza sin alcohol se produjo en una escala de 1500 litros. Las cervezas bajas en alcohol con *Pichia kluyveri*, cepa A y cepa B, se produjeron en una escala de 1000 litros. La base para todas las cervezas era una mezcla de 4 tipos diferentes de malta: malta pilsner al 20%, malta de trigo al 38%, malta Múnich al 38% y malta Cara 50 al 4%. La concentración de azúcar inicial se midió a 8,3°Plato con un Beer Alcoyzer de Anton Paar.

Todas las cepas de levadura se inocularon a  $5 \times 10^6$  UFC/ml.

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

50 Para la cerveza baja en alcohol, se usó extracto de lúpulo para el amargor y al final del cocinado del mosto, se usaron lúpulos Tettnang y Amarillo como lúpulos de aroma. La fermentación se llevó a cabo a 21°C. La fermentación se llevó a cabo durante tres semanas, y en mitad de la fermentación, se añadieron los lúpulos Tettnang y Amarillo como corolas de lúpulo para lupulación en seco. La temperatura de fermentación se bajó a 4°C en el curso del lupulación en seco.

Después de la fermentación, todas las cervezas se enfriaron a 4°C durante varios días, se filtraron y pasteurizaron. La cerveza después se cargó en botellas.

55 La concentración inicial de glucosa era > 1% en el primer ensayo, pero aproximadamente el 0,5% en los dos últimos ensayos 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.

60 Se da una visión general del proceso de producción de cerveza en la figura 1, donde se compara a un proceso de producción de cerveza normal. Las etapas importantes en el 'nuevo' proceso de producción de cerveza son:

- 1) Regular las condiciones de maceración para optimizar la concentración de glucosa en el mosto
- 2) Asegurar que el lúpulo añadido está estéril, así usar pellas de lúpulo o extractos de lúpulo, no lúpulo seco, ya que este puede producir contaminación en la cerveza final
- 3) Un tiempo de fermentación más largo para optimizar el perfil de sabor de la cerveza
- 4) Pasteurización en botella para evitar el riesgo de contaminación debido al alto nivel de maltosa en la cerveza final.

5 Como las cepas de *Pichia kluyveri* son cepas de fermentación muy lenta, es importante mantener el mosto y la cerveza estériles. Cualquier adición de lúpulo se debe hacer de una manera estéril, lo que significa al menos 30 min antes del final de la cocción del mosto. La lupulación en seco (adición de lúpulo después de la ebullición) no se debe usar para la producción de cervezas bajas en alcohol o sin alcohol, ya que hay un riesgo de contaminar la cerveza. Como queda mucho azúcar en la cerveza final, se debe tener cuidado extraordinario para evitar deterioro.

#### *Ensayo de producción de cerveza de laboratorio*

10 Se llevaron a cabo ensayos de fermentación a escala de laboratorio 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 en azúcar inicial de 10°P (Plato) medido con un Beer Alcolyzer de Anton Paar. Se añadieron pellas de lúpulo Amarillo en un filtro de café cerrado al mosto y esto se hirvió durante 30 min para extraer el sabor del lúpulo y añadir amargor a la cerveza. Se añadieron pellas de lúpulo para alcanzar 23 EBU (unidades europeas de amargor). Después de hervir, el filtro de café se retiró del mosto y el mosto se transfirió a botellas de 1L, que se cerraron por cierres hidráulicos. La fermentación se llevó a cabo a 20°C. Después de 5 días de fermentación se tomó una muestra para medida de diacetilo.

#### *Análisis de sabores*

20 Se usa cromatografía de gases de espacio de cabeza acoplada con detección por ionización de llama (HSGC-FID) para la medida de ésteres acetato, ésteres de etilo y alcoholes superiores en las muestras. Las muestras se analizaron con un sistema GC de Perkin Elmer calibrado con un muestreador de espacio de cabeza. El GC está equipado con una columna HP-FFAP (25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, Agilent Technologies, Alemania). El inyector con y sin división se usa y mantiene a 180°C. Las muestras se calientan durante 30 min a 70°C en el autoinyector del espacio de cabeza antes de la inyección (temperatura de la aguja: 110°C). Se usa helio como el gas portador. El programa SOF funciona como sigue: después de empezar a 60°C, la temperatura del horno se sube después de 2 min de 60°C a 230°C a 45°C/min y se mantiene finalmente a 230°C durante 5 min. Durante el programa de GC se mantiene una velocidad de flujo constante (10 ml/min) del gas portador (He). La temperatura del FID se mantiene constante a 220°C. Los resultados se analizan con software Turbochrom.

30 Se usó GC-MS de espacio de cabeza para el análisis de diacetilo. En principio, este método es el mismo que el método usado para detectar los compuestos de sabor, pero una división extra transporta helio adicional, lo que lleva a una velocidad de flujo aumentada y produce una mayor concentración del compuesto en la columna. Diferencias adicionales fueron que el vial presurizado actúa durante 0,03 min como un depósito de gas portador y el programa de GC empieza a una temperatura de 90°C.

#### *Análisis de etanol y densidad*

40 El análisis de etanol y densidad se realizó en un sistema analizador de cerveza alcolyzer de Anton-Paar.

#### Resultados

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

	Butirato de etilo	Acetato de isoamilo	Alcohol isoamílico	Hexanoato de etilo	Octanoato de etilo
<b>Carlsberg</b>	1,10	1,00	34,0	0,04	0,10
<b>Stella</b>	2,14	0,71	50,0	0,11	0,10
<b>Heineken</b>	2,02	4,87	46,0	0,10	0,09
<b>3 horses</b>	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
<b>Hollandia</b>	0,00	0,26	3,2	0,00	0,00
<b>Bavaria</b>	0,00	0,18	2,0	0,00	0,00
<b>Cerveza malta</b>	0,71	0,21	11	0,01	0,01
<b>Pichia A – sin alcohol</b>	0,43	1,96	2,00	0,03	0,12
<b>Pichia B – sin alcohol</b>	0,26	4,94	2,00	0,07	0,13
<b>Pichia A – baja en alcohol</b>	0,27	2,50	1,80	0,02	0,13

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

5 Para producir una cerveza sin alcohol, se llevó a cabo un proceso de producción de cerveza con cepas de levadura *Pichia kluyveri* (véase, Materiales y métodos). Las cepas de *Pichia kluyveri* se usaron para producir una cerveza con un porcentaje de alcohol menor del 0,5%. En términos europeos, esto se considera una cerveza no alcohólica. Este ensayo de producción de cerveza se realizó en una escala de 1000 litros, con la cepa A y la cepa B de *Pichia kluyveri* y una temperatura de fermentación ligeramente inferior de 20°C (véase la figura 1 para los detalles del proceso de producción de cerveza). Toda la glucosa se consumió al final de la fermentación y la cerveza producida con la cepa A tenía un porcentaje de alcohol del 0,1%. La cerveza producida con la cepa B tenía un porcentaje de alcohol del 0,2%. El tiempo de fermentación fue de tres semanas.

15 Las dos cervezas finales se usaron para análisis de sabor. Con el fin de tener una idea del perfil de sabor de cervezas sin alcohol comerciales, se incluyeron 4 cervezas sin alcohol comerciales en el análisis de sabor. Las 3 cervezas fueron 3 horses, Hollandia y Bavaria. Se mencionaban los siguientes ingredientes en las cervezas:

- cerveza no alcohólica clásica 3 horses: agua, cebada, malta, maíz y lúpulo,
- cerveza no alcohólica de malta Hollandia: agua, cebada, malta, maltosa y extracto de lúpulo.
- 20 - cerveza no alcohólica Bavaria: agua mineral pura, cebada, malta, maltosa y lúpulo.

25 Como control, se usó el perfil de sabor de una cerveza pilsner Carlsberg (4,6% (vol/vol) de alcohol). Para comparar las cervezas de los ensayos producidas con *Pichia kluyveri* con otras cervezas pilsner comerciales, se midió el perfil de sabor de otras 2 cervezas: cerveza Stella premium lager (5,2% (vol/vol) de alcohol) y cerveza lager Heineken (5,0% (vol/vol) de alcohol).

30 Como se puede ver de la lista anterior, los ingredientes principales para las cervezas sin alcohol son agua, malta (algunas veces con cebada sin maltear como adjunto) y lúpulo. Estos son los mismos ingredientes principales que en los ensayos con *Pichia kluyveri*.

El resultado del análisis de sabor se representa en la figura 2. Las concentraciones de los 5 compuestos de sabor acetato de isoamilo, alcohol isoamílico, butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo se muestran, cada uno a escala de modo que la concentración del compuesto de sabor respectivo para la cerveza pilsner Carlsberg es 1.

35 La figura 2 claramente muestra que todas las cervezas sin alcohol comerciales tienen una concentración muy baja de los compuestos de sabor de cerveza típicos, cuando se comparan con la cerveza pilsner Carlsberg y se comparan con las otras tres cervezas pilsner. Sin embargo, la cerveza producida con *Pichia kluyveri* tiene niveles similares de compuestos de sabor de cerveza específicos que la cerveza pilsner de referencia, en particular, alcohol isoamílico, hexanoato de etilo y octanoato de etilo. El butirato de etilo estaba presente en una cantidad menor (la mitad de la concentración) y el acetato de isoamilo estaba presente en cantidades mayores (concentración doble o más). Cuando se compara con las otras cervezas pilsner, parece que la concentración de acetato de isoamilo en la cerveza de *Pichia kluyveri* es aún mayor, así como las concentraciones de octanoato de etilo. Sin embargo, las concentraciones de butirato de etilo y hexanoato de etilo eran mayores 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 comparadas con las concentraciones de acetato de isoamilo. Las concentraciones de alcohol isoamílico no se diferencian mucho entre la cerveza de *Pichia kluyveri* y las cervezas pilsner, pero estaba virtualmente ausente en las cervezas sin alcohol. Cuando el perfil global de sabor de la cerveza de *Pichia kluyveri* se compara con las cervezas sin alcohol y pilsner, parece que el perfil de sabor de la cerveza de *Pichia kluyveri* está más cercano a una cerveza con 4,6-5,2% (vol/vol) de alcohol que al perfil de sabor de cualquiera de las cervezas sin alcohol comerciales medidas.

Como todos estos compuestos de sabor tienen un sabor afrutado similar, funcionan en sinergia. La cata de la cerveza de *Pichia kluyveri* reveló que el sabor era muy similar a cerveza y esta cerveza era preferida sobre las cervezas sin alcohol comerciales por un panel de cata que consistía en productores y consumidores de cerveza.

#### *Cerveza baja en alcohol producida con Pichia kluyveri*

Esta cerveza se produjo a partir de 1500 litros de mosto y la temperatura de fermentación fue 21°C (véase la figura 1 para los detalles del proceso de producción). Este ensayo se llevó a cabo con la cepa A de *Pichia kluyveri*. Toda la glucosa se consumió al final de la fermentación y el nivel final de etanol era del 0,7%. El tiempo de fermentación fue tres semanas.

Como se puede ver de la figura 3, tanto la cerveza sin alcohol como la baja en alcohol preparadas con la cepa A de *Pichia kluyveri* tienen un perfil de sabor similar, lo que significa que tanto la cerveza sin alcohol como la baja en alcohol están muy próximas al perfil de sabor de una cerveza pilsner normal. De nuevo los ésteres principales acetato de isoamilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y alcohol isoamílico determinan el perfil de sabor.

#### *Medida del diacetilo producido por Pichia kluyveri*

Para estar seguro de que *Pichia kluyveri* no produce ningún sabor indeseado significativo en la cerveza, la producción del sabor indeseado más importante en la cerveza, diacetilo, se midió en un ensayo de producción de laboratorio con la cepa A de *Pichia kluyveri* solo, comparado con una cerveza con una cepa de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 4).

Está claro de la figura 4 que *Pichia kluyveri* produce mucho menos diacetilo comparado a una cepa de cerveza *Saccharomyces cerevisiae*. Esto es importante ya que el diacetilo con frecuencia se considera como un sabor indeseado en la cerveza. Especialmente, en cervezas sin alcohol y bajas en alcohol donde no hay alcohol presente, el nivel umbral de sabor de diacetilo es probablemente mucho menor que en cervezas de potencia normal.

#### Conclusión

Los resultados del perfil de sabor de cervezas sin alcohol y bajas en alcohol producidas con *Pichia kluyveri* muestran que esta cepa de levadura es idealmente adecuada para la producción de cervezas con menos o sin alcohol. Especialmente, la producción de una alta cantidad de ésteres, que provienen de una concentración de glucosa muy baja es una propiedad especial vista en cepas de *Pichia kluyveri*. Junto con el acetato de isoamilo, otros ésteres están aumentados, lo que da a las cervezas con poco o sin alcohol un perfil de sabor de tipo cerveza.

#### **Ejemplo 2**

Se ha mencionado *Saccharomycodes ludwigii* en Branyik et al. (2002) como el género con más éxito, aparte de *Saccharomyces*, usado en la producción industrial de cerveza sin alcohol.

Para comparar las propiedades de *Pichia kluyveri* con las propiedades de *Saccharomycodes ludwigii* para la preparación de cerveza baja en alcohol se organizó un segundo experimento:

#### Materiales y métodos

##### *Cultivo de levadura*

Los dos cultivos de levadura (cepa A de *Pichia kluyveri* y una cepa de levadura *Saccharomycodes ludwigii*) se prepararon en YPD (glucosa al 2%, peptona al 1% y extracto de levadura al 0,5%), con un pH ajustado de 5,5. El medio YPD se autoclavó a 121°C durante 20 minutos. Los cultivos de levadura se sembraron en placa en placas de YGC (Sigma-Aldrich) y se inoculó una sola colonia en 5 ml de medio YPD. Estos cultivos se hicieron crecer durante la noche en un incubador con agitación a 30°C y se inocularon en 500 ml de YPD. Después de 2 días, se tomó una muestra para recuentos celulares para poder inocular los cultivos de levadura al mismo recuento celular inicial en medio de mosto.

##### *Ensayo de producción de cerveza de laboratorio*

Se llevaron a cabo los ensayos de fermentación a escala de laboratorio en 500 ml de mosto. El mosto se preparó con extracto de malta pilsner (Brewferm). El extracto de malta se mezcló con agua para alcanzar un contenido de azúcar inicial de 7°P (Plato) medido en un Beer Alcoyzer de Anton Paar. En total, se prepararon 10 litros de mosto de esta manera.

5 En la primera organización, el mosto se hirvió durante 60 minutos sin la adición de lúpulo. En la segunda organización, se añadieron pellas de lúpulo 4,5 g de Amarillo, 4,5 g de Cascade y 2 g de Tettnanger al mosto y se hirvió durante 60 minutos para dar amargor. 10 minutos antes del final de la ebullición, se añadieron pellas de lúpulo 1,5 g de Cascade, 1,5 g de Amarillo y 1 g de Tettnanger como lúpulo de aroma. Después de hervir, el mosto se transfirió a botellas de 2 l (1600 ml de mosto por botella), que se cerraron mediante cierres hidráulicos.

Los cultivos de levadura se inocularon a  $1 \times 10^6$  UFC/ml y la fermentación se llevó a cabo a 20°C. Después de 5 días de fermentación, se tomó una muestra para análisis de sabor.

15 *Análisis de etanol*

Se midió el etanol con el kit de Bioanálisis Enzimático de Etanol de Boehringer Mannheim.

20 *Análisis de sabor*

El análisis de sabor se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (Zaragoza, España). Los compuestos de aroma minoritarios se expresan en µg/l (ppb) y se miden con extracción en fase sólida y cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas, mientras que los compuestos de aroma principales se expresan en mg/l (ppm) y se miden con cromatografía de gases-detección de ionización de llama después de extraer los compuestos en diclorometano.

Resultados

30 Las fermentaciones a escala de laboratorio se llevaron a cabo en dos tipos de mosto pilsner: mosto sin la adición de lúpulo y el mismo mosto pilsner con la adición de lúpulo amargo y de aroma (Cascade, Amarillo y Tettnanger) (véase, materiales y métodos). Se ensayaron dos cepas de levadura diferentes: *Saccharomyces ludwigii* y *Pichia kluyveri*. Los cultivos de levadura se inocularon a un recuento celular de  $1 \times 10^6$  UFC/ml después de cultivar en medio YPD. En total se llevaron a cabo 4 fermentaciones diferentes:

- 35 1) *Saccharomyces ludwigii* en mosto sin lúpulo (*S. ludwigii* sin lúpulo)
- 2) *Saccharomyces ludwigii* en mosto con lúpulo (*S. ludwigii* con lúpulo)
- 3) *Pichia kluyveri* en mosto sin lúpulo (*P. kluyveri* sin lúpulo)
- 4) *Pichia kluyveri* en mosto con lúpulo (*P. kluyveri* con lúpulo)

40 Todas las fermentaciones se llevaron a cabo durante 5 días a 20°C.

Durante la fermentación, se midieron recuentos de células cada día para seguir el crecimiento de las levaduras (Figura 5).

45 Está claro de la figura 5 que ambas cepas de levadura sobrevivieron en el mosto con y sin lúpulo. *Pichia kluyveri* crece claramente, comparada con *Saccharomyces ludwigii*, que tiene un recuento de células estable durante toda la fermentación.

50 Después de 5 días, se midió la concentración de etanol en todos los productos de fermentación (Tabla 3).

Producto de fermentación	% de etanol (v/v)
<i>S. ludwigii</i> sin lúpulo	0,3
<i>S. ludwigii</i> con lúpulo	0,3
<i>P. kluyveri</i> sin lúpulo	0,1
<i>P. kluyveri</i> con lúpulo	0,1

55 La tabla 3 muestra que tanto *Saccharomyces ludwigii* como *Pichia kluyveri* producen cantidades muy bajas de etanol. *Pichia kluyveri* parece mejor en no producir alcohol, ya que esta cepa crece a mayores recuentos de células, pero produce menos alcohol, comparada con *Saccharomyces ludwigii*.

Los productos de fermentación el día 5 también se analizaron para perfil de sabor (figuras 6, 7, 8 y 9). Los compuestos de sabor más importantes para la cerveza son ésteres y alcoholes superiores.

60 Las figuras 6 y 7 muestran las concentraciones de ésteres en todos los productos de fermentación finales, así como en el mosto básico con y sin lúpulo. Todas las concentraciones de ésteres son las mayores en los productos de

fermentación con *Pichia kluyveri*, tanto con como sin lúpulo. En el caso de acetato de isoamilo, feniletilo, isobutilo y butilo, *Pichia kluyveri* produce cantidades mayores de estos ésteres cuando no se añade lúpulo, comparado con decanoato de etilo. Especialmente los niveles de acetato de isoamilo y acetato de feniletilo son muy altos. El acetato de isoamilo produce un aroma de plátano, mientras que el acetato de feniletilo produce un aroma más floral, a miel.

5 Ambos compuestos ésteres son compuestos deseados en cerveza. Se debe indicar que los resultados representados aquí son concentraciones de ésteres después de 5 días de fermentación, y estas concentraciones disminuirán a lo largo del tiempo en una cerveza final. Es importante tener altas concentraciones de ésteres para empezar, produciendo una cerveza afrutada durante un periodo de tiempo más largo, ya que estos compuestos ésteres se hidrolizan a lo largo del tiempo en la cerveza final.

10 Las concentraciones de alcoholes de fusel, representadas en la figura 8, son bastante similares entre los productos de fermentación de *Saccharomyces ludwigii* y *Pichia kluyveri*. Solo las concentraciones de alcohol isoamílico son mayores en los productos de fermentación con *Saccharomyces ludwigii*, probablemente porque este compuesto no se convierte a acetato de isoamilo, como es el caso en los productos de fermentación de *Pichia kluyveri*.

15 En la figura 9, se representan tres ácidos, que son compuestos de sabor negativos en la cerveza. Especialmente el ácido decanoico da un sabor rancio, a queso a la cerveza y por tanto es indeseado. Está muy claro que especialmente *Saccharomyces ludwigii* produce altas cantidades de estos ácidos, lo que la hace menos adecuada para la producción de cerveza.

### 20 Conclusión

25 El ensayo de producción de cerveza de laboratorio con las dos cepas de levadura diferentes no *Saccharomyces* indica claramente que *Pichia kluyveri* es más adecuada para la producción de cerveza sin alcohol, comparada con *Saccharomyces ludwigii*. *Pichia kluyveri* produce menos alcohol, más compuestos ésteres deseados y menos ácidos indeseados, comparada con *Saccharomyces ludwigii*.

### Depósitos

30 Las cepas de *Pichia kluyveri* PK-KR1 (JT1.28 o cepa A) y PK-KR2 (JT3.71) se depositaron el 24 de agosto 2006 en el National Measurement Institute, 51-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, por la Universidad de Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, Nueva Zelanda, y se les dio los números de registro V06/022711 y V06/022712 como se describe en el documento WO 2009/110807.

### 35 Referencias

Documento DD 288619

Documento WO 2009/110807

40 Boulton, C.M. y 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.

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

50 Montanari, L., Marconi, O., Mayer, H., Fantozzi, P., 2009. Production of alcohol-free beer. En: 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.

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

60 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.

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.

## REIVINDICACIONES

1. Una cerveza baja en alcohol o sin alcohol con un contenido en alcohol de no más del 1,2% (vol/vol) que tiene un contenido en acetato de isoamilo de al menos 0,5 ppm (mg/l) que comprende *Pichia kluyveri* como la única especie de cepa de levadura añadida.
2. Una cerveza baja en alcohol o sin alcohol según la reivindicación 1 con un contenido en alcohol de no más del 0,5%.
3. Una cerveza baja en alcohol o sin alcohol según la reivindicación 1 o 2 en donde la cepa de *Pichia kluyveri* se selecciona del grupo que consiste en la cepa de *Pichia kluyveri* PK-KR1 (JT1.28 o cepa A) que se depositó el 24 de agosto de 2006 en el National Measurement Institute, 541-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, por la Universidad de Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, Nueva Zelanda, con los números de registro V06/022711, y la *Pichia kluyveri* PK-KR2 (JT3.71) que se depositó el 24 de agosto de 2006 en el National Measurement Institute, 541-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, por la Universidad de Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, Nueva Zelanda, con los números de registro V06/022712.
4. Una cerveza baja en alcohol o sin alcohol lupulada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una cerveza baja en alcohol o sin alcohol lupulada según la reivindicación 4 en donde el lúpulo es 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 o Sorachi Ace.
6. Uso de una cepa de levadura *Pichia kluyveri* en ausencia de cepas de levadura de los géneros *Saccharomyces* y *Brettanomyces* para preparar una cerveza baja en alcohol o sin alcohol con un contenido en alcohol de no más del 1,2% (vol/vol) que tiene un contenido en acetato de isoamilo de al menos 0,5 ppm (mg/l).
7. El uso según la reivindicación 6 para preparar una cerveza baja en alcohol o sin alcohol con un contenido en alcohol de no más del 0,5%.
8. El uso según la reivindicación 6 o 7, en donde la al menos una cepa de *Pichia kluyveri* se selecciona del grupo que consiste en la cepa de *Pichia kluyveri* PK-KR1 (JT1.28 o cepa A) que se depositó el 24 de agosto de 2006 en el National Measurement Institute, 541-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, por la Universidad de Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, Nueva Zelanda, con los números de registro V06/022711, y la *Pichia kluyveri* PK-KR2 (JT3.71) que se depositó el 24 de agosto de 2006 en el National Measurement Institute, 541-65 Clarke Street, South Melbourne, Victoria 3205, Australia, por la Universidad de Auckland, School of Biological Sciences, Auckland 1142, Nueva Zelanda, con los números de registro V06/022712.
9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en donde se añade lúpulo.
10. El uso según la reivindicación 9 en donde el lúpulo es 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 o Sorachi Ace.

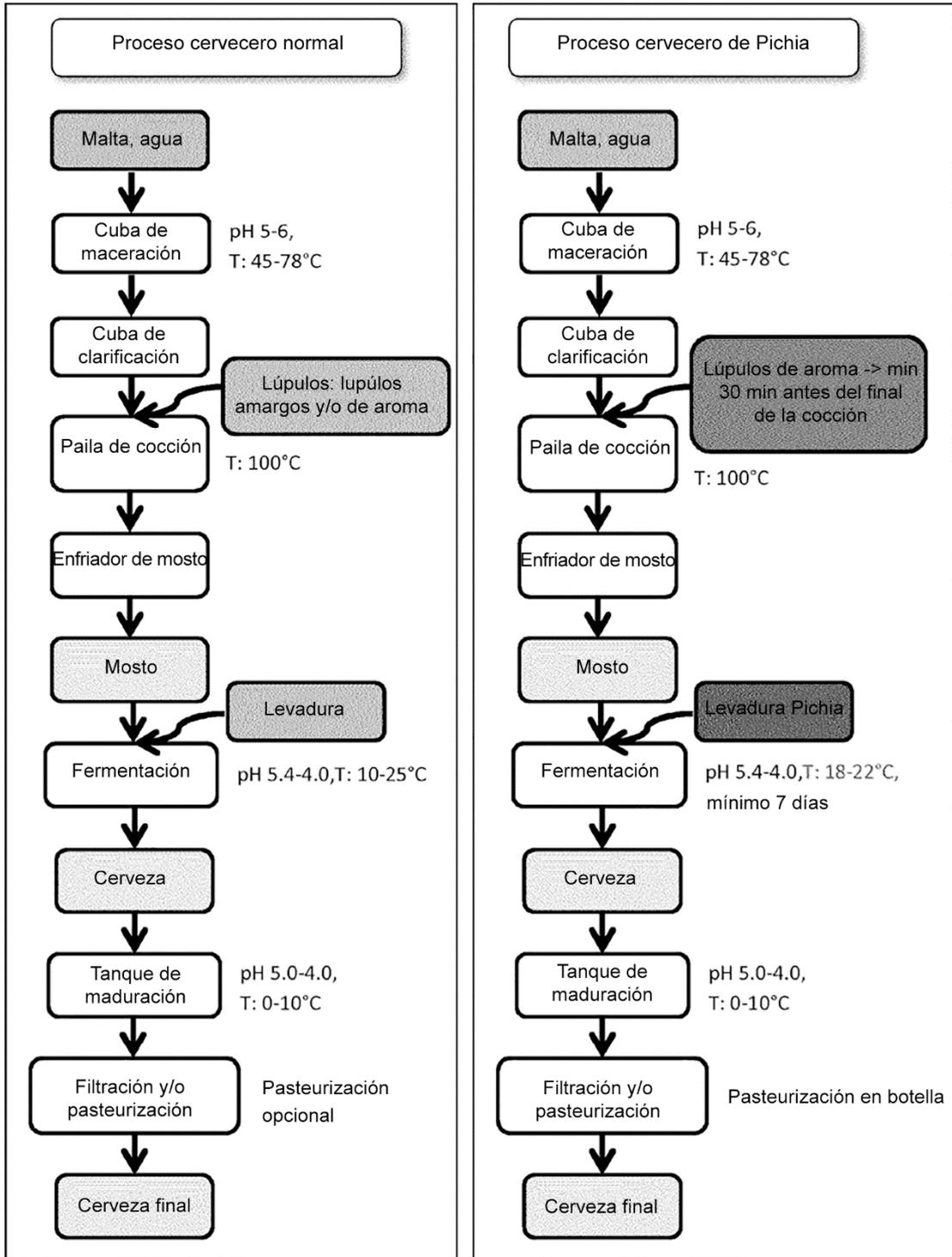


Figura 1

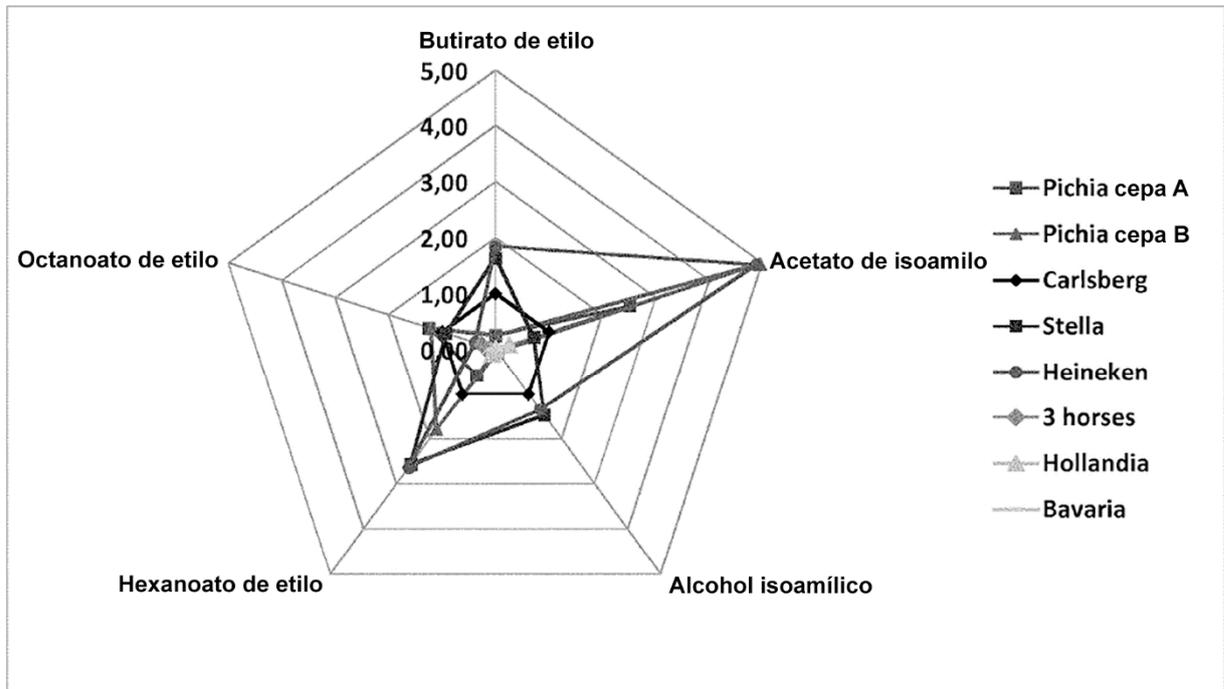


Figura 2

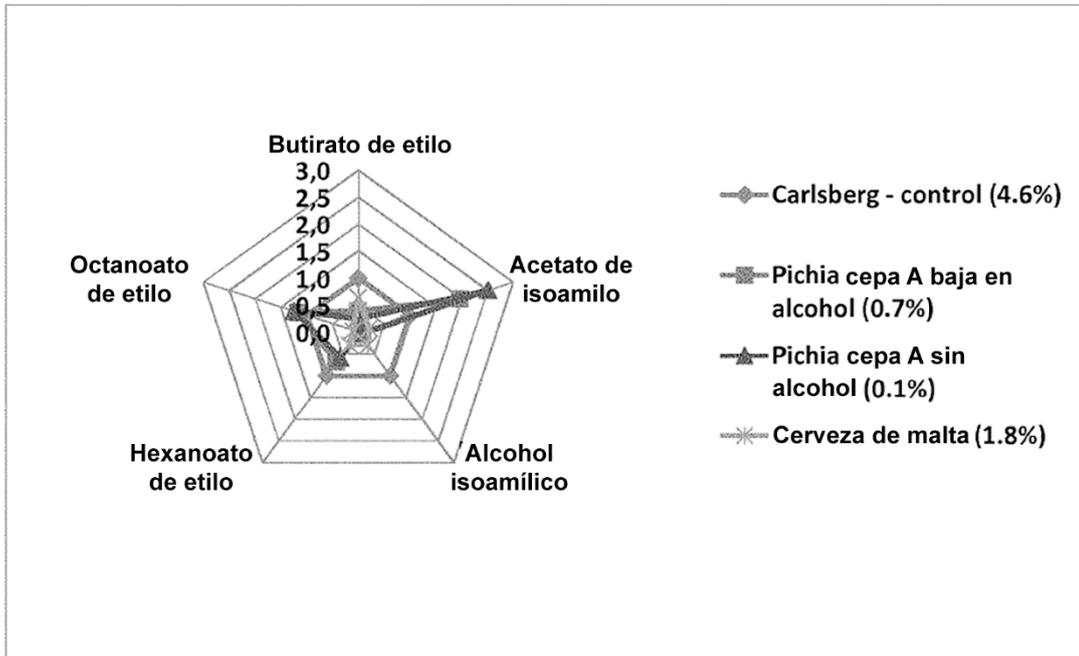


Figura 3

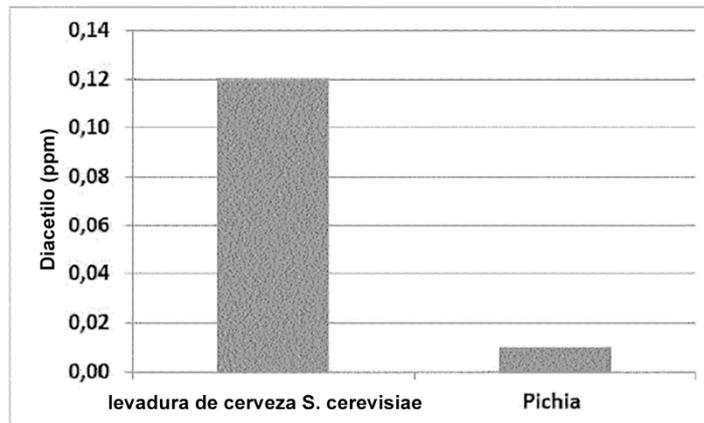


Figura 4

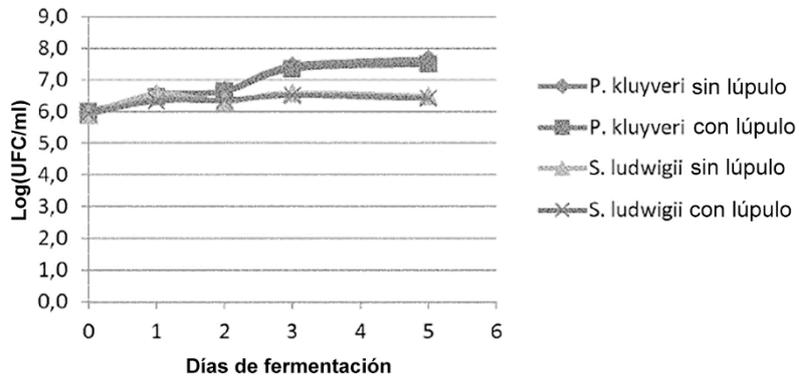


Figura 5

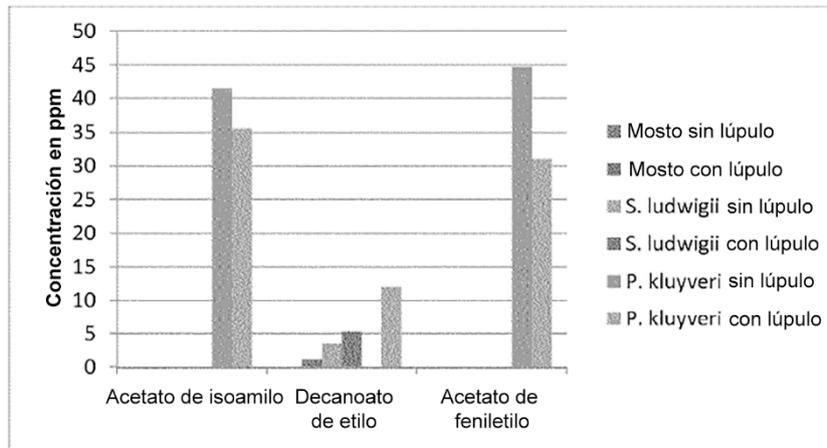


Figura 6

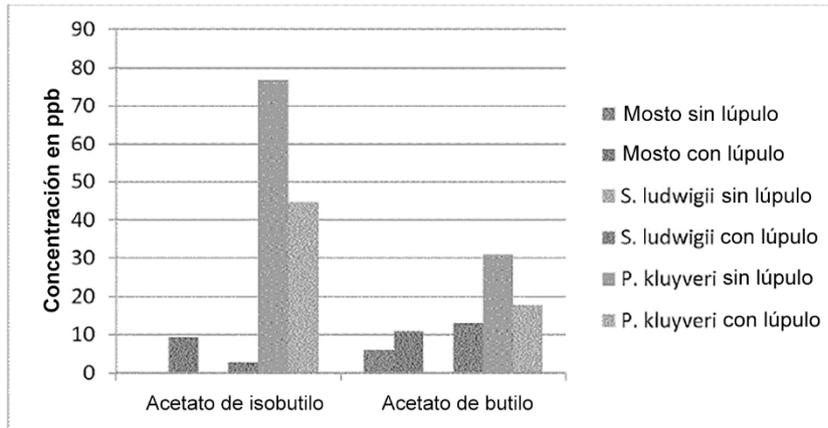


Figura 7

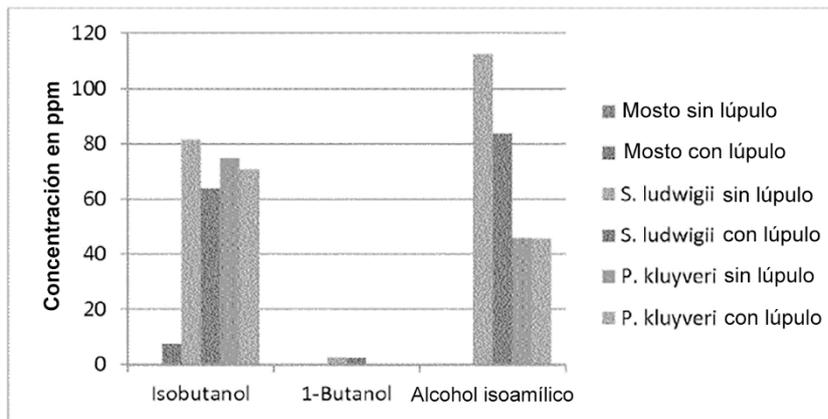


Figura 8

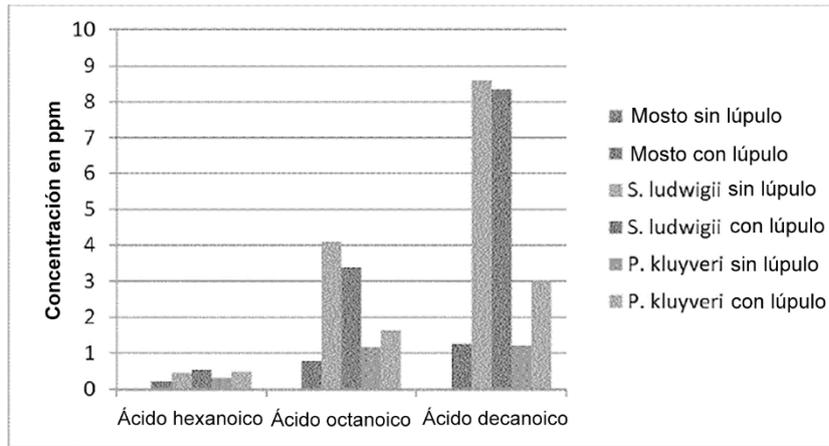


Figura 9