

CEPAS PROGENIE DE LEVADURAS DE BAJO DIACETILO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el campo de la producción de cerveza, y en particular con el campo de la producción de cerveza ale. Más específicamente, la invención proporciona cepas progenie de levaduras de bajo diacetilo, que son particularmente útiles para fermentación rápida y eficiente durante la producción de cerveza, en particular en la producción de cervezas ale.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las cervezas ale están a menudo caracterizadas por perfiles de sabor frutado con un sabor más dulce y un cuerpo más completo. El diacetilo contribuye al perfil de sabor de muchos productos fermentados. Sin embargo, su sabor típicamente mantecoso es considerado como un mal sabor en muchos tipos de cerveza, y la eliminación de este compuesto tiene un principal impacto en el insumo de tiempo y energía en las cervecías.

Una cerveza ale se prepara usualmente mediante fermentación de mosto - un líquido rico en hidratos de carbono- con una levadura ale. La levadura ale en general difiere de la levadura lager de varias maneras. La levadura ale pertenece generalmente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Frecuentemente, la levadura ale también se refiere como "levadura de fermentación superior" porque permanece en suspensión durante la fermentación. El asentamiento, o floculación de la levadura también puede afectar el tiempo de procesamiento, ya que la levadura necesita asentarse suficientemente para cosecharla para la siguiente ronda de elaboración de cerveza. Para levaduras ale que no son muy floculantes (se asientan lentamente en la parte superior) esto requerirá enfriamiento y en consecuencia da por resultado tiempo de procesamiento adicional. Adicionalmente, las cepas de levadura ale en general se utilizan mejor a temperaturas en el rango de 12 - 24°C. En contraste con la levadura lager, que pertenece generalmente a la especie *Saccharomyces pastorianus*, la levadura ale no es capaz de utilizar melibiosa como la única fuente de carbono y típicamente puede crecer aún a temperaturas de hasta 37°C.

Durante la fermentación, se forma diacetilo mediante oxidación no enzimática de acetolactato secretado por la célula de levadura, sin embargo, durante el período de maduración el diacetilo es captado por la célula de levadura nuevamente y metabolizado. Parte de la gestión de fermentación se encara para asegurar que la cerveza terminada contiene diacetilo por debajo de un umbral establecido. Aunque el problema de reducir el contenido de diacetilo en la cerveza terminada es menos prominente que la cerveza ale comparando con la cerveza lager, en donde la fermentación ocurre a una temperatura más baja, se requiere a menudo un período de descanso de "diacetilo" al final de la fermentación para permitir la recaptación y metabolismo del diacetilo producidos también por la levadura ale. Este descanso es especialmente importante ya que, aunque el metabolismo del diacetilo puede proceder relativamente rápido a las mayores temperaturas de elaboración de cerveza ale comparando con la cerveza lager, el precursor acetolactato también se convertirá espontáneamente en diacetilo durante este período. Si se separa la levadura rápidamente al final de la fermentación, estarán aún presentes en la cerveza final niveles demasiado altos de diacetilo a partir de la conversión espontánea de acetolactato.

El límite inferior de la percepción del sabor de diacetilo en cerveza está considerado generalmente como 50 ppb de diacetilo, y la necesidad de reducir la concentración de diacetilo a este nivel en la cerveza terminada y asegurar que el precursor acetolactato ha sido convertido completamente primero en diacetilo, también agrega convencionalmente tiempo extra necesario para la maduración de la cerveza ale antes de que el proceso de elaboración esté completo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Como se describe más arriba, la fermentación de mosto con cepas de levaduras *Saccharomyces pastorianus* o *Saccharomyces cerevisiae* convencionales a temperaturas entre 12°C y 24°C, da por resultado niveles de diacetilo en el mosto muy por encima del límite de 50 ppb de percepción del sabor.

Por consiguiente, se han requerido previamente días adicionales de maduración por la levadura para asegurar que el precursor acetolactato presente en el mosto haya sido convertido suficientemente en diacetilo y que el nivel de diacetilo haya sido a continuación suficientemente reducido para asegurar que el contenido de diacetilo de la cerveza terminada esté por debajo de un umbral establecido.

De manera interesante, la presente invención proporciona nuevas cepas progenie de levaduras que producen bajos niveles de diacetilo y/o que consumen rápidamente dicho diacetilo durante la fermentación, y por consiguiente la cerveza producida por estas cepas requiere muy poco o ningún tiempo de maduración. En particular, cuando se fermenta mosto con las cepas de levadura de la invención, el nivel de diacetilo total es menor que 50 ppb, es decir por debajo del umbral de percepción del sabor, en cualquier momento durante la fermentación del azúcar. En concordancia, la invención permite al elaborador de cerveza cosechar la cerveza en cualquier punto de tiempo deseable sin la necesidad de preocupaciones sobre el nivel de diacetilo. Así, la invención permite saltar la maduración y cosechar la cerveza inmediatamente después de la fermentación. Adicionalmente, durante la producción de bebidas con bajo alcohol o no alcohólicas, puede requerirse o ser beneficioso detener la fermentación en un punto de tiempo temprano para asegurar bajos niveles de alcohol. La fermentación con las cepas progenie de levaduras de la invención permite detener la fermentación en cualquier momento, porque los niveles de diacetilo serán menores que 50 ppb en cualquier momento. Esto es útil en particular cuando la cepa progenie de levadura es negativa para maltosa o de otro modo no produce altos niveles de alcohol.

En particular, la invención muestra que cuando se generan cepas progenie de levaduras a partir de una primera cepa parental que produce niveles de diacetilo total de menos de 50 ppb durante la fermentación, por ejemplo, M49, la cepa progenie puede heredar esta capacidad. Además, la cepa progenie de levadura puede heredar otros fenotipos útiles de la segunda cepa parental.

En un aspecto, se proporciona una cepa progenie de levadura de una primera cepa de levadura parental y una segunda cepa de levadura parental, en donde

- a. la primera cepa de levadura parental es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*; y
- b. dicha primera cepa parental y dicha cepa progenie de levadura son cada una capaces de producir una solución de ensayo fermentada tras incubación en una solución de ensayo, en donde la solución de ensayo es un extracto de malta y/o cereal, y en donde dicha solución de ensayo fermentada no alcanza un nivel de diacetilo total por encima de 50 ppb, tal como por encima de 40 ppb, o tal como por encima de 30 ppb en cualquier momento durante la fermentación.

En algunos aspectos, se proporciona un método para producir una cepa progenie de levadura, en donde dicho método comprende las etapas de:

- a. Proporcionar esporas de la primera cepa de levadura parental como se describe en la presente,
- b. Cruzar dicha espora con esporas de la segunda cepa de levadura parental como se describe

5 en la presente,

en donde al menos una espora de la primera cepa de levadura parental tiene un tipo de cruzamiento diferente de al menos una espora de la segunda cepa de levadura parental.

En algunos aspectos se proporciona así un método de producción de un extracto acuoso fermentado, en donde dicho método comprende las etapas de:

- 10 i) proporcionar un extracto acuoso de malta y/o cereal;
- ii) proporcionar una cepa progenie de levadura, en donde dicha cepa progenie de levadura es como se describe en la presente; y

fermentar el extracto acuoso proporcionado en la etapa i) con dicha cepa de levadura de la etapa ii), obteniendo de ese modo un extracto acuoso fermentado.

15 En algunos aspectos también se proporciona un extracto acuoso fermentado preparado mediante el método como se describe en la presente.

En algunos aspectos se proporciona un método para producir una bebida, en donde dicho método comprende las etapas de:

- i. preparar un extracto acuoso fermentado como se describe en la presente, y
- 20 ii. procesar adicionalmente dicho extracto acuoso fermentado para formar una bebida.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Detección de propanol por isobutanol para levaduras descritas en la WO 2016/101960 y otras levaduras con potencial para mejoramiento a partir de un banco de levaduras. El eje Y ilustra la proporción de propanol:isobutanol medida en las levaduras indicadas. Los resultados se describen
25 adicionalmente en el Ejemplo 2.

Figura 2: Diacetilo total, propanol y proporción propanol:isobutanol para la levadura M49 y dos levaduras previamente descritas de la WO 2016/101960. Los resultados se describen adicionalmente en el Ejemplo 3.

Figura 3: Tasa de fermentación medida por la disminución de la gravedad con el tiempo para tres levaduras diferentes en un ensayo de 50 L a 15°C. Los resultados se describen adicionalmente en el
30 Ejemplo 14.

Figura 4: Diacetilo total medido a lo largo del tiempo para tres levaduras diferentes en un ensayo de 50 L a 15°C en mosto AFB 9 °Plato. Los resultados se describen adicionalmente en el Ejemplo 14.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 Definiciones

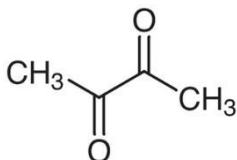
Como se utiliza en la presente, “un/a” puede significar uno/a o más, dependiendo del contexto en el cual se utiliza.

Como se utiliza en la presente, el término “aproximadamente” como se utiliza en la presente significa $\pm 10\%$, preferiblemente $\pm 5\%$, aún más preferiblemente $\pm 2\%$.

El término “cerveza” como se utiliza en la presente se refiere a una bebida preparada mediante fermentación de mosto. Preferiblemente, dicha fermentación es realizada por levaduras.

El término “debrewing” como se utiliza en la presente se refiere a la dilución de una bebida o base de bebida, por ejemplo, cerveza con agua. Agua. El agua puede, por ejemplo, ser agua de red, agua desmineralizada o una mezcla de ambas. El objetivo del debrewing es típicamente el ajuste del contenido de alcohol hasta un nivel más bajo, predeterminado.

El término “diacetilo” como se utiliza en la presente se refiere al compuesto químico de la fórmula:



La concentración de diacetilo en una muestra puede medirse mediante cromatografía gaseosa de acuerdo con el método EBC 9.24.2 de la European Brewing Convention.

El término “diacetilo total” como se utiliza en la presente se refiere a la medición de la concentración de diacetilo mediante cromatografía de gases de acuerdo con el método EBC 9.24.2 de la European Brewing Convention que incluye un período de incubación de las muestras a 60°C durante 90 minutos. El diacetilo total refleja la suma total del precursor acetolactato y diacetilo libre.

A lo largo de la presente descripción, cuando se describe el diacetilo producido por las cepas bacterianas de levadura en la presente, el término “diacetilo” se refiere a “diacetilo total” a menos que se indique de otra manera. Por lo tanto, la concentración de diacetilo de una muestra se refiere así a la concentración de diacetilo total, es decir la suma total del precursor acetolactato y diacetilo libre.

El término “cereal” como se utiliza en la presente se refiere a cualquier planta de la familia de las gramíneas que brinda un grano comestible, tales como trigo, mijo, arroz, cebada, avena, centeno, triticale, sorgo y maíz.

El término “grano” como se utiliza en la presente se refiere a las semillas de un cereal que comprende la carióspside del cereal, también denominada semilla interna. Además, el grano puede comprender la lema y la pálea. En la mayoría de las variedades de cebada, la lema y la pálea se adhieren a la carióspside y son una parte del grano después de la trilla. Sin embargo, también existen variedades de cebada desnudas. En ellas, la carióspside está libre de la lema y la pálea y se trilla libre como en el trigo. Los términos “grano” y “semilla” se utilizan indistintamente en la presente.

Mediante el término “mosto” se indica un extracto líquido de malta y/o granos de cereal y opcionalmente agregados adicionales. El mosto se obtiene en general mediante maceración, seguido opcionalmente por “rociado”, en un proceso de extracción de azúcares residuales y otros compuestos a partir de granos agotados después la maceración con agua caliente. El rociado se lleva a cabo típicamente en una cuba de filtración, un filtro de pasta, u otro aparato que permita la separación del agua extraída de los granos agotados. El mosto obtenido después de la maceración es referido en forma general como “primer mosto”, mientras que el mosto obtenido después del rociado es referido en forma general como el “segundo mosto”. Si no se especifica, el término mosto puede ser primer mosto, segundo mosto o una combinación de ambos. Durante la producción convencional de cerveza, se hierve el mosto junto con

lúpulo. El mosto sin lúpulo, también puede ser referido como “mosto dulce”, mientras que el mosto hervido con lúpulos puede ser referido como “mosto hervido” o simplemente como mosto.

5 El término “extracto acuoso” como se utiliza en la presente se refiere a cualquier extracto acuoso de malta y/o granos de cereal. Así, los ejemplos no limitantes del mismo puede ser mosto con una dada cantidad de azúcares fermentables.

10 El término “extracto acuoso fermentado” como se utiliza en la presente se refiere a cualquier extracto acuoso fermentado con un microorganismo, tal como una cepa de levadura. En algunas modalidades, el “extracto acuoso fermentado” es un extracto acuoso, en donde se ha completado la fermentación de azúcares. Un extracto acuoso fermentado puede por ejemplo ser una malta y/o extracto a base de cereal fermentado.

15 La fermentación de azúcares de un extracto acuoso o una solución de ensayo o un mosto se considera completada en el punto de tiempo durante la fermentación, cuando el nivel de azúcares, medido en °Plato, ya no se reduce significativamente. Preferiblemente, la fermentación de azúcares puede considerarse completada cuando el nivel de azúcares no ha cambiado en más de 0.5 °Plato durante un período de 24 horas, o cuando el nivel de azúcares no ha cambiado en más de 0.25 °Plato durante un período de 12 horas. Alternativamente, el completamiento de la fermentación puede determinarse mediante la determinación del desarrollo de gas, por ej. determinando la presión acumulativa dentro del contenedor. En el punto de tiempo cuando la presión no cambia significativamente, por ej. cuando la presión acumulativa no aumenta en más de 30 PSI durante 24 horas, la fermentación se considera completa.

20 El término “solución de ensayo” como se utiliza en la presente se refiere a cualquier líquido o solución. La solución de ensayo puede contener niveles predeterminados de compuestos específicos. La solución de ensayo es preferiblemente mosto con un contenido predeterminado de azúcares.

25 El término “solución de ensayo fermentada” como se utiliza en la presente se refiere a cualquier solución de ensayo incubada con un microorganismo, tal como una cepa de levadura, en donde se ha completado la fermentación de azúcares.

30 El término “°Plato” como se utiliza en la presente, se refiere a la densidad medida en la escala Plato. La escala Plato es una escala hidrométrica derivada empíricamente para medir la densidad de la cerveza o el mosto en términos de porcentaje de extracto en peso. La escala expresa la densidad como gramos de extracto por 100 g de mosto. Plato puede medirse por ejemplo con un Alcolyzer o dispositivo portátil de Anton Paar.

“Extracto aparente” como se utiliza en la presente se refiere a la densidad de una cerveza o mosto dado medida en °Plato. Como la densidad se determina primariamente por el contenido de azúcares, el extracto aparente es una indicación del contenido de azúcares de la solución o extracto. El extracto aparente de una solución puede medirse por ej. con un DM número de serie de Anton-PARA portátil.

35 El término “alcohol por volumen (APV)” como se utiliza en la presente se refiere a la cantidad de alcohol (etanol) en un volumen dado de una bebida alcohólica (expresada como porcentaje en volumen). Se define como el número de mililitros de etanol puro presentes en 100 mL de solución a 20°C. El APV puede medirse con un Alcolyzer.

El término “GRF” o “grado real de fermentación” como se utiliza en la presente se refiere al grado hasta el cual se ha fermentado el azúcar en el mosto en forma de alcohol en la cerveza, también denominado atenuación. El GRF expresa el porcentaje de extracto que ha fermentado. Un GRF entre 50 y 60% representa cervezas de cuerpo completo con más del 40% de su extracto original mantenido sin fermentar, mientras que un GRF mayor que 80% representa cervezas altamente atenuadas con menos del 20% de su extracto original sin fermentar. La sensación en la boca está determinada en gran medida por el porcentaje de GRF; cuanto mayor el porcentaje de GRF, más liviana y seca la cerveza.

El término “floculación” como se utiliza en la presente se refiere al proceso mediante el cual se hace agrupar partículas finas, tales como células de levadura, juntas en forma de un flóculo. El flóculo puede entonces flotar a la parte superior del líquido (cremoso), asentarse hacia el fondo del líquido (sedimentación), o ser fácilmente filtrado a partir del líquido. Los especialistas en levaduras y elaboradores de cerveza a menudo categorizan el comportamiento de floculación de las levaduras como “alto”, “medio” o “bajo” de acuerdo con el grado de floculación observado para la cepa de levadura durante el proceso de fermentación. Las cepas altamente floculantes pueden producir una cerveza más brillante con menos levaduras suspendidas, haciendo más fácil la filtración. Puede aumentarse la floculación mediante bajas temperaturas, por lo cual para levaduras de baja floculación puede necesitarse una etapa de enfriamiento adicional después de que la fermentación está completada. Las levaduras de alta floculación tienen en consecuencia la posibilidad de un reducido tiempo de procesamiento comparando con levaduras de baja floculación, ya que no se necesita enfriamiento para lograr la cerveza más brillante y de fácil filtración. La floculación puede por ejemplo determinarse mediante recuento del número de células de levadura en solución después de la fermentación, por ej. contando el número de células de levadura en una muestra tomada desde las $\frac{3}{4}$ partes superiores del contenedor que comprende el extracto acuoso fermentado o la solución de ensayo.

El término “fermentar” o “fermentación” como se utiliza en la presente se refiere a incubar un extracto acuoso o una solución de ensayo con un microorganismo, tal como una cepa de levadura.

El término “malta” como se utiliza en la presente se refiere a granos de cereal que han sido malteados. Mediante el término “maltear” debe entenderse un proceso que involucra el remojo y germinación de granos en un proceso que tiene lugar en condiciones de ambiente controlado, opcionalmente seguido por una etapa de secado. Dicha etapa de secado puede preferiblemente ser secado en horno de los granos germinados a elevadas temperaturas. Puede también utilizarse malta verde, que no ha sido sometida a horneado, en particular malta obtenida por el proceso descrito en la WO 2018/001882. La expresión “malta verde” se refiere a granos de cereal germinados, que no han sido sometidos a una etapa de secado en horno. En algunas modalidades, la malta verde es malta verde molida. La expresión “malta verde secada en horno” como se utiliza en la presente, se refiere a granos de cereal germinados, que han sido secados mediante secado en horno. En algunas modalidades, la malta secada en horno es malta secada en horno molida. En general, dichos granos de cereal se han hecho germinar en condiciones ambientales controladas.

El término “fuente de carbono” como se utiliza en la presente se refiere a cualquier molécula orgánica, que puede proporcionar energía a la levadura y proporcionar carbono para biosíntesis celular. En

particular, dicha fuente de carbono puede ser hidratos de carbono y más preferiblemente, la fuente de carbono puede ser monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos y/u oligosacáridos cortos. Las fuentes de carbono que pueden fermentarse mediante levaduras son denominadas a menudo azúcares fermentables, incluyendo, pero no limitadas a, glucosa, fructosa, maltosa, maltotriosa y sacarosa.

5 El término “crecer” o “cultivar” como se utiliza en la presente en relación con las levaduras, se refiere al proceso mediante el cual células de levadura se multiplican. Así, cuando las células de levadura crecen, el número de células de levadura aumenta. Se puede determinar el número de células de levadura mediante cualquier método útil.

10 El término “capaz de utilizar” como se utiliza en la presente se refiere a la capacidad de la levadura de utilizar un compuesto específico como fuente de carbono y/o nitrógeno para la biosíntesis celular.

El término “cepa progenie de levaduras” como se utiliza en la presente, se refiere a la progenie de dos cepas de levadura parentales, por ej. la primera y segunda cepas parentales de levaduras como se describen en la presente. El término se refiere tanto a la progenie directa como a la progenie de generaciones posteriores. La cepa progenie de levaduras puede tener cualquier ploidía. En algunas modalidades, la cepa progenie de levaduras es haploide. En algunas modalidades, la cepa progenie de levaduras es diploide. Las cepas parentales pueden tener también cualquier ploidía. Por ejemplo, cada cepa parental puede ser individualmente haploide o diploide. Si una o ambas cepas parentales son diploides, en general la cepa es esporulada para generar haploides antes de cruzamiento para generar progenie. La progenie diploide de dos cepas de levadura parentales haploides puede ser esporulada, y se generan nuevos diploides a partir del cruzamiento de esporas de tipos de cruzamiento opuestos. Dichas diploides de “generación posterior” y haploides creadas por esporulación de la progenie diploide creada a partir de cruzamiento de las dos cepas de levadura parentales también están cubiertas por el término “cepa progenie de levaduras” como se utiliza en la presente. Las expresiones “levadura híbrida” e “híbrido de levaduras” también pueden utilizarse para referirse a progenie de levaduras o una cepa progenie de levaduras que resulta del cruzamiento de dos cepas de levadura parentales con diferentes genotipos. Las dos cepas de levadura parentales pueden ser de la misma especie, por ej. *Saccharomyces cerevisiae*.

El término “identidad de secuencia” como se utiliza en la presente, describe la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias nucleotídicas, es decir una secuencia candidato (por ej. una secuencia mutante) y una secuencia de referencia (tal como una secuencia de tipo salvaje) en base a su alineamiento por pares. Para los propósitos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior (disponible en https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Los parámetros utilizados son penalidad de brecha abierta de 10, penalidad de extensión de brecha de 0.5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de 30 BLOSUM62). La salida de Needle etiquetada como “identidad más larga” (obtenida utilizando la opción *-nobrief*) se utiliza como la identidad porcentual y se calcula como sigue:

$$(\text{Residuos Idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de Alineamiento} - \text{Número Total de Brechas en el Alineamiento})$$

El algoritmo de Needleman-Wunsch también se utiliza para determinar si un aminoácido dado en una secuencia distinta de la secuencia de referencia (por ej. una variante natural o halotipo de la SEQ ID NO: 1) corresponde a una posición dada de la SEQ ID NO: 1 (secuencia de referencia). Por ejemplo, si la variante natural tiene dos aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal, la posición 70 en la variante natural corresponderá a la posición 68 de la SEQ ID NO: 1.

Para los propósitos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias nucleotídicas se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son penalidad de brecha abierta de 10, penalidad de extensión de brecha de 0.5 y la matriz de sustitución DNAFULL (EMBOSS versión de NCBI NUC4.4). La salida de Needle etiquetada como “identidad más larga” (obtenida utilizando la opción *-nobrief*) se utiliza como la identidad porcentual y se calcula como sigue:

$$\text{(Desoxirribonucleótidos Idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de Alineamiento} - \text{Número Total de Brechas en el Alineamiento})$$

Un homólogo funcional como se utiliza en la presente se refiere a cualquier polipéptido que exhibe al menos alguna identidad de secuencia con un polipéptido de referencia y que ha retenido al menos un aspecto de la funcionalidad original de dicho polipéptido de referencia.

El término “aminoácido en la correspondiente posición X” como se utiliza en la presente para describir aminoácidos de un polipéptido dado (por ej. una variante de la SEQ ID NO: 1) en relación con aminoácidos de un polipéptido de referencia (por ej. de la SEQ ID NO: 1). Después de alineamiento entre dicho polipéptido y el polipéptido de referencia, un aminoácido es correspondiente a X si está en la misma posición que X en dicho alineamiento. Por ejemplo, el aminoácido 498 de la SEQ ID NO: 1 puede corresponder al aminoácido en la posición 455 de una secuencia variante de la SEQ ID NO: 1, si el aminoácido 455 de dicha variante se alinea con el aminoácido en la posición 498 de la SEQ ID NO: 1. Dicho alineamiento se realiza preferiblemente como se describe anteriormente en la presente.

Cepa progenie de levadura

La presente descripción se relaciona con una cepa progenie de levadura, tal como una cepa progenie de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que produce bajos niveles de diacetilo total y/o consume rápidamente diacetilo durante la fermentación cuando se incuba en un extracto de malta y/o cereal. Así, el nivel de diacetilo total nunca llega por encima del umbral de sabor de 50 ppb en ningún momento durante la fermentación con las cepas progenie de levadura de la invención.

Se utilizan diferentes tipos de levaduras para la producción de cerveza, siendo las más notables *Saccharomyces pastorianus* y *Saccharomyces cerevisiae*. La cerveza ale se fermenta típicamente utilizando una levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Así, *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo con la invención puede ser por ejemplo cualquier levadura útil para la producción de cerveza ale. En particular la *Saccharomyces cerevisiae* puede ser una cepa de levadura de fermentación superior.

La cepa progenie de levadura de la presente invención es la progenie de una primera y una segunda cepas de levadura parentales. En algunas modalidades, la cepa progenie de levadura es la

progenie de dos cepas parentales de *S. cerevisiae*. La progenie de dos cepas parentales de *S. cerevisiae* puede en sí misma considerarse una levadura *S. cerevisiae*.

En un aspecto, se proporciona una cepa progenie de levadura de una primera cepa de levadura parental y una segunda cepa de levadura parental, en donde

- 5 a. la primera cepa de levadura parental es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*; y
- b. dicha primera cepa parental y dicha cepa progenie de levadura son capaces cada una de producir una solución de ensayo fermentada tras incubación en una solución de ensayo, en donde la solución de ensayo es un extracto de malta y/o cereal, y en donde dicha solución de ensayo fermentada no alcanza un nivel de diacetilo total superior a 50 ppb, tal como superior a 40 ppb, o tal como superior a
- 10 30 ppb en ningún momento durante la fermentación.

En otras palabras, durante la fermentación de una solución de ensayo con la primera cepa parental o las cepas progenie de levadura de la invención, el nivel de diacetilo total en la solución de ensayo no excede las 50 ppb, tal como por encima de 40 ppb, o tal como por encima de 30 ppb en ningún momento durante la fermentación.

- 15 Así, en algunas modalidades, la cepa progenie de levadura de acuerdo con la invención tiene un fenotipo de “bajo diacetilo”, es decir en donde la cepa progenie de levadura es capaz de producir una solución de ensayo fermentada tras incubación en una solución de ensayo, en donde la solución de ensayo es un extracto de malta y/o cereal, y en donde dicha solución de ensayo fermentada no alcanza un nivel de diacetilo total superior a 50 ppb, tal como superior a 45 ppb, tal como superior a 40 ppb, tal como superior
- 20 a 35 ppb, o tal como superior a 30 ppb en ningún momento durante la fermentación. Este fenotipo puede obtenerse a partir de la primera cepa parental, que preferiblemente tiene también dicho fenotipo de “bajo diacetilo”.

- 25 En algunas modalidades, dicha cepa progenie de levadura porta una mutación en un gen que codifica ILV2, en donde ILV2 es como se detalla en la SEQ ID NO: 1, en donde dicha mutación da por resultado una sustitución de aminoácido en la posición 498 de la SEQ ID NO: 1.

- 30 En algunas modalidades, dicha cepa progenie de levadura porta una mutación en un gen que codifica ILV2, en donde dicha ILV2 es un homólogo funcional de la SEQ ID NO: 1 con al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98%, tal como al menos 99% de identidad de secuencia con la misma, en donde dicha mutación da por resultado una sustitución de aminoácido en la posición de dicho homólogo funcional correspondiente a la posición 498 de la SEQ ID NO: 1.

En algunas modalidades, dicha mutación da por resultado la sustitución de un aminoácido no polar, por ej. glicina (G), por un aminoácido con carga, tal como un aminoácido con carga negativa.

- 35 En algunas modalidades, dicha mutación da por resultado la sustitución de un aminoácido no polar, por ej. glicina (G), por aspartato (D) o glutamato (E).

En algunas modalidades, dicha mutación da por resultado la sustitución de un aminoácido no polar, por ej. glicina (G) por glutamato (E).

El aminoácido no polar puede seleccionarse del grupo que consiste en alanina (A), valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptofano (W) y glicina (G), más

preferiblemente del grupo que consiste en alanina (A), valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), triptofano (W) y glicina (G).

En algunas modalidades, dicha mutación da por resultado la sustitución de una glicina (G) por glutamato (E), tal como una sustitución G498E.

5 Así, en algunas modalidades, la cepa progenie de levadura comprende la ILV2 mutante como se detalla en la SEQ ID NO: 2 o un homólogo funcional de la misma con al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98%, tal como al menos 99% de identidad de secuencia con la misma, con la condición de que dicho homólogo funcional comprende el aminoácido correspondiente a la posición 498 de la SEQ ID NO: 2.

10 En algunas modalidades, dicha cepa progenie de levadura porta una mutación en un gen *ILV2* como se detalla en la SEQ ID NO: 3, en donde dicha mutación es una sustitución de la guanina (G) en la posición 1493 de la SEQ ID NO: 3 por una adenina (A).

En algunas modalidades, dicha cepa progenie de levadura porta una mutación en un gen *ILV2*, en donde dicho gen es un homólogo de la SEQ ID NO: 3 con al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98%, tal como al menos 99% de identidad de secuencia con la misma, en donde dicha mutación es una sustitución de la guanina (G) correspondiente a la guanina en la posición 1493 de la SEQ ID NO: 3 por una adenina (A).

15

Así, en algunas modalidades, la cepa progenie de levadura comprende un gen *ILV2* como se detalla en la SEQ ID NO: 4 o un homólogo de la misma con al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98%, tal como al menos 99% de identidad de secuencia con la misma, con la condición de que dicho homólogo comprende el nucleótido correspondiente a la posición 1493 de la SEQ ID NO: 4.

20

En algunas modalidades se proporciona así una cepa progenie de levadura de una primera cepa de levadura parental y una segunda cepa de levadura parental, en donde

25 a. la primera cepa de levadura parental es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*; y
b. dicha primera cepa parental y dicha cepa progenie de levadura son capaces cada una de producir una solución de ensayo fermentada tras incubación en una solución de ensayo, en donde la solución de ensayo es un extracto de malta y/o cereal, y en donde dicha solución de ensayo fermentada no alcanza un nivel de diacetilo total superior a 50 ppb en ningún momento durante la fermentación.

30 En algunas modalidades se proporciona una cepa progenie de levadura de una primera cepa de levadura parental y una segunda cepa de levadura parental, en donde

a. la primera cepa de levadura parental es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*; y
b. dicha primera cepa parental y dicha cepa progenie de levadura son capaces cada una de producir una solución de ensayo fermentada tras incubación en una solución de ensayo, en donde la solución de ensayo es un extracto de malta y/o cereal, y en donde dicha solución de ensayo fermentada no alcanza un nivel de diacetilo total por encima de 40 ppb en ningún momento durante la fermentación.

35

En algunas modalidades se proporciona una cepa progenie de levadura de una primera cepa de levadura parental y una segunda cepa de levadura parental, en donde

a. la primera cepa de levadura parental es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*; y

b. dicha primera cepa parental y dicha cepa progenie de levadura son capaces cada una de producir una solución de ensayo fermentada tras incubación en una solución de ensayo, en donde la solución de ensayo es un extracto de malta y/o cereal, y en donde dicha solución de ensayo fermentada no alcanza un nivel de diacetilo total por encima de 30 ppb en ningún momento durante la fermentación.

5 En algunas modalidades, dicha fermentación ocurre a una temperatura de como máximo 18°C.

En algunas modalidades, dicha fermentación ocurre a una temperatura de como máximo 16°C.

En algunas modalidades, dicha fermentación ocurre a una temperatura en el rango de 12°C a 18°C.

En algunas modalidades, la cepa progenie de levadura de acuerdo con la invención es capaz de producir una solución de ensayo fermentada, cuando se ensaya en un método que comprende las etapas de:

a) proporcionar una solución de ensayo, en donde la solución de ensayo es un extracto de malta y/o cereales que tiene un extracto aparente de al menos 9 °Plato,

b) incubar dicha cepa progenie de levadura con dicha solución de ensayo a una temperatura de 18°C o menos, preferiblemente entre 12 y 18 °C, más preferiblemente a 16°C, y

15 c) determinar el nivel de diacetilo al menos cada 24 horas desde el inicio de la etapa b) hasta el final de la fermentación,

en donde dicha solución de ensayo contiene como máximo 50 ppb de diacetilo total, tal como máximo 40 ppb de diacetilo total, o como máximo 30 ppb de diacetilo total en cualquier momento durante la fermentación como se mide en la etapa c).

20 En algunas modalidades, dicha fermentación ocurre después de inoculación en el rango de 7,000,000 a 20,000,000 de células de levadura viables por mL de solución de ensayo.

En algunas modalidades, la incubación en la solución de ensayo es llevada a cabo durante un máximo de 6 días. En algunas modalidades, la incubación en la solución de ensayo es llevada a cabo durante un máximo de 5 días. En algunas modalidades, la incubación en la solución de ensayo es llevada a cabo durante un máximo de 4 días. En algunas modalidades, la incubación en la solución de ensayo es llevada a cabo durante un máximo de 3 días. En algunas modalidades, la incubación en la solución de ensayo es llevada a cabo durante un máximo de 2 días.

En algunas modalidades, la incubación en la solución de ensayo es llevada a cabo durante entre 2 a 6 días. En algunas modalidades, la incubación en la solución de ensayo es llevada a cabo durante entre 2 a 4 días.

En algunas modalidades la cepa progenie de levadura es capaz de producir una solución de ensayo fermentada después de incubación de dicha cepa de levadura en una solución de ensayo, en donde la solución de ensayo es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto aparente de al menos 9 °Plato, tal como en el rango de 9 a 12 °Plato, y en donde dicha solución de ensayo fermentada contiene como máximo 50 ppb de diacetilo en cualquier momento durante la incubación con dicha cepa de levadura durante un máximo de 6 días. En particular, dicha solución de ensayo fermentada puede contener como máximo 50 ppb de diacetilo en cualquier momento durante la incubación con dicha cepa de levadura durante un máximo de 5 días. En particular, dicha solución de ensayo fermentada puede contener como

máximo 50 ppb de diacetilo en cualquier momento durante la incubación con dicha cepa de levadura durante como máximo 4 días.

En algunas modalidades, la cepa progenie de levadura es capaz de producir una solución de ensayo fermentada después de incubación de dicha cepa de levadura en una solución de ensayo, en donde la solución de ensayo es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto aparente de al menos 9 °Plato, tal como en el rango de 9 a 12 °Plato, y en donde dicha solución de ensayo contiene como máximo 50 ppb de diacetilo en cualquier momento durante la incubación en dicha solución de ensayo durante un máximo de 5 días a una temperatura de como máximo 18°C. En particular, dicha solución de ensayo fermentada puede contener como máximo 50 ppb de diacetilo en cualquier momento durante la incubación con dicha cepa de levadura durante un máximo de 4 días a una temperatura de como máximo 18°C.

La cepa progenie de levadura de la invención puede contener fenotipos ventajosos adicionales además del fenotipo de bajo diacetilo. Por ejemplo, dichos fenotipos ventajosos adicionales pueden ser heredados de la segunda cepa parental. Así, la segunda cepa parental puede seleccionarse de acuerdo con cuáles fenotipos se desean.

En algunas modalidades, la cepa de levadura tiene alta floculación. La floculación puede determinarse por ejemplo como células en suspensión después de la fermentación. “Células en suspensión” se determina en general mediante recuento de las células de levadura en una muestra tomada de las $\frac{3}{4}$ partes superiores, por ejemplo, de las $\frac{2}{3}$ partes superiores, tal como la mitad superior del contenedor que comprende la solución de ensayo fermentada. Si la fermentación es llevada a cabo en un tanque cilíndrico cónico, dicha muestra se toma preferiblemente por encima del cono. Un número bajo de células en solución después de la fermentación es indicativo de alta floculación.

La cepa progenie de levadura de acuerdo con la presente invención puede ser útil para la producción de bebidas de bajo alcohol o no alcohólicas. En dichos casos la segunda cepa parental puede ser una cepa de levadura que produce un bajo nivel de alcohol o ningún alcohol.

Así, en algunas modalidades, la solución de ensayo fermentada tiene un contenido de alcohol de como máximo 1.0% APV. En algunas modalidades, la solución de ensayo fermentada tiene un contenido de alcohol de como máximo 0.9% APV. En algunas modalidades, la solución de ensayo fermentada tiene un contenido de alcohol de como máximo 0.8% APV. En algunas modalidades, la solución de ensayo fermentada tiene un contenido de alcohol de como máximo 0.7% APV. En algunas modalidades, la solución de ensayo fermentada tiene un contenido de alcohol de como máximo 0.6% APV.

En algunas modalidades, la cepa progenie de levadura no es capaz de crecer en maltosa como única fuente de carbono o crece significativamente más lento en maltosa como única fuente de carbono comparando con otras levaduras, preferiblemente comparando con la levadura Weiherstephan 34/70 y/o Safale US5, ambas de las cuales están comercialmente disponibles. “Significativamente más lento” en ese contexto es preferiblemente que la segunda cepa parental tiene un tiempo de duplicación al menos dos veces, tal como al menos 3 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo, al menos 10 veces mayores que M49. Así, en algunas modalidades, la cepa progenie de levadura es intolerante a la maltosa. En algunas modalidades, la cepa progenie de levadura no es capaz de convertir completamente maltosa en etanol.

En algunas modalidades, la cepa progenie de levadura no es capaz de crecer en maltotriosa como única fuente de carbono. Así, en algunas modalidades, la cepa progenie de levadura es intolerante a la maltotriosa. En algunas modalidades, la cepa progenie de levadura no es capaz de convertir completamente maltotriosa en etanol.

5 En algunas modalidades, la cepa progenie de levadura no es capaz de convertir más de 25% de ácido p-cumárico en 4-etilfenol cuando se incubaba en una solución acuosa que comprende ácido p-cumárico.

En modalidades preferidas, la cepa de levadura, tal como la progenie, primera o segunda cepa de levadura parental, como se describe en la presente es un organismo no OGM. Así, en modalidades preferidas, dicha cepa de levadura, tal como dicha progenie, primera o segunda cepa de levadura parental,
10 no ha sufrido una etapa de ingeniería genética.

Cepas de levadura parentales

La cepa progenie de levadura de la presente invención es la progenie de una primera y una segunda cepa de levadura parental.

La primera cepa de levadura parental puede ser de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Dicha primera cepa de levadura parental produce un nivel sorprendentemente bajo de diacetilo y/o consume rápidamente diacetilo durante la fermentación cuando se incubaba en un extracto de malta y/o cereal.

En algunas modalidades, la primera cepa de levadura parental de acuerdo con la invención es capaz de producir una solución de ensayo fermentada, cuando se ensaya en un método que comprende
20 las etapas de:

a) proporcionar una solución de ensayo, en donde la solución de ensayo es un extracto de malta y/o cereales que tiene un extracto aparente de al menos 9 °Plato,

b) incubar dicha cepa progenie de levadura con dicha solución de ensayo a una temperatura de 18°C o menos, preferiblemente entre 12 y 18°C, más preferiblemente a 16°C, y

25 c) determinar el nivel de diacetilo al menos cada 24 horas desde el inicio de la etapa b) hasta el final de la fermentación,

en donde dicha solución de ensayo contiene como máximo 50 ppb de diacetilo total, tal como a lo sumo 40 ppb de diacetilo total, o tal como a lo sumo 30 ppb de diacetilo total en cualquier momento durante la fermentación como se mide en la etapa c).

30 En modalidades preferidas, la primera cepa de levadura parental como se describe en la presente es un organismo no OGM. Así, en modalidades preferidas, dicha primera cepa de levadura parental no ha sufrido una etapa de ingeniería genética.

En algunas modalidades, dicha primera cepa de levadura parental es M49 depositada en la DSMZ bajo el número de acceso DSM 34496. M49 es una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y fue depositada el 12 de enero de 2023 en la Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von
35 Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (de aquí en adelante referida como DSMZ), Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania y recibió el número de acceso DSM 34496.

En algunas modalidades, dicha primera cepa de levadura parental porta una mutación en un gen que codifica ILV2, en donde ILV2 es como se detalla en la SEQ ID NO: 1, en donde dicha mutación da por resultado una sustitución de aminoácido en la posición 498 de la SEQ ID NO: 1.

5 En algunas modalidades, dicha primera cepa de levadura parental porta una mutación en un gen que codifica ILV2, en donde dicha ILV2 es un homólogo funcional de la SEQ ID NO: 1 con al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98%, tal como al menos 99% de identidad de secuencia con la misma, en donde dicha mutación da por resultado una sustitución de aminoácido en la posición de dicho homólogo funcional correspondiente a la posición 498 de la SEQ ID NO: 1.

10 En algunas modalidades, dicha mutación da por resultado la sustitución de un aminoácido no polar, por ej. glicina (G), por un aminoácido con carga, tal como un aminoácido con carga negativa.

En algunas modalidades, dicha mutación da por resultado la sustitución de un aminoácido no polar, por ej. glicina (G), por aspartato (D) o glutamato (E).

15 En algunas modalidades, dicha mutación da por resultado la sustitución de un aminoácido no polar, por ej. glicina (G), por glutamato (E).

El aminoácido no polar puede seleccionarse del grupo que consiste en alanina (A), valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptofano (W) y glicina (G), más preferiblemente del grupo que consiste en alanina (A), valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), triptofano (W) y glicina (G).

20 En algunas modalidades, dicha mutación da por resultado la sustitución de una glicina (G) por glutamato (E), tal como una sustitución G498E.

Así, en algunas modalidades, la primera cepa de levadura parental comprende la ILV2 mutante como se detalla en la SEQ ID NO: 2 o un homólogo funcional de la misma con al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98%, tal como al menos 99% de identidad de secuencia con la misma, con la condición de que dicho homólogo funcional comprende el aminoácido correspondiente a la posición 498 de la SEQ ID NO: 2.

En algunas modalidades, dicha primera cepa de levadura parental porta una mutación en un gen *ILV2* como se detalla en la SEQ ID NO: 3, en donde dicha mutación es una sustitución de la guanina (G) en posición 1493 por una adenina (A) en la SEQ ID NO: 3.

30 En algunas modalidades, dicha primera cepa de levadura parental porta una mutación en un gen *ILV2*, en donde dicho gen es un homólogo de la SEQ ID NO: 3 con al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98%, tal como al menos 99% de identidad de secuencia con la misma, en donde dicha mutación es una sustitución de la guanina (G) correspondiente a la guanina en la posición 1493 de la SEQ ID NO: 3 por una adenina (A).

35 Así, en algunas modalidades, la primera cepa de levadura parental comprende un gen *ILV2* como se detalla en la SEQ ID NO: 4 o un homólogo de la misma con al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98%, tal como al menos 99% de identidad de secuencia con la misma, con la condición de que dicho homólogo comprende el nucleótido correspondiente a la posición 1493 de la SEQ ID NO: 4.

Las cepas progenie de levadura generadas a partir del cruzamiento de la primera y segunda cepas de levadura parentales tienen preferiblemente el fenotipo de bajo diacetilo como se describe en la presente. La segunda cepa de levadura puede tener uno o más fenotipos deseables adicionales que pueden ser combinados de manera útil con el fenotipo de bajo diacetilo como se describe en la presente en una cepa progenie de levadura.

Dicha segunda cepa de levadura parental puede ser cualquier cepa de levadura capaz de cruzamiento con dicha primera cepa de levadura parental. En particular, se prefiere que las esporas de dicha segunda cepa de levadura parental sean capaces de cruzamiento con esporas de dicha primera cepa de levadura parental. En algunas modalidades, las esporas de dicha segunda cepa de levadura parental son haploides. En algunas modalidades, las esporas de dicha primera cepa de levadura parental son haploides. En algunas modalidades, las esporas de dichas primera y segunda cepas de levadura parentales son haploides. Preferiblemente, las esporas de dichas primera y segunda cepas de levadura parentales son de diferentes tipos de cruzamiento.

En algunas modalidades, la segunda cepa de levadura parental es del género *Saccharomyces*. En algunas modalidades, la segunda cepa de levadura parental no es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. En algunas modalidades, la segunda cepa de levadura parental es del género *Saccharomyces*, pero no es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

En los casos en donde se desee una cepa progenie de levadura con la especie de *Saccharomyces cerevisiae*, es preferible que ambas la primera y la segunda cepa de levadura parentales sean de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Así, en modalidades, la segunda cepa de levadura parental es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. En algunas modalidades, la primera y la segunda cepa de levadura parentales son ambas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

En algunas modalidades, la segunda cepa de levadura parental es PPU121 como está depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 34497. PPU121 es una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y fue depositada el 12 de enero 2023 en la Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (referida aquí como DSMZ), Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania y que recibió el número de acceso DSM 34497.

En algunas modalidades, la segunda cepa de levadura parental no es capaz de crecer en maltosa como única fuente de carbono o crece significativamente más lento en maltosa como única fuente de carbono comparando con otras levaduras, preferiblemente comparando con la levadura Weihenstephan 34/70 y/o Safale US5. "Significativamente más lento" en ese contexto es preferiblemente que la segunda cepa parental tiene un tiempo de duplicación de al menos dos veces, tal como al menos 3 veces, tal como al menos 5 veces, por ejemplo, al menos 10 veces mayor que M49. Así, en algunas modalidades, la segunda cepa de levadura parental es intolerante a la maltosa. En algunas modalidades, la segunda cepa de levadura parental no es capaz de convertir completamente maltosa en etanol.

En modalidades preferidas, la segunda cepa de levadura parental como se describe en la presente es un organismo no OGM. Así, en modalidades preferidas, dicha segunda cepa de levadura parental no ha sufrido una etapa de ingeniería genética.

En modalidades preferidas, la primera y la segunda cepa de levadura parentales como se describe en la presente son organismos no OGM. Así, en modalidades preferidas, dichas primera y segunda cepas de levadura parentales no han sufrido una etapa de ingeniería genética.

Solución de ensayo

5 En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto que tiene un extracto aparente de al menos 7 °Plato. En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto que tiene un extracto aparente de al menos 8 °Plato. En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto que tiene un extracto aparente de al menos 9 °Plato. En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto que tiene un extracto aparente de al menos 12 °Plato. En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto que
10 tiene un extracto aparente de al menos 15 °Plato. En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto que tiene un extracto aparente de al menos 15 °Plato. En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto que tiene un extracto aparente en el rango de 5-20 °Plato. En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto que tiene un extracto aparente en el rango de 8-15 °Plato.

En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto que tiene un extracto aparente de
15 aproximadamente 16 °Plato. La solución de ensayo puede en particular ser mosto.

En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende al menos 40 g/kg de maltosa, tal como en el rango de 40 a 60 g/kg de maltosa.

En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende desde 1.0 a 3.5 g de fructosa por L de solución de ensayo, tal como desde 1.5 a 3.0 g de fructosa por L de solución de ensayo, o tal como desde
20 2.0 a 2.5 g de fructosa por L de solución de ensayo. En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende aproximadamente 2.2 g de fructosa por L de solución de ensayo.

En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende desde 5.0 a 8.0 g de glucosa por L de solución de ensayo, tal como desde 5.5 a 7.5 g de glucosa por L de solución de ensayo, o tal como desde
25 6.0 a 7.0 g de glucosa por L de solución de ensayo. En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende aproximadamente 6.5 g de glucosa por L de solución de ensayo.

En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende desde 1.0 a 5.0 g de sacarosa por L de solución de ensayo, tal como desde 1.5 a 4.0 g de sacarosa por L de solución de ensayo, o tal como desde 2.0 a 3.0 g de sacarosa por L de solución de ensayo. En algunas modalidades, la solución de ensayo
comprende aproximadamente 2.5 g de sacarosa por L de solución de ensayo.

30 En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende como máximo 3500 mg/L de aminoácidos.

En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende como máximo 3000 mg/L de aminoácidos.

En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende como máximo 2500 mg/L de
35 aminoácidos.

En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende en el rango de 500 a 2500 mg/L de aminoácidos.

La solución de ensayo puede preferiblemente tener un extracto aparente en el rango de 8 a 10 °Plato, tal como 9 °Plato. La solución de ensayo puede comprender adicionalmente en el rango de 0.10 mg/L a 0.20 mg/L de zinc y el pH puede ajustarse en el rango de 4.0 a 5.0.

Un ejemplo de una solución de ensayo comprende glucosa en el rango de 3-9 g/L, tal como aproximadamente 6.5 g/L, maltosa en el rango de 40-50 g/L, tal como aproximadamente 45 g/L, maltotriosa en el rango de 10-15 g/L, tal como aproximadamente 12 g/L, zinc en el rango de 0.10 mg/L a 0.20 mg/L, tal como aproximadamente 0.15 mg/L, nitrógeno alfa amino libre (NAL) en el rango de 110-250 mg/L, tal como aproximadamente 160 mg/L, y una proporción Valina/NAL de 0.5 a 0.7, tal como aproximadamente 0.6.

La solución de ensayo puede ser un mosto adecuado para elaborar una cerveza libre de alcohol, tal como mosto diluido (*debrewed*). En algunas modalidades, la solución de ensayo es como se describe en el Ejemplo 5.

En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto de glucosa como se describe en el Ejemplo 4. Como se describe en el Ejemplo, puede producirse un mosto de glucosa mediante conversión de maltosa y maltotriosa en glucosa en un mosto estándar mediante tratamiento enzimático, mediante lo cual el mosto alcanza una elevada concentración de glucosa y una correspondiente reducción en la concentración de maltosa y maltotriosa.

En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto de glucosa y comprende al menos 40 g/L de glucosa, tal como al menos 50 g/L de glucosa, tal como al menos 60 g/L de glucosa, tal como al menos 70 g/L de glucosa, tal como al menos 80 g/L de glucosa, tal como al menos 90 g/L de glucosa, tal como al menos 100 g/L de glucosa, o tal como al menos 110 g/L de glucosa. En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto de glucosa y comprende desde 40 a 1000 g/L de glucosa, tal como desde 50 a 500 g/L de glucosa.

En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto de glucosa y comprende como máximo 10 g/L de maltosa, como máximo 8 g/L de maltosa, como máximo 6 g/L de maltosa, como máximo 4 g/L de maltosa. En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto de glucosa y comprende desde 0 a 10 g/L de maltosa, tal como desde 0 a 8 g/L de maltosa, tal como desde 0 a 6 g/L de maltosa, tal como desde 0 a 4 g/L de maltosa.

En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto de glucosa y comprende como máximo 10 g/L de maltotriosa, como máximo 8 g/L de maltotriosa, como máximo 6 g/L de maltotriosa, como máximo 4 g/L de maltotriosa, como máximo 2 g/L de maltotriosa, como máximo 1 g/L de maltotriosa. En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto de glucosa y comprende desde 0 a 10 g/L de maltotriosa, tal como desde 0 a 8 g/L de maltotriosa, tal como desde 0 a 6 g/L de maltotriosa, tal como desde 0 a 4 g/L de maltotriosa, tal como desde 0 a 2 g/L de maltotriosa, tal como desde 0 a 1 g/L de maltotriosa.

En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto de glucosa y comprende desde 0.5 a 8.0 g de fructosa por L de solución de ensayo, tal como desde 1.0 a 5.0 g de fructosa por L de solución de ensayo, o tal como desde 2.0 a 3.5 g de fructosa por L de solución de ensayo. En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende aproximadamente 3 g de fructosa por L de solución de ensayo.

En algunas modalidades, la solución de ensayo es un mosto de glucosa y comprende desde 0.1 a 8.0 g de sacarosa por L de solución de ensayo, tal como desde 0.5 a 6.0 g de sacarosa por L de solución

de ensayo, o tal como desde 1.0 a 5.0 g de sacarosa por L de solución de ensayo. En algunas modalidades, la solución de ensayo comprende aproximadamente 2 g de sacarosa por L de solución de ensayo.

En algunas modalidades la solución de ensayo está preparada a partir de malta pilsner, potencialmente con la adición de adjunto de cebada.

5 Método de producción de una cepa progenie de levadura

En algunos aspectos se proporciona un método de producción de una cepa progenie de levadura, en donde dicho método comprende las etapas de:

a. Proporcionar esporas de una primera cepa de levadura parental, en donde la primera cepa de levadura parental por ejemplo puede ser cualquiera de las primeras cepas de levadura parentales descritas
10 en la sección "Cepas de levadura parentales" en la presente,

b. Cruzar dicha espora con esporas de una segunda cepa de levadura parental, en donde al menos una espora de la primera cepa de levadura parental tiene un tipo de cruzamiento diferente de al menos una espora de la segunda cepa de levadura parental.

La segunda cepa de levadura parental puede ser cualquier cepa de levadura, por ejemplo, una cepa de
15 levadura que tiene una propiedad deseable. En algunas modalidades, la segunda cepa de levadura parental puede ser cualquiera de las cepas descritas en la sección "Cepas de levadura parentales" en la presente.

En algunas modalidades, el método no requiere y/o comprende técnicas de OGM.

Se prefiere que se utilicen para cruzamiento esporas de dicha primera cepa de levadura parental y esporas de la segunda cepa de levadura parental. En algunas modalidades, se utilizan para cruzamiento
20 esporas de dicha primera cepa de levadura parental y esporas de la segunda cepa de levadura parental, en donde la segunda cepa de levadura parental es del género *Saccharomyces*.

Preferiblemente, se cruzan esporas de la primera cepa de levadura parental de un tipo de cruzamiento dado, con esporas de la segunda cepa de levadura parental con el tipo de cruzamiento opuesto. Así, si las esporas de dicha primera cepa de levadura parental son del tipo de cruzamiento α , se prefiere que las esporas
25 de la segunda cepa de levadura parental sean del tipo de cruzamiento α y viceversa.

En particular, el cruzamiento puede involucrar cruzar esporas haploides de dicha primera cepa de levadura parental con esporas de dicha segunda cepa de levadura parental, en donde dichas esporas de dicha segunda cepa de levadura parental tienen el tipo de cruzamiento opuesto de las esporas haploides de la primera cepa de levadura parental.

30 En algunas modalidades ambas de las esporas de dicha primera cepa de levadura parental y las esporas de la segunda cepa de levadura parental son haploides. En dichos casos, la cepa progenie de levadura resultante puede ser una levadura progenie diploide.

Sin embargo, en otras modalidades pueden utilizarse esporas de una ploidía diferente, en cuyo caso la célula de levadura progenie resultante puede ser una célula progenie de levadura poliploide. En algunas
35 modalidades, no se conoce la ploidía de las esporas. Este puede ser por ejemplo el caso, en algunas modalidades, en donde la segunda cepa de levadura parental es *Saccharomyces pastorianus*.

Dichas esporas de dicha primera cepa de levadura parental y la segunda cepa de levadura parental pueden generarse mediante cualquier medio útil, por ejemplo, mediante incubación de dicha levadura en medio que induce la esporulación. La persona experta conoce numerosos medios útiles para esporulación. En este

sentido se hace referencia por ej. a Lundblad y Struhl, 2008, Dunham et al., 2015, Mertens et al., 2017 así como a los Ejemplos 6 y 11 más adelante.

Las esporas pueden aislarse, por ej. con ayuda de un microscopio de disección y las esporas pueden propagarse antes del cruzamiento.

5 El tipo de cruzamiento de las esporas puede determinarse mediante cualquier medio convencional, por ej. utilizando un ensayo halo en un prado de una levadura sensible a una feromona de cruzamiento (ver por ej. párrafo 2.5 de Kempf *et al.*, 2017 Microbiological Research 200:53-63) o como describen Dohlman et al., 1996.

Una vez que las esporas se propagaron, pueden cruzarse entre sí esporas de tipo de cruzamiento opuesto de la primera cepa de levadura parental y la segunda cepa de levadura parental. El cruzamiento puede realizarse mediante cualquier medio convencional. Típicamente, se incuban las esporas con cada una de las 10 otras ya sea en un medio que soporta el crecimiento de levaduras o sobre un medio sólido o semisólido que soporta el crecimiento de levaduras. Dichas esporas se suministran generalmente en cantidades aproximadamente iguales. Las esporas se incuban en conjunto durante un tiempo adecuado, por ej. en el rango de 6 a 24 horas, tal como durante 10 a 14 horas. Se describen métodos adecuados para cruzamiento de células 15 de levadura por ej. en Treco y Winston, 2008 así como en los Ejemplos 6, 11 y 12 más adelante.

Una vez que se identifica una cepa progenie de levadura útil, dicha cepa progenie de levadura puede someterse a cruzamiento adicional. Así, pueden generarse clones de esporas a partir de la cepa progenie de levadura y cruzarse entre sí para generar cepas progenie de levadura adicionales. Dichas cepas progenie de levadura adicionales también se consideran cepas progenie de levadura de la primera y segunda cepa parental 20 en la presente.

En modalidades preferidas las cepas progenie de levadura se preparan como se describe en el Ejemplo 6, Ejemplo 11, o Ejemplo 12 en la presente más adelante, más preferiblemente como se describe en el Ejemplo 6 en la presente más adelante.

En algunas modalidades, el método comprende además una etapa de selección de las cepas progenie 25 de levadura, que han retenido uno o más fenotipos de interés de la primera y/o segunda cepa parental de levadura.

En modalidades preferidas, la cepa progenie de levadura ha retenido el fenotipo de bajo diacetilo de la primera cepa de levadura parental. Otros fenotipos útiles incluyen:

- intolerancia a la maltosa
- 30 • producción aumentada de ciertos ésteres, tal como acetato de isoamilo, acetato de feniletilo, hexanoato de etilo y/o acetato de etilo, comparando con la primera cepa de levadura parental
- ser incapaz de convertir más de 25% de ácido p-cumárico en 4-etilfenol cuando se incubaba en una solución acuosa que comprende ácido p-cumárico
- ser capaz de elevada producción de propanol en mayores niveles que el isobutanol. En particular, 35 se prefiere que una bebida preparada mediante fermentación con la cepa progenie de levadura de la invención tenga una proporción propanol:isobutanol de al menos 6.0, tal como al menos 8.0, tal como al menos 10.0, tal como al menos 12.

Son conocidos para la persona experta en la técnica los métodos para seleccionar y/o determinar si la cepa progenie de levadura ha retenido un fenotipo de interés a partir de una cepa de levadura parental.

Extracto acuoso fermentado en base a malta y/o cereal y métodos de producción del mismo

La invención proporciona cepas progenie de levadura descritas en las secciones anteriores, así como métodos de preparación de extractos acuosos fermentados en base a malta y/o cereal, que utilizan dicha cepa de levadura.

5 En algunos aspectos, se proporciona así un método de producción de un extracto acuoso fermentado, en donde dicho método comprende las etapas de:

i) proporcionar un extracto acuoso de malta y/o cereal;

ii) proporcionar una cepa progenie de levadura, en donde dicha cepa progenie de levadura es como se describe en la presente más arriba; y

10 iii) fermentar el extracto acuoso proporcionado en la etapa i) con dicha cepa de levadura de la etapa ii), obteniendo de ese modo un extracto acuoso fermentado.

El extracto acuoso puede ser cualquier extracto acuoso de malta y/o granos de cereal. Así, un ejemplo no limitante del mismo es mosto. El extracto acuoso puede por ejemplo ser obtenido preparando un extracto de malta mediante maceración y opcionalmente rociado, como se describe en la presente en esta sección a
15 continuación.

Malta es granos de cereal, tal como granos de cebada, que han sido malteados. Mediante el término “maltear” debe entenderse un proceso que involucra el remojo y germinación de granos en un proceso que tiene lugar en condiciones de ambiente controlado, opcionalmente seguido por una etapa de secado. Dicha etapa de secado puede consistir preferiblemente en el secado en horno de los granos germinados a elevadas
20 temperaturas. Puede también utilizarse malta verde, que no ha sido sometida a secado, en particular malta obtenida por el proceso descrito en la WO 2018/001882.

El malteado es importante para la síntesis de numerosas enzimas que provocan la modificación del grano, procesos que principalmente despolimerizan el almidón y las paredes celulares del endosperma muerto para movilizar los nutrientes del grano y activar otras despolimerasas. En el subsiguiente proceso de secado,
25 se generan sabor y color al menos parcialmente debido a reacciones químicas de oscurecimiento (pardo).

El remojo puede realizarse mediante cualquier método convencional conocido para la persona experta. Un ejemplo no limitante involucra el remojo a una temperatura en el rango de 10°C a 25°C con condiciones alternantes secas y húmedas. La germinación puede realizarse mediante cualquier método convencional conocido para la persona experta. Un ejemplo no limitante involucra la germinación a una temperatura en el
30 rango de 10 a 25°C, opcionalmente con temperatura cambiante en el rango de 1 a 4 h. El remojo y la germinación pueden también realizarse en un método combinado, por ej. cómo se describe en la solicitud de patente internacional WO 2018/001882.

El secado en horno puede ser omitido. Si se realiza, el secado en horno puede llevarse a cabo a temperaturas convencionales, tal como al menos 75°C, por ejemplo, en el rango de 80 a 90°C, tal como en el
35 rango de 80 a 85°C. Así, la malta puede por ejemplo producirse mediante cualquiera de los métodos descritos por Briggs et al. (1981) y por Hough et al. (1982). Sin embargo, puede utilizarse también cualquier otro método adecuado para producir malta con la presente invención, tales como métodos para producción de maltas de especialidad, incluyendo, pero no limitados a, métodos de tostado de la malta.

La malta puede ser procesada adicionalmente, por ejemplo, mediante molienda. La molienda puede realizarse en estado seco, es decir la malta se muele mientras está seca o en estado húmedo si se utiliza malta verde.

La malta, por ej. la malta molida puede ser macerada para preparar un extracto acuoso de dicha malta.

- 5 El líquido de partida para preparar la bebida puede ser un extracto acuoso de malta, por ej. un extracto acuoso de malta preparado por maceración.

Así, el método para preparar un extracto acuoso fermentado en base a malta y/o cereal de acuerdo con la invención puede comprender una etapa de producción de un extracto acuoso, tal como mosto, mediante maceración de malta y opcionalmente agregados adicionales. Dicha etapa de maceración puede también
10 comprender opcionalmente rociado, y en concordancia, dicha etapa de maceración puede ser una etapa de maceración que incluye una etapa de rociado o una etapa de maceración que excluye la etapa de rociado.

En general, la producción del extracto acuoso se inicia mediante la molienda de la malta y/o granos. Si se añaden agregados adicionales, estos pueden también ser molidos dependiendo de su naturaleza. Si el agregado es un cereal, puede por ejemplo ser molido, mientras que jarabes, azúcares y lo similar generalmente
15 no serán molidos. La molienda facilitará el acceso de agua a las partículas del grano en la fase de maceración. Durante la maceración, la despolimerización enzimática de los sustratos iniciada durante el malteado puede continuar.

En general, el extracto acuoso se prepara combinando e incubando malta molida y agua, es decir en un proceso de maceración. Durante la maceración, la composición de la malta/líquido puede suplementarse con
20 composiciones agregadas ricas en hidratos de carbono adicionales, por ejemplo, agregados de cebada, maíz, o arroz molidos. Los agregados de cereal no malteados contienen usualmente poca o ninguna enzima activa, lo que hace importante la suplementación con malta o enzimas exógenas para proporcionar las enzimas necesarias para despolimerización de polisacáridos, etc.

Durante la maceración, se incuban malta molida y/o granos molidos -y opcionalmente agregados
25 adicionales, con una fracción líquida, tal como agua. La temperatura de incubación en general es mantenida constante (maceración isotérmica), o es aumentada gradualmente, por ejemplo, aumentada de una manera secuencial. En cualquier caso, se liberan en dicha fracción líquida sustancias solubles de la malta/grano/agregados. Una filtración subsiguiente brinda la separación del extracto acuoso y partículas sólidas residuales; estas últimas también designadas "grano agotado". El extracto acuoso así obtenido puede también
30 ser denominado "primer mosto". Puede agregarse líquido adicional, tal como agua a los granos agotados durante un proceso también denominado rociado. Después del rociado y filtración, puede obtenerse un "segundo mosto". Pueden prepararse mostos adicionales repitiendo el procedimiento. Se describen ejemplos no limitantes de procedimientos adecuados para preparación de mosto en Briggs et al. (1981) y Hough et al. (1982).

35 Como se mencionó anteriormente, el extracto acuoso puede prepararse también mediante maceración solamente de granos no malteados o de una mezcla de granos malteados y no malteados. Los granos no malteados carecen o contienen solamente una cantidad limitada de enzimas beneficiosas para la producción de mosto, tal como enzimas capaces de degradar las paredes celulares o enzimas capaces de despolimerizar almidón en forma de azúcares. Así, en modalidades de la invención en donde hasta el 80%, tal como 90% o tal

como 100% de granos no malteados, tal como granos de cebada, se utilizan para maceración, se prefiere que una o más enzimas de elaboración externas, adecuadas, se agreguen a la maceración. Las enzimas adecuadas pueden ser lipasas, enzimas degradadoras de almidón (por ej. amilasas), glucanasas [preferiblemente (1-4)- y/o (1-3,1-4)- β -glucanasa], y/o xilanasas (tal como arabinoxilanasas), y/o proteasas, o mezclas de enzimas que comprenden una o más de las enzimas mencionadas, por ej. Cereflo, Ultraflo, o Ondea Pro (Novozymes). Sin embargo, la invención también comprende que dicha(s) enzima(s) pueda(n) agregarse incluso si solamente se utiliza malta.

El extracto acuoso puede también prepararse utilizando una mezcla de granos malteados y no malteados, en cuyo caso pueden agregarse una o más enzimas adecuadas durante la preparación. Incluso en modalidades, en donde se utiliza malta también pueden agregarse enzimas. Más específicamente, pueden utilizarse granos junto con malta en cualquier combinación para la maceración - con o sin enzimas de elaboración externas - tal como, pero no limitadas a, las proporciones de grano:malta = aproximadamente 100:0, o aproximadamente 75:25, o aproximadamente 50:50, o aproximadamente 25:75.

El extracto acuoso obtenido después de la maceración puede también ser referido como “mosto dulce”. En métodos convencionales, el mosto dulce se hierve con o sin lúpulo en donde luego puede ser referido como mosto hervido.

El extracto acuoso puede ser calentado o hervido antes de ser sometido a fermentación con la levadura de la invención. En un aspecto de la invención, pueden combinarse un segundo mosto y mostos adicionales, y a continuación someterse a calentamiento o ebullición. El extracto acuoso puede calentarse o hervirse durante cualquier tiempo adecuado, por ej. en el rango de 60 min a 120 min.

El resultado del extracto acuoso fermentado en base a malta y/o cereal depende en gran medida de la cantidad y tipo de azúcares fermentables presentes en el extracto acuoso de malta y/o granos de cereal, así como de las características de la cepa de levadura utilizada durante la fermentación.

En algunas modalidades de la presente invención, dicho extracto acuoso tiene un extracto aparente de al menos 6° Plato, por ejemplo, al menos 9° Plato, tal como al menos 12° Plato, tal como al menos 15° Plato, tal como en el rango de 5-20° Plato, tal como en el rango de 9-15° Plato, tal como en el rango de 6 a 12° Plato. Para la producción de bebidas con bajo alcohol o bebidas sin alcohol puede preferirse que el extracto acuoso tenga un extracto aparente en el rango de 6 a 12° Plato, tal como en el rango de 6 a 9° Plato.

En algunas modalidades, dicho extracto acuoso es fermentado con dicha cepa de levadura durante como máximo 6 días, como máximo durante 5 días, como máximo durante 4 días, como máximo durante 3 días.

En algunas modalidades, dicho extracto acuoso comprende como máximo 3500 mg/L, tal como a lo sumo 3000 mg/L, por ejemplo, como a lo sumo 2500 mg/L de aminoácidos.

Así, el extracto acuoso, por ej. mosto, puede prepararse como se describe anteriormente. El extracto acuoso fermentado en base a malta y/o cereal puede prepararse mediante fermentación de dicho extracto acuoso con dicha cepa progenie de levaduras de acuerdo con la invención.

En algunas modalidades preferidas, dicho extracto acuoso fermentado es una cerveza verde.

En términos generales, los extractos alcohólicos acuosos fermentados - tal como cerveza- pueden fabricarse a partir de granos malteados y/o no malteados. La malta, además del lúpulo y la levadura, contribuye al sabor y color de la bebida, tal como una cerveza. Adicionalmente, la malta funciona como una fuente de

azúcar fermentable y de enzimas. Pueden hallarse descripciones no limitantes de ejemplos de métodos adecuados de malteado y elaboración de cerveza, por ejemplo, en publicaciones de Briggs et al. (1981) y Hough et al. (1982). Están disponibles numerosos métodos, actualizados regularmente, para análisis de los productos de cereal, malta y cerveza, por ejemplo, pero no limitados a, los de la American Association of Cereal Chemists (1995), American Society of Brewing Chemists (1992), European Brewery Convention (1998), y Institute of Brewing (1997). Se reconoce que se emplean muchos procedimientos específicos para una dada cervecería, con las variaciones más significativas relacionadas con las preferencias de consumidores locales. Cualquiera de dichos métodos de producción de cerveza puede utilizarse con la presente invención.

La primera etapa de producción de cerveza a partir de mosto involucra preferiblemente el calentamiento de dicho mosto como se describe anteriormente en la presente, seguido por una fase subsiguiente de enfriamiento del mosto y opcionalmente remolino-reposo.

Los métodos de la invención comprenden una etapa de fermentación de un extracto acuoso de malta y/o granos de cereal con la cepa de levadura de acuerdo con la invención. Dicha fermentación puede ser una fermentación de un extracto acuoso no fermentado o de un extracto acuoso fermentado que aún contiene azúcares fermentables para la levadura. Así, en algunas modalidades, dicha fermentación puede realizarse esencialmente inmediatamente después de completar la maceración o después de calentar el mosto.

La fermentación puede realizarse en tanques de fermentación que contienen las cepas progenie de levadura de acuerdo con la invención, es decir las cepas progenie de levadura que tienen una o más de las características descritas anteriormente en la presente.

Durante el proceso de fermentación de varios días de duración, se desarrollan sustancias de sabor. Si la cepa de levadura no es capaz de convertir compuestos específicos, estos estarán aún presentes después de la etapa iii) de fermentación.

En algunas modalidades, la etapa iii) de fermentación ocurre a cualquiera de las temperaturas especificadas a continuación, en donde el extracto acuoso fue incubado con cualquiera de los números de células de levaduras como se describe a continuación, en donde el extracto acuoso fermentado contiene un nivel máximo de diacetilo como se describe a continuación, y en donde la fermentación está completa después de un máximo de 5 días, tal como un máximo de 4 días, tal como un máximo de 3 días. En particular, la fermentación está completa después de un máximo de 4 días.

La fermentación anteriormente mencionada se realiza preferiblemente a una temperatura de como máximo 18°C, tal como a una temperatura en el rango de 12°C a 18°C. En particular, dicha fermentación puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 16°C.

Dicho nivel máximo de diacetilo es preferiblemente como máximo de 50 ppb de diacetilo, tal como máximo 40 ppb de diacetilo, tal como máximo 30 ppb de diacetilo en cualquier momento durante la fermentación. En particular, dicho nivel de diacetilo en cualquier momento durante la fermentación es como máximo de 50 ppb.

La fermentación anteriormente mencionada se realiza preferiblemente mediante incubación del extracto acuoso con al menos 6 millones de células de levadura viables por mililitro, tal como al menos 10 millones de células de levadura viables por mililitro, tal como al menos 14 millones de células de levadura viables por mililitro, tal como en el rango de 7-8 millones de células de levadura viables por mililitro, por ejemplo en el rango de 14-

16 millones de células de levadura viables por mililitro. En particular, dicha fermentación puede realizarse mediante incubación del extracto acuoso con aproximadamente 15 millones de células de levadura por mililitro.

En algunas modalidades, dicho extracto acuoso fermentado tiene un contenido de alcohol de como máximo 1.0% APV, tal como máximo 0.9% APV, tal como máximo 0.8% APV, tal como máximo 0.7% APV, tal como máximo 0.7% APV, o tal como máximo 0.6% APV.

En algunos aspectos también se proporciona un extracto acuoso fermentado preparado mediante el método como se describe anteriormente en la presente.

Bebida en base a malta y/o cereal y métodos de producción de la misma

El extracto acuoso fermentado en base a malta y/o cereal descrito anteriormente en la presente puede ser procesado adicionalmente para formar una bebida.

En algunos aspectos, se proporciona así un método para producir una bebida, en donde dicho método comprende las etapas de:

- iii. preparar un extracto acuoso fermentado como se describe anteriormente en la presente, y
- iv. procesar adicionalmente dicho extracto acuoso fermentado para formar una bebida.

En algunas modalidades de la presente invención, la bebida en base a malta y/o cereal se diluye con un líquido, tal como agua.

Opcionalmente, puede utilizarse agua para diluir la bebida en base a malta y/o cereal y de ese modo ajustar, por ej. el contenido de etanol. En una modalidad de la presente invención las proporciones de agua:bebida en base a malta y/o cereal puede estar en el rango de 0.1 a 5 partes de agua a 1 parte de bebida en base a malta y/o cereal.

El proceso adicional puede incluir también por ejemplo el enfriamiento y/o filtración de la bebida en base a malta y/o cereal. También pueden agregarse aditivos. Además, puede agregarse CO₂. Finalmente, la bebida en base a malta y/o cereal, tal como una cerveza, puede ser pasteurizada y/o filtrada antes de ser envasada (por ej. embotellada o enlatada).

En algunas modalidades, las etapas de procesamiento comprenden una o más de las siguientes:

- i. Filtración,
- ii. Carbonatación,
- iii. Maduración, o
- iv. Embotellado

Las etapas de procesamiento pueden comprender adicionalmente una o más etapas de reducción del contenido de alcohol del extracto acuoso fermentado antes del embotellado de la cerveza. En algunas modalidades, la etapa de reducción del contenido de alcohol es destilación, métodos basados en membranas para reducción de alcohol, rectificación o dilución (*debrewing*).

La presente invención también proporciona bebidas en base a malta y/o cereal, preparadas mediante los métodos descritos anteriormente en la presente.

En modalidades preferidas, la bebida es una cerveza. En algunas modalidades, dicha cerveza tiene un sabor de tipo lager. En algunas modalidades, dicha cerveza tiene un sabor de tipo ale.

La bebida puede ser una bebida con reducido alcohol, tal como una bebida con bajo contenido de alcohol. En algunas modalidades, la bebida es una bebida sin alcohol. En modalidades preferidas, la bebida con

reducido alcohol es una cerveza con reducido alcohol. En modalidades preferidas, la bebida sin alcohol es una cerveza sin alcohol.

En algunas modalidades, el contenido de alcohol de una bebida sin alcohol es menor que 0.5% vol. En algunas modalidades, el contenido de alcohol de una bebida sin alcohol es 0.05% vol. o menos, tal como 0.049% o menos, por ejemplo 0.0%. En algunas modalidades, el contenido de alcohol de una bebida con bajo alcohol es desde 0.5% vol. a 1.2% vol. En algunas modalidades, el contenido de alcohol de una bebida con bajo alcohol es desde 0.5% vol. a 2.8% vol.

En un aspecto de la presente invención, la bebida en base a malta y/o cereal, producida mediante fermentación del extracto acuoso con dicha cepa progenie de levaduras de acuerdo con la presente invención tiene un sabor agradable.

El sabor de la bebida en base a malta y/o cereal producida mediante la fermentación con las levaduras de acuerdo con la invención puede analizarse, por ejemplo, mediante un panel de especialistas en sabor de cerveza. Preferiblemente, dicho panel está entrenado en degustar y describir sabores de cervezas, con especial foco en aldehídos, sabor a papel, sabor a “viejo”, ésteres, alcoholes superiores, ácidos grasos y componentes sulfurados.

En general, el panel de sabor consistirá de un rango de 3 a 30 miembros, por ejemplo en el rango de 5 a 15 miembros, preferiblemente en el rango de 8 a 12 miembros. El panel de sabor puede evaluar la presencia de diversos sabores, tal como malos sabores de tipo papel, oxidado, envejecido y pan, así como sabores de ésteres, alcoholes superiores, componentes de azufre y cuerpo de la cerveza. El sabor global de la cerveza será calificado generalmente por el panel de sabor en base a varias diferentes características en una escala de 1 a 9, en donde una calificación promedio de más de 5 significa que la cerveza tiene un sabor aceptable.

Ítems

1. Un híbrido de levadura o una cepa progenie de levadura, en donde dicho híbrido o cepa progenie de levadura es la progenie de una primera cepa de levadura parental y una segunda cepa de levadura parental, en donde

a. la primera cepa de levadura parental es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*; y
b. dicha primera cepa parental y dicho híbrido o cepa progenie de levadura son capaces cada una de producir una solución de ensayo fermentada tras incubación en una solución de ensayo, en donde la solución de ensayo es un extracto de malta y/o cereal, y en donde dicha solución de ensayo fermentada no alcanza un nivel de diacetilo total superior a 50 ppb, tal como superior a 40 ppb, o tal como superior a 30 ppb en ningún momento durante la fermentación.

2. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con el ítem 1, en donde dicha fermentación ocurre a una temperatura de como máximo 18°C.

3. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha fermentación ocurre a una temperatura de como máximo 16°C.

4. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 1 a 2, en donde dicha fermentación ocurre a una temperatura en el rango de 12°C a 18°C.

5. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha incubación en dicha solución de ensayo es llevada a cabo durante como máximo 6 días, tal como máximo 5 días, tal como máximo 4 días.

5 6. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 1 a 4, en donde dicha incubación en dicha solución de ensayo es llevada a cabo durante entre 2 a 6 días, o tal como entre 2 a 4 días.

7. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha fermentación ocurre después de inoculación en el rango de 7,000,000 a 20,000,000 de células de levadura viables por mL de solución de ensayo.

10 8. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha solución de ensayo comprende como máximo 3500 mg/L, tal como máximo 3000 mg/L, tal como máximo 2500 mg/L de aminoácidos.

9. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha solución de ensayo comprende al menos 40 g/kg de maltosa.

15 10. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha solución de ensayo tiene un extracto aparente de al menos 9° Plato.

11. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha solución de ensayo tiene un extracto aparente de al menos 12° Plato, tal como al menos 15° Plato.

20 12. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha solución de ensayo es mosto.

13. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha solución de ensayo es mosto que tiene un extracto aparente de aproximadamente 16° Plato.

25 14. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha primera cepa de levadura parental es M49 como está depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 34496.

15. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde la segunda cepa de levadura parental es del género *Saccharomyces*.

30 16. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha segunda cepa de levadura parental es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

17. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha segunda cepa de levadura parental es intolerante a la maltosa, tal como en donde dicha segunda cepa de levadura parental no es capaz de convertir completamente maltosa en etanol.

35 18. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha segunda cepa de levadura parental es intolerante a la maltosa, tal como en donde dicha segunda cepa de levadura parental no es capaz de crecer en maltosa como única fuente de carbono o crece significativamente más lento en maltosa como única fuente de carbono comparando con otras levaduras, preferiblemente comparando con la levadura Weihenstephan 34/70 y/o Safale US5.

19. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha cepa progenie de levadura o híbrido de levadura es intolerante a la maltosa, tal como en donde dicha cepa progenie de levadura o híbrido de levadura no es capaz de convertir completamente maltosa en etanol.

5 20. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha cepa progenie de levadura o híbrido de levadura es intolerante a la maltosa, tal como en donde dicha cepa progenie de levadura o dicha segunda cepa de levadura parental no es capaz de crecer en maltosa como única fuente de carbono o crece significativamente más lento en maltosa como única fuente de carbono comparando con otras levaduras, preferiblemente comparando con la levadura
10 Weihenstephan 34/70 y/o Safale US5.

21. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha cepa progenie de levadura o híbrido de levadura es intolerante a la maltotriosa, tal como en donde dicha cepa progenie de levadura o híbrido de levadura no es capaz de convertir completamente maltotriosa en etanol.

15 22. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha solución de ensayo fermentada tiene un contenido de alcohol de como máximo 1.0% APV, tal como máximo 0.8% APV, o tal como máximo 0.6% APV.

23. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicho híbrido de levadura o cepa progenie de levadura produce como máximo 1.0%
20 APV, tal como máximo 0.8% APV, o tal como máximo 0.6% APV después de incubación en la solución de ensayo.

24. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha segunda cepa de levadura parental es PPU121 como está depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 34497.

25 25. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha cepa progenie de levadura o híbrido de levadura no es capaz de convertir más de 25% de ácido p-cumárico en 4-etilfenol cuando se incuba en una solución acuosa que comprende ácido p-cumárico.

30 26. El híbrido de levadura o cepa progenie de levadura de acuerdo con uno cualquiera de los ítems precedentes, en donde dicha segunda cepa parental y/o dicha cepa progenie de levadura o cepa de levadura híbrida no es capaz de convertir más de 25% de ácido p-cumárico en 4-etilfenol cuando se incuba en una solución acuosa que comprende ácido p-cumárico.

27. Una cepa progenie de levadura de una primera cepa de levadura parental y una segunda cepa de levadura parental, en donde

- 35 a. la primera cepa de levadura parental es la cepa de levadura M49 como está depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 34496; y
- b. la segunda cepa de levadura parental es
- i. PPU121 como está depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 34497; o
- ii. X2180-1A; o

iii. PE-2.

28. Un método de producción de un híbrido de levadura o cepa progenie de levadura, en donde dicho método comprende las etapas de:

a. Proporcionar esporas de la primera cepa de levadura parental, en donde dicha primera cepa de levadura parental es como se define en uno cualquiera de los ítems precedentes,

b. Cruzar dicha espora con esporas de una segunda cepa de levadura parental, en donde al menos una espora de la primera cepa de levadura parental tiene un tipo de cruzamiento diferente de al menos una espora de la segunda cepa de levadura parental.

29. El método de acuerdo con el ítem 28, en donde dicha segunda cepa de levadura parental es como se define en uno cualquiera de los ítems 15 a 27.

30. Un método de producción de un extracto acuoso fermentado, en donde dicho método comprende las etapas de:

i) proporcionar un extracto acuoso de malta y/o cereal;

ii) proporcionar una cepa progenie de levadura o cepa de levadura híbrida de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 1 a 27; y

iii) fermentar el extracto acuoso proporcionado en la etapa i) con dicha cepa de levadura de la etapa ii), obteniendo de ese modo un extracto acuoso fermentado.

31. El método de acuerdo con el ítem 30, en donde el extracto acuoso es mosto.

32. El método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 30 a 31, en donde el extracto acuoso tiene un extracto aparente de como máximo 16° Plato, tal como en el rango de 6 a 16° Plato, por ejemplo en el rango de 8 a 16° Plato, preferiblemente en el rango de 6 a 12° Plato, por ejemplo en el rango de 8 a 10° Plato, tal como aproximadamente 9° Plato.

33. Un extracto acuoso fermentado preparado mediante el método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 30 a 32.

34. Un método para producir una bebida, en donde dicho método comprende las etapas de:

i. preparar un extracto acuoso fermentado de acuerdo con el ítem 30, y

ii. procesar dicho extracto acuoso fermentado para formar una bebida.

35. El método de acuerdo con el ítem 34, en donde las etapas de procesamiento comprenden una o más de las siguientes:

i. Filtración,

ii. Carbonatación,

iii. Maduración, o

iv. Embotellado

36. El método de acuerdo con los ítems 34 a 35, en donde el método comprende además una etapa de reducción del contenido de alcohol del extracto acuoso fermentado.

37. El método de acuerdo con el ítem 36, en donde dicha etapa de reducción del contenido de alcohol es rectificación o dilución (*debrewing*).

38. Una bebida preparada mediante el método de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 34 a 37.

39. La bebida de acuerdo con el ítem 38, en donde dicha bebida es una bebida de reducido alcohol, tal como una bebida con bajo contenido de alcohol.

40. La bebida de acuerdo con el ítem 38, en donde dicha bebida es una bebida sin alcohol.

41. La bebida de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 38 a 40, en donde dicha bebida es una cerveza, tal como una cerveza de reducido alcohol, o tal como una cerveza sin alcohol.

42. La bebida de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 38 a 41, en donde dicha bebida tiene una proporción propanol:isobutanol de al menos 6.0, tal como al menos 8.0, tal como al menos 10.0, tal como al menos 12.

Descripción general de las secuencias

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
1	Secuencia de aminoácidos de S288C ILV2 de tipo salvaje	MIRQSTLKNFAIKRCFQHIAYRNT PAMRSVALAQRFYSSSSRYYSASPLPAS KRPEPAPSFNVDPLEQPAEPSKLAKKLRAEPDMDTSFVGLTGQIFNEMMSR QNVDTVFGYPGGAILPVYDAIHNSDKFNFVLPKHEQGAGHMAEGYARASGKP GVVLVTSGPGATNVVTPMADAFADGIPMVFTGQVPTSAIGTDAFQEADVVG ISRSCTKWNVMVKSVEELPLRINEAFEIATSGRPGPVLVDLPKDVTAAILRN PIPTKTTLPSNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAKKPVLYVGAGILN HADGPRLLKELSDRAQIPVTTTLQGLGSFDQEDPKSLDMLGMHGCATANLAV QNADLIIAVGARFDDRVTGNISKFAPEARARAAAEGRGGIIHFEVSPKNINKV VQTQIAVEGDATTNLGKMMSKI FPKERSEWFAQINKWKKEYPYAYMEETPG SKIKPQTVIKKLSKVANDTGRHVIVTTGVGQHQMWAAQHWTWRNPHTFITSG GLGTMGYGLPAAIGAQVAKPESLVIDIDGDASFNMTLTELSSAVQAGTPVKI LILNNEEQGMVTQWQSLFYEHRYSHTHQLNPDFIKLAEAMGLKGLRVKKQEE LDAKLKEFVSTKGPVLLVEVEVDKKVPVLPMPVAGGSGLDEFINFDPEVERQQT ELRHKRTGGKH
2	Secuencia de aminoácidos de la mutante ILV2 de M49	MIRQSTLKNFAIKRCFQHIAYRNT PAMRSVALAQRFYSSSSRYYSASPLPAS KRPEPAPSFNVDPLEQPAEPSKLAKKLRAEPDMDTSFVGLTGQIFNEMMSR QNVDTVFGYPGGAILPVYDAIHNSDKFNFVLPKHEQGAGHMAEGYARASGKP GVVLVTSGPGATNVVTPMADAFADGIPMVFTGQVPTSAIGTDAFQEADVVG ISRSCTKWNVMVKSVEELPLRINEAFEIATSGRPGPVLVDLPKDVTAAILRN PIPTKTTLPSNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAKKPVLYVGAGILN HADGPRLLKELSDRAQIPVTTTLQGLGSFDQEDPKSLDMLGMHGCATANLAV QNADLIIAVGARFDDRVTGNISKFAPEARARAAAEGRGGIIHFEVSPKNINKV VQTQIAVEGDATTNLGKMMSKI FPKERSEWFAQINKWKKEYPYAYMEETPG SKIKPQTVIKKLSKVANDTGRHVIVTTGVEQHQMWAQHWTWRNPHTFITSG GLGTMGYGLPAAIGAQVAKPESLVIDIDGDASFNMTLTELSSAVQAGTPVKI LILNNEEQGMVTQWQSLFYEHRYSHTHQLNPDFIKLAEAMGLKGLRVKKQEE LDAKLKEFVSTKGPVLLVEVEVDKKVPVLPMPVAGGSGLDEFINFDPEVERQQT ELRHKRTGGKH

5

10

15

20

25

30

35

3

Secuencia
de ADN de
S288C /LV2
de tipo
salvaje

ATGATCAGACAATCTACGCTAAAAAACTTCGCTATTAAGCGTTGCTTTCAAC
ATATAGCATACCGCAACACACCTGCCATGAGATCAGTAGCTCTCGCGCAGCG
CTTTTATAGTTCGTCTTCCCGTTATTACAGTGCGTCTCCATTACCAGCCTCT
AAAAGGCCAGAGCCTGCTCCAAGTTTCAATGTTGATCCATTAGAACAGCCCG
CTGAACCTTCAAAATTGGCTAAGAACTACGCGCTGAGCCTGACATGGATAC
CTCTTTCGTGCGTTTAACTGGTGGTCAAATATTTAACGAAATGATGTCCAGA
CAAAACGTTGATACTGTATTTGGTTATCCAGGTGGTGCTATCCTACCTGTTT
ACGATGCCATTTCATAACAGTGATAAATTCAACTTCGTTCTTCCAAAACACGA
ACAAGGTGCCGGTCACATGGCAGAAGGCTACGCCAGAGCTTCTGGTAAACCA
GGTGTGTCTTGGTTACTTCTGGGCCAGGTGCCACCAATGTCGTTACTCCAA
TGGCAGATGCCTTTGCAGACGGGATTCCAATGGTTGTCTTTACAGGGCAAGT
CCCAACTAGTGCTATCGGTACTGATGCTTTCCAAGAGGCTGACGTCGTTGGT
ATTTCTAGATCTTGTACGAAATGGAATGTCATGGTCAAGTCCGTGGAAGAAT
TGCCATTGCGTATTAACGAGGCTTTTGAAATTGCCACGAGCGGTAGACCGGG
ACCAGTCTTGGTCGATTTACCAAAGGATGTTACAGCAGCTATCTTAAGAAAT
CCAATTCCAACAAAAACAACCTCTTCCATCAAACGCACTAAACCAATTAACCA
GTCGCGCACAGATGAATTTGTCATGCAAAGTATCAATAAAGCAGCAGATTT
GATCAACTTGGCAAAGAAACCTGTCTTATACGTCGGTGCTGGTATTTTAAAC
CATGCAGATGGTCCAAGATTACTAAAAGAATTAAGTGACCGTGCTCAAATAC
CTGTCACCACTACTTTACAAGGTTTAGGTTCAATTCGACCAAGAAGATCCAAA
ATCATTGGATATGCTTGGTATGCACGGTTGTGCTACTGCCAACCTGGCAGTG
CAAAATGCCGACTTGATAATTGCAGTTGGTGCTAGATTGACGACCGTGCTCA
CTGGTAATATTTCTAAATTCGCTCCAGAAGCTCGTCGTGCAGCTGCCGAGGG
TAGAGGTGGTATTATTCAATTTGAGGTTAGTCCAAAAAACATAAACAAGGTT
GTTCAAACCTCAAATAGCAGTGGAAGGTGATGCTACGACCAATCTGGGCAAAA
TGATGTCAAAGATTTTCCCAGTTAAGGAGAGGTCTGAATGGTTTGCTCAAAT
AAATAAATGGAAGAAGGAATACCCATACGCTTATATGGAGGAGACTCCAGGA
TCTAAAATTAACCAACAGACGGTTATAAAGAACTATCCAAGGTTGCCAACG
ACACAGGAAGACATGTCATTGTTACAACGGGTGTGGGGCAACATCAAATGTG
GGCTGCTCAACACTGGACATGGAGAAATCCACATACTTTCATCACATCAGGT
GGTTTAGGTACGATGGGTACGGTCTCCCTGCCGCCATCGGTGCTCAAGTTG
CAAAGCCAGAATCTTTGGTTATTGACATTGATGGTGACGCATCCTTTAACAT
GACTCTAACGGAATTGAGTTCTGCCGTTCAAGCTGGTACTCCAGTGAAGATT
TTGATTTTGAACAATGAAGAGCAAGGTATGGTTACTCAATGGCAATCCCTGT
TCTACGAACATCGTTATTCCCACACACATCAATTGAACCTGATTTCATAAA
ACTAGCGGAGGCTATGGGTTTTAAAGGTTTAAAGTCAAGAAGCAAGAGGAA
TTGGACGCTAAGTTGAAAGAATTCGTTTCTACCAAGGGCCAGTTTTGCTTG
AAGTGGAAGTTGATAAAAAAGTTCCTGTTTTGCCAATGGTGCGAGGTGGTAG
CGGTCTAGACGAGTTCATAAATTTTGACCCAGAAGTTGAAAGACAACAGACT
GAATTACGTCATAAGCGTACAGGCGGTAAGCACTGA

5

10

15

20

25

30

35

4

Secuencia
de ADN de
mutante M49
ILV2

ATGATCAGACAATCTACGCTAAAAAAGTTCGCTATTAAGCGTTGCTTTCAAC
ATATAGCATACCGCAACACACCTGCCATGAGATCAGTAGCTCTCGCGCAGCG
CTTTTATAGTTCGTCTTCCCGTTATTACAGTGCCTCTCCATTACCAGCCTCT
AAAAGGCCAGAGCCTGCTCCAAGTTTCAATGTTGATCCATTAGAACAGCCCG
CTGAACCTTCAAAATTGGCTAAGAACTACGCGCTGAGCCTGACATGGATAC
CTCTTTCGTGCGTTTAACTGGTGGTCAAATATTTAACGAAATGATGTCCAGA
CAAAACGTTGATACTGTATTTGGTTATCCAGGTGGTGCTATCCTACCTGTTT
ACGATGCCATTTCATAACAGTGATAAATTCAACTTCGTTCTTCCAAAACACGA
ACAAGGTGCCGGTCACATGGCAGAAGGCTACGCCAGAGCTTCTGGTAAACCA
GGTGTGTGCTTGGTTACTTCTGGGCCAGGTGCCACCAATGTCGTTACTCCAA
TGGCAGATGCCTTTGCAGACGGGATTCCAATGGTTGTCTTTACAGGGCAAGT
CCCAACTAGTGCTATCGGTACTGATGCTTTCCAAGAGGCTGACGTCGTTGGT
ATTTCTAGATCTTGTACGAAATGGAATGTCATGGTCAAGTCCGTGGAAGAAT
TGCCATTGCGTATTAACGAGGCTTTTGAAATTGCCACGAGCGGTAGACCGGG
ACCAGTCTTGGTCGATTTACCAAAGGATGTTACAGCAGCTATCTTAAGAAAT
CCAATTCCAACAAAAACAACCTCTTCCATCAAACGCACTAAACCAATTAACCA
GTCGCGCACAGATGAATTTGTCATGCAAAGTATCAATAAAGCAGCAGATTT
GATCAACTTGGCAAAGAAACCTGTCTTATACGTCGGTGCTGGTATTTTAAAC
CATGCAGATGGTCCAAGATTACTAAAAGAATTAAGTGACCGTGCTCAAATAC
CTGTCACTACTTTTACAAGGTTTAGGTTCAATTCGACCAAGAAGATCCAAA
ATCATTGGATATGCTTGGTATGCACGGTTGTGCTACTGCCAACCTGGCAGTG
CAAAATGCCGACTTGATAATTGCAGTTGGTGCTAGATTCGACGACCGTGCTCA
CTGGTAATATTTCTAAATTCGCTCCAGAAGCTCGTCGTGCAGCTGCCGAGGG
TAGAGGTGGTATTATTCAATTTGAGGTTAGTCCAAAAAACATAAACAAGGTT
GTTCAAACCTCAAATAGCAGTGGAAGGTGATGCTACGACCAATCTGGGCAAAA
TGATGTCAAAGATTTTCCAGTTAAGGAGAGGTCTGAATGGTTTGCTCAAAT
AAATAAATGGAAGAAGGAATACCCATACGCTTATATGGAGGAGACTCCAGGA
TCTAAAATTAACCAACAGACGGTTATAAAGAACTATCCAAGTTGCCAACG
ACACAGGAAGACATGTCATTGTTACAACGGGTGTGGAGCAACATCAAATGTG
GGCTGCTCAACACTGGACATGGAGAAATCCACATACTTTTCATCACATCAGGT
GGTTTAGGTACGATGGGTTACGGTCTCCCTGCCGCCATCGGTGCTCAAGTTG
CAAAGCCAGAATCTTTGGTTATTGACATTGATGGTGACGCATCCTTTAACAT
GACTCTAACGGAATTGAGTTCTGCCGTTCAAGCTGGTACTCCAGTGAAGATT
TTGATTTTGAACAATGAAGAGCAAGGTATGGTTACTCAATGGCAATCCCTGT
TCTACGAACATCGTTATTCCACACACATCAATTGAACCTGATTTTATAAA
ACTAGCGGAGGCTATGGGTTTAAAAGGTTTAAAGTCAAGAAGCAAGAGGAA
TTGGACGCTAAGTTGAAAGAATTCGTTTCTACCAAGGGCCAGTTTTGCTTG
AAGTGGAAGTTGATAAAAAAGTTCTGTTTTGCCAATGGTGCGAGGTGGTAG
CGGTCTAGACGAGTTCATAAATTTTGACCCAGAAGTTGAAAGACAACAGACT
GAATTACGTCATAAGCGTACAGGCGGTAAGCACTGA

Ejemplos

Ejemplo 1 – Análisis de compuestos

Se centrifugaron muestras a 1900 g durante 10 min y se almacenaron los sobrenadantes en un congelador a -20°C hasta uso posterior. Se midió el diacetilo total mediante cromatografía gaseosa de acuerdo con el método EBC 9.24.2 de la European Brewing Convention que incluye un período de incubación de las muestras a 60°C durante 90 minutos para determinar el diacetilo total, que reflejará la suma total del precursor acetolactato y diacetilo libre.

Se midieron el Alcohol y Plato utilizando un sistema de análisis de cerveza AlcoLyzer de Anton Paar (Colomer et al, 2020).

Se midieron el propanol e isobutanol volátiles utilizando Cromatografía Gaseosa – Extracción CS₂, con mínimas modificaciones como se describió previamente (Egan S, 1972). Se utilizó octanol como estándar interno. El cromatógrafo gaseoso Agilent6890A con inyección split/Splitless y detector FID utilizando una columna DBWAX J&W 123-7032: 30mX0.32 mm X0.25 micrones.

Ejemplo 2 – Descubrimiento de la levadura M49 mediante relevamiento.

Se realizó un relevamiento de levaduras en un mosto preparado a partir de una malta granulada comercial (malta secada por aspersión) denominada GranMalt como se describió previamente (Sanchez RG et al, 2012) excepto que se agregaron solamente 0.5 g/L de Extracto de Levadura (Difco) en lugar de 10 g/L. Este medio tenía un pH de partida de 5.4. Se decidió comparar levaduras previamente descritas (WO 2016/101960) junto a unas pocas levaduras con potencial prometedor para cultivo a partir de una colección de levaduras.

Se realizaron fermentaciones de 150 mL en módulos de presión de gas ANKOM como se describió previamente (Colomer et al, 2020) utilizando el mosto de GranMalt con agregado de 0.5 g/L de extracto de levadura como medio durante 7 días a 16°C con una tasa de infusión de 10 millones de células por mL. Como se había demostrado previamente que la elevada proporción de propanol a isobutanol esta correlacionada con la producción de bajo diacetilo en fermentaciones de cerveza (WO 2022/002960) se midieron estos metabolitos de alcohol de fusel a la cosecha en el día 7. Sorprendentemente, una levadura denominada M49 (número de acceso DSM 34496) tuvo la más alta proporción de propanol a isobutanol (Figura 1). También se notó que la levadura M49 no podía fermentar completamente la maltosa en el mosto y tenía un elevado nivel de 4VG (olor similar a clavo). M49 fue depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 34496.

El secuenciamiento de M49 reveló que M49 porta una mutación en el gen *ILV2* causando una sustitución de la G en la posición 1493 de la SEQ ID NO:3 por A, lo que da por resultado que dicho gen *ILV2* codifique una proteína ILV2 mutante que tiene una sustitución G498E. Así, el gen *ILV2* de M49 codifica una proteína ILV2 mutante de la secuencia provista como SEQ ID NO:2 en la presente.

Ejemplo 3 – Resultados de diacetilo y propanol en fermentación ANKOM con la levadura M49.

Se realizó una segunda fermentación en el sistema de presión de gas ANKOM esta vez analizando también el diacetilo total. Los datos de fermentación se muestran en la Figura 2. Nuevamente, M49 (número de acceso DSM 34496) tenía una muy elevada proporción de propanol a isobutanol comparando con las

otras dos levaduras que nuevamente tenían proporciones menores que 1. El diacetilo total también era muy bajo para M49 en el día 7 - muy por debajo del umbral de sabor de 50 ppb.

Ejemplo 4 – Ensayo de fermentación en 50 L de la levadura M49 en mosto de glucosa

Se evaluó la levadura M49 (número de acceso DSM34496) en escala de 50 L y se comparó su desempeño a lo largo del tiempo comparando con el híbrido de levadura 7 (Yeast Hybrid 7). Como se había observado, la levadura M49 tenía dificultades para fermentar maltosa, se decidió convertir el mosto pilsner estándar de 14° Plato con enzimas de modo de que toda la maltosa y maltotriosa se convirtieran en glucosa como se describió previamente (Gutiérrez et al, 2018). De este modo se generó un así llamado mosto de glucosa.

Se realizó la fermentación en el mosto de glucosa de 14° Plato a 16°C y una tasa de infusión de 10 millones de células por ml. Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2. Se demostró que la levadura M49 fermentaba un poco más lentamente que el Híbrido 7 pero producía niveles de diacetilo menores a 50 ppb a lo largo del período completo de fermentación. Esta característica de muy bajo diacetilo fue considerada como muy interesante para mejoramiento adicional. Desafortunadamente, la M49 todavía producía el mal sabor de 4VG debido a la presencia de los genes activos *PAD1* y *FDC1*.

Tabla 1 Resultados del ensayo de 50 L en mosto de Glucosa a 16°C con el Híbrido de levadura 7

Tiempo	Plato	Diacetilo Tot. [ppb]	pH	Temperatura [°C]
Día 0	14	28	5.13	
Día 1		28		
Día 2	12.5	249	4.58	15.9
Día 3	7.9	409	4.16	16
Día 4		395		
Día 5	3.9	236	4.02	15.9
Día 6		257		
Día 7	2.5	110	4.02	15.6
Día 8		130		
Día 9				
Día 10				
Día 11	2.5	23	4.12	16.3
Día 12				

Tabla 2 Resultados del ensayo de 50 L en mosto de glucosa a 16°C con la levadura M49

Tiempo	Plato	Diacetilo Tot. [ppb]	pH	Temperatura [°C]
Día 0	14.1	29	5.12	
Día 1		29		
Día 2	13.6	8	4.74	16.4
Día 3	11.6	24	4.37	16.3
Día 4		32		
Día 5	8.10	39	4.17	14.9
Día 6		43		
Día 7	4.70	37	4.12	16.1
Día 8		30		
Día 9				
Día 10				
Día 11	2.9	14	4.15	16.3
Día 12	2.8		4.15	15.1

Ejemplo 5 – Preparación de mosto de 9 °Plato con bajo alcohol.

Se preparó mosto de 9° Plato para propagación y fermentación de PPU191 y FY121 como sigue: primero se generó un mosto estándar de 12° Plato que consistía de 87% de Malta Pilsner y 13% de Malta Munich utilizando el perfil de maceración de la Tabla 3 (Maceración). Al comienzo de la ebullición se agregó lúpulo amargo y la ebullición se realizó a 105°C durante 50 minutos. Se ajustó el pH a 4.4 con ácido fosfórico. El mosto de 12° Plato resultante fue diluido hasta 9° Plato en un así llamado mosto AFB con la siguiente composición:

Densidad original	9.0 – 9.5
pH	4.3 – 4.4
Color	8.0 – 11.0
Unidades de amargor	33 – 39

La composición detallada de azúcares, aminoácidos y minerales del mosto está listada en la Tabla 4.

Tabla 3. Perfil de maceración para la preparación de mosto de 12 °Plato antes de *debrewing* hasta 9 °Plato

		Temp (°C) al comienzo	Temp (°C) al final	Tiempo (min)
Maceración		66.0	66.0	5.0
<i>Mantener - Reposo</i>		66.0		20.0
Aumento de Temperatura		66.0	74.0	10.0
<i>Mantener</i>		74.0		20.0
Aumento de Temperatura		74.0	78.0	5.0
<i>Mantener</i>		78.0		20.0

Tabla 4. Composición de mosto de bajo alcohol cuando el mosto de 12° Plato era diluido hasta 9° Plato

Azúcares		
Fructosa, g/100 mL		0.22
Glucosa, g/100 mL		0.65
Sacarosa, g/100 mL		0.25
Maltosa, g/100 mL		4.70
Maltotriosa g/100 mL		1.16
Azúcar (Mono Disacáridos), g/100 mL		5.82
Suma de Azúcares Fermentables, g/100 mL		6.98
Aminoácidos		
Ácido aspártico (Asp), mg/L		52.8
Ácido glutámico (Glu), mg/L		61.3
Serina (Ser), mg/L		74.1
Histidina (His), mg/L		43.9
Glicina (Gly), mg/L		28.9
Treonina (Thr), mg/L		54.8
Arginina (Arg), mg/L		99.5
Alanina (Ala), mg/L		89.3
Tirosina (Tyr), mg/L		88.3
Metionina (Met), mg/L		18.1
Valina (Val), mg/L		99.6
Fenilalanina (Phe), mg/L		114.2
Isoleucina (Iso), mg/L		60.8
Leucina (Leu), mg/L		126.8
Lisina (Lys), mg/L ^{1/2}		68.6
Suma de Aminoácidos Clase 1, mg/L		261.0
Suma de Aminoácidos Clase 2, mg/L		481.0
Suma de Aminoácidos Clase 3, mg/L		339.0
NAL (nitrógeno de alfa amino libre), mg/L		162.1

Minerales	
Ca Calcio, mg/L	49.2
Mg Magnesio, mg/L	78.2
Na Sodio, mg/L	53.9
K Potasio, mg/L	486
Zn Zinc, mg/L	0.153
Cu Cobre, mg/L	0.0263
Fe Hierro, mg/L	0.0181
Aluminio, mg/L	0.0277
Manganeso, mg/L	0.1457
Fósforo, mg/L	219.4
Sílice, mg/L	22.75
Cl Cloruro, mg/L	203.5
SO ₄ Sulfato, mg/L	369.9
NO ₃ Nitrato, mg/L	11.4
Ácido oxálico libre, mg/L	8.5
Fosfato, mg/L	510.7

Ejemplo 6 – Generación de la levadura PPU191 una levadura ale *S. cerevisiae* no diacetilo para fermentaciones de bajo alcohol.

El principal concepto detrás de la cepa PPU191 de *S. cerevisiae* era crear una levadura diploide que pudiera utilizarse como base para desarrollo adicional de novedosas levaduras para elaboración de cerveza que pudieran utilizarse en la producción de cervezas de tipo lager, sin alcohol. Por una parte, esta cepa debería combinar alguna de las características más importantes de las levaduras lager comunes, incluyendo buena floculación, baja formación de diacetilo y baja producción de 4-vinilguayacol (4-VG), uno de los principales mal sabores fenólicos (POF, por sus siglas en inglés). Pero al mismo tiempo esta cepa NO debería ser capaz de fermentar maltosa y maltotriosa (Mal⁺) para limitar la formación de alcohol, obviamente una característica importante de las levaduras que serán utilizadas para fermentar bebidas sin alcohol. Adicionalmente, la levadura debería tener una baja producción de diacetilo a lo largo de la fermentación. Para lograr esto, se propuso combinar la maltosa y las características negativas POF de la cepa PPU121, una levadura que se utilizó en la producción de cervezas de bajo alcohol o sin alcohol, con la levadura haploide M49 (número de acceso DSM 34496) que tiene una muy baja formación de diacetilo como se describe en los ejemplos previos. La PPU121 ha sido depositada en la DSMZ con el número de acceso DSM 34497.

En una primera etapa, la cepa PPU121 de *S. cerevisiae* diploide fue esporulada para crear derivados haploides de la misma. Con este objetivo se cultivó PPU121 durante la noche en YPD a 30°C. Se cosecharon las células y se lavaron rotatoriamente dos veces con agua estéril para eliminar el medio complejo. Finalmente, se hicieron manchas con las células en placas SPOR para *S. cerevisiae* estándar (Dunham et al., 2015) y se incubaron las placas a 30°C durante 3-7 días o hasta que las ascas/tétradas se tornaron visibles. Para aislar las esporas individuales, se suspendió una pequeña sección de células del parche SPOR en 500 µL de agua estéril

en un tubo de reacción de 1.5 mL y se lavaron rotatoriamente dos veces con agua estéril. Se resuspendieron las células en 450 μ L de tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 7.0), se agregaron 50 μ L de Zymolase (20T; stock 10 mg/mL), y las células se incubaron a 30°C durante 10-30 minutos para debilitar la pared celular de las ascas. Se aislaron subsiguientemente esporas unitarias en placas de agar YPD utilizando un microscopio de disección Singer MSM 400. Se determinaron los tipos de cruzamiento de los clones de esporas individuales utilizando un ensayo halo basado en respuesta a feromonas (Dohlmann et al., 1966) como sigue. Se cultivaron durante la noche a 30°C pequeños cultivos YPD de 2 mL de los ensayadores del tipo de cruzamiento BY4741 Δ ssf2 (MAT_a) y BY4742 Δ ssf2 (MAT_{alpha}) y las cepas de interés. Los cultivos de ensayadores durante la noche se diluyeron primero hasta una DO₆₀₀~0.1. Se agregaron aproximadamente 200 μ L de una cepa ensayadora diluida a 4 mL de agar superior YPD (medio YPD que contiene 0.5% de agar-agar; uno para cada cepa ensayadora), el agar fue esparcido sobre una placa de agar YPD y se dejó solidificar. Se hicieron manchas con 2-5 μ L del cultivo nocturno de las cepas de interés sobre cada placa ensayadora y se incubaron las placas ensayadoras a 30 °C durante la noche. Al día siguiente, se calificó, qué mancha tenía o no un área de no crecimiento. La cepa ensayadora en el prado responderá a la feromona del tipo de cruzamiento OPUESTO mediante el cese del crecimiento, creando un halo alrededor de la mancha de cepa de interés.

En la siguiente etapa, se cruzó un clon de espóra MAT_a de PPU121 (AFB6) con la cepa M49 MAT_{alpha}. Primero se cultivaron las cepas AFB6 y M49 durante la noche en 2 mL de YPD a 30°C. Se mezclaron las cepas en una proporción de aproximadamente 1:1 a elevadas densidades celulares (DO₆₀₀>10), y se hicieron manchas con la mezcla de células sobre una placa fresca de YPD. Después de 4-5 h de incubación a 30°C, se comprobaron microscópicamente los parches celulares en cuanto a formación de cigotos. Se aislaron los cigotos utilizando un microscopio de disección Singer MSM400. La naturaleza diploide de las cepas aisladas fue subsiguientemente demostrada mediante su capacidad de esporular en placas SPOR en contraste con las cepas parentales haploides (véase más arriba para el protocolo de esporulación).

Una de las levaduras diploides creadas, AFB17, fue luego esporulada como se describe anteriormente (ver arriba). Esta vez, sin embargo, para poder realizar un aislamiento de esporas en masa, el parche de esporulación fue tratado con Zymolyase durante varias horas para eliminar tantas células vegetativas como fuera posible. Se plaquearon las esporas en placas YPD comunes para colonias individuales (idealmente ~100-200 por placa). Para análisis adicionales se recogieron potenciales clones de esporas en placas de 96 pocillos que contenían 200 μ L de medio YPD utilizando el recolector de colonias microbianas QPix 460 de Molecular Devices. Para crear finalmente una levadura diploide con las características mencionadas anteriormente, se necesitó identificar una respectiva cepa MAT_a y MAT_{alpha} a partir de la reserva de clones de esporas haploides.

Se analizaron subsiguientemente aproximadamente 550 clones de esporas en cuanto a las características mencionadas anteriormente utilizando PPU121, M49 y una levadura común del elaborador negativa para POF como controles. Se analizaron la velocidad de fermentación (curvas de crecimiento) y floculación (ensayo visual) en 500 μ L de mosto de bajo alcohol (Tabla 4) en un perfilador EnzyScreen CR9001 Growth Profiler a 16°C. También se utilizó el sobrenadante de estas fermentaciones a pequeña escala para análisis de etanol utilizando el kit Megazyme Ethanol Assay Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se analizó la capacidad de los clones de esporas para producir malos sabores fenólicos utilizando el método de relevamiento rápido basado en absorbancia para malos sabores fenólicos descripto previamente (Mertens et al.

2017). Con este objetivo se cultivaron los clones de esporas en 150 µL de YPD líquido suplementado con 100 µg/mL de ácido ferúlico en una placa de 96 pocillos durante 3-5 días a 16° C y 750 rpm en un agitador Titramax 1000 de Heidolph. Se analizaron subsiguientemente 100 µL de los sobrenadantes en cuanto a concentraciones de ácido ferúlico remanente a 325 nm utilizando un lector de placas Infinite 200PRO de Tecan y se compararon con las cepas de control negativo POF. Se hicieron manchas con clones de esporas en placas SC-ILV estándar (medio complejo sintético que carece de los aminoácidos con cadena lateral isoleucina, leucina y valina) y se analizaron en cuanto a crecimiento, siendo la auxotrofia a ILV indicativa de un fenotipo de bajo diacetilo. Se analizó el tipo de cruzamiento de clones de esporas seleccionados utilizando el ensayo halo basado en respuesta a feromonas mencionado anteriormente.

Como se mencionó anteriormente, el propósito principal de este trabajo era crear una cepa para producir bebidas con bajo alcohol o sin alcohol, por lo que el criterio más importante para seleccionar candidatos para mejoramiento adicional era la producción de alcohol, y se consideraron interesantes para análisis adicionales las cepas con 0.5-0.6% de alcohol por volumen (APV) en el relevamiento de la biblioteca de clones de esporas inicial. Se analizaron nuevamente los clones de esporas seleccionados en cuanto a desempeño de fermentación para confirmar los resultados del relevamiento. Esta vez, sin embargo, se fermentaron 160 mL de mosto de bajo alcohol a 16°C en una botella de vidrio de 250 ml, monitoreando la producción de CO₂ mediante el sistema de producción de gas ANKOM RF. Al final de la fermentación, se determinó nuevamente la floculación mediante control visual, y se analizaron los líquidos en cuanto a contenidos de alcohol utilizando el sistema de análisis de cerveza Alcolyzer de Anton Para y niveles de dicetonas vecinales (diacetilo/butano-2,3-diona; pentano-2,3-diona) utilizando Headspace/GC-ECD. En base a estos análisis, se eligieron cuatro clones de esporas, dos cepas MAT_a (AFB94, AFB96) y dos MAT_α (AFB92, AFB90), para esfuerzos de mejoramiento adicionales.

Para crear la cepa diploide de interés, se cruzaron estas cuatro cepas haploides aisladas en todas las posibles combinaciones. Se configuraron las reacciones de cruzamiento como se describió previamente, y una vez que se había establecido la formación de cigotos, se plaquearon las reacciones de cruzamiento en colonias individuales en placas YPD. Después de 3-4 días de incubación a 30°C se recogieron las colonias grandes en placas de 96 pocillos, asumiendo que las cepas diploides usualmente crecen en tamaños de colonias más grandes que las cepas parentales haploides. Se analizaron subsiguientemente aproximadamente 1200 cepas en cuanto a desempeño de fermentación, producción de etanol, auxotrofia a ILV, floculación y malos sabores fenólicos como se describe anteriormente para la selección de clones de esporas haploides.

A partir de este relevamiento de masa inicial, la cepa PPU191, que derivaba de una cruce de las cepas AFB90 (Ilv- Mal-, POF-, Flocc-, Matalpha) y AFB96 (Ilv+, Mal-, POF-, Flocc+, Mata), se consideró una buena candidata como cepa base y se volvieron a comprobar todas las características importantes utilizando fermentaciones ANKOM como se describe anteriormente para la nueva comprobación de clones de esporas haploides para mejoramiento.

Ejemplo 7 – Propagación de PPU191 y FY112 para fermentaciones de bajo alcohol.

Las dos levaduras negativas para maltosa, PPU191 y FY112 que son buenas para la producción de cerveza de bajo alcohol pueden propagarse en cualquier mosto lager estándar de 12-16° Plato. Sin embargo, el riesgo es que el alcohol se acumule por encima del 1% de APV si se utiliza para propagación el mosto con el

Plato más alto. Este alcohol puede en algunos casos ser transferido hacia el tanque de fermentación después de la propagación y en la etapa de infusión. Por esta razón, para evitar la transferencia de etanol, se propagaron las levaduras en mosto de 9° Plato, que es el mismo mosto utilizado en la propagación de la levadura que para la posterior fermentación de bajo alcohol. Se realizó la propagación en mosto de 9° Plato utilizando procedimientos estándar y aireación de mosto respecto de levaduras lager/ale estándares.

Ejemplo 8 – Fermentación de mosto de 9° Plato para cerveza de bajo alcohol con levaduras PPU121 y PPU191 a escala de 50 L.

Se infundió el mosto de 9° Plato con 5-10 millones de células por mL. Se llevó a cabo la fermentación a 15°C. El perfil de fermentación fue como sigue para la levadura PPU121 (número de acceso DSM 34497) y PPU191.

Se realizó la fermentación hasta que el diacetilo total (diacetilo libre + precursor acetolactato) era menor que 50 ppb y se aplicó enfriamiento a la fermentación para cosechar la cerveza.

Las Tablas 5-9 a continuación ilustran los resultados de estas fermentaciones.

Tabla 5. Ensayo de 50 L de PPU191 a 15 °C y tasa de infusión de 9 millones de células por mL

Tiempo	Plato	Diacetilo total [ppb]	APV [%]	pH	Recuento de levaduras [10 ⁶ células por mL]	Temperatura [°C]
Día 0	9.14					
Día 1	8.38	18	0.3	4.45	38	14.8
Día 2	7.88	29	0.56	4.31		15
Día 3	7.81	24	0.60	4.13		15.3
Día 4	7.80	17	0.61	4.16	14	1
Día 5				4.12		0.5
Día 6						

Tabla 6. Ensayo de 50 L de PPU191 a 15°C y tasa de infusión de 7 millones de células por mL

Tiempo	Plato	Diacetilo total [ppb]	APV [%]	pH	Recuento de levaduras [10 ⁶ células por mL]	Temperatura [°C]
Día 0	9.19			4.35		
Día 1	9.18			4.35		
Día 2	8.86	17	0.14	4.25	4.9	14.7
Día 3	7.88	13	0.55	4.15	4.5	14.6
Día 4						
Día 5						
Día 6						

Tabla 7. Ensayo de 50 L de PPU191 a 15°C y una tasa de infusión de 7 millones de células por mL

Tiempo	Plato	Diacetilo total [ppb]	APV [%]	pH	Recuento de levaduras [10 ⁶ células por mL]	Temperatura [°C]
Día 0						
Día 1	8.55	15	0.3	4.16	3.9	15.2
Día 2	8.2	19	0.6	4.12	4.4	15.2
Día 3						
Día 4						
Día 5						
Día 6						

Tabla 8. Ensayos de 50 L de PPU121 a 15 °C y una tasa de infusión de 10 millones de células por mL

Tiempo	Plato	Diacetilo total [ppb]	APV [%]	pH	Recuento de levaduras [10 ⁶ células por mL]	Temperatura [°C]
Día 0	9.02	32		4.33		14.8
Día 1	8.25	111	0.38	4.19	18	15.4
Día 2	7.84	62	0.58	4.11	34	15.2
Día 3	7.81	44	0.62	4.12	34	14.8
Día 4	7.82	21		4.19	17	
Día 5		15				4
Día 6						

Como puede apreciarse a partir de las tablas anteriores, durante la fermentación con PPU191, el nivel de diacetilo total nunca llega por encima de umbral de sabor de 50 ppb.

Ejemplo 9 – Fermentación de mosto de 9° Plato para cerveza de bajo alcohol con levadura PPU121 a escala de 900 hL a 16°C.

Una fermentación de 900 hL a 16°C con PPU121 (número de acceso DSM 34497) se muestra en la Tabla 9, a continuación.

Tabla 9

Tiempo	Plato	Diacetilo total [pp]	APV [%]	pH	Recuento de levaduras [10 ⁶ células por mL]	Temperatura [°C]
Día 0	9.1			4.35	8.9	15.7
Día 1	8.9			4.20		16
Día 2	7.9	55	0.14	4.25		16
Día 3	7.9	112	0.55	4.15		10
Día 4	7.8	120	0.54	4.15		2
Día 5	7.8	90	0.60	4.16		1
Día 6	7.7	45		4.15		1

Como puede apreciarse en la Tabla 9, la levadura PPU121 tiene un nivel de acetilo por encima del umbral de sabor de 50 ppb en el momento crucial para cosecha de cerveza de bajo alcohol, cuando el alcohol alcanzado 0.5-0.6 APV. Esto puede conducir a una situación en donde el alcohol llegue a nivel alto antes que el diacetilo esté por debajo de 50 ppb, lo que significa un proceso que no se controla fácilmente ya que el punto final de diacetilo para una levadura tal como PPU121 también está influenciado por el pH y la temperatura.

Ejemplo 10 - Fermentación de mosto de 9° Plato para cerveza de bajo alcohol con levadura PPU191 a escala de 1500 hL a 14°C.

En la Tabla 10 a continuación se muestra una fermentación de 1500 hL a 14°C con PPU191.

Tabla 10

Tiempo	Plato	Diacetilo total (ppb)	APV (%)	pH	Recuento de levaduras (10^6 células por mL)	Temperatura (Celsius)
Día 0	9.3			4.3	9	14
Día 1	9.08	43	0.1	4.3	10	14
Día 2	8.08	48	0.56	4.1	30	14 (enfriamiento comienza a 4)
Día 3	7.85	40	0.73	4.01	25	8.8

Como puede apreciarse en la Tabla 10 anterior, durante la fermentación con PPU191, el nivel de diacetilo total nunca llega por encima del umbral de sabor de 50 ppb.

Ejemplo 11 – Segundo mejoramiento para generar una levadura de muy bajo diacetilo mediante cultivo cruzado de M49 y la levadura PE2 de bioetanol.

El objetivo de crear el híbrido M49xPE-2 era verificar que la característica de bajo diacetilo de M49 podía ser combinada con un trasfondo de cepas alternativas a las utilizadas en los ejemplos previos. Con este propósito se eligió la cepa de levadura PE-2, una cepa de *S. cerevisiae* diploide comúnmente utilizada en la industria de bioetanol en Brasil para la producción de altos niveles de alcohol. Para combinar la característica de bajo diacetilo de M49 con el trasfondo de PE-2, primero se esporularon PE-2 y se relevaron en cuanto a clones de esporas que fueran haploides y negativos para mal sabor fenólico (POF) como se describió previamente (Mertens et al, 2017). Uno de dichos clones de esporas negativos para POF derivado de PE-2 era PE-2-ST13 que fue utilizado para cultivo con M49.

Así, el clon de esporas PE-2-ST13 negativo para POF (Malteado tipo A) se cruzó con la levadura M49 (Mat alfa) como sigue. Primero se hicieron crecer ambas cepas durante la noche en 2 mL de YPD a 30°C con rotación. Se mezclaron las cepas en una proporción de aproximadamente 1:1 a elevadas densidades ($DO_{600} > 10$), y con la mezcla celular luego se hicieron manchas en una placa YPD. Después de 4-5 horas de incubación a 30°C se chequearon microscópicamente las mezclas celulares en cuanto a la formación de cigotos. La mezcla celular fue incubada adicionalmente a 30°C durante 20-24 horas para

permitir la formación de un número máximo de cigotos. Se separaron raspando células y se plaquearon sobre placas SPOR de *S. cerevisiae* estándares y se incubaron a 20°C durante 3-5 días o hasta que ascas/tétradas se volvieron visibles. Para aislar esporas, se llevó a cabo un aislamiento de esporas en masa con Zymolyase como en el Ejemplo con PPU191. Finalmente se plaquearon las esporas sobre placas YPD para colonias individuales (idealmente ~100-200 por placa) y se recogieron potenciales clones de esporas en placas de 96 pocillos que contenían 200 µL de medio YPD utilizando el recolector de colonias microbianas Molecular Devices QPix 460 para análisis adicional.

Para demostrar que la característica de diacetilo reducido de M49s se había combinado con el trasfondo PE-2, se analizaron subsiguientemente los clones de esporas aislados en cuanto a la formación de bajo diacetilo y carencia de producción de POF utilizando M49 y PE-2-ST13 como controles. Adicionalmente, se relevaron estos clones de esporas resultantes de la esporulación del cruzamiento M49XPE2-ST13 en cuanto a tipo de cruzamiento e incapacidad de esporular para verificar que los clones de esporas eran haploides. El relevamiento en cuanto a bajo diacetilo (mediante auxotrofia de aminoácidos de cadena lateral), producción de POF y tipo de cruzamiento se realizó como se describió previamente. La naturaleza haploide se demostró adicionalmente mediante la incapacidad de esporulación en placas SPOR después de 7 días a 20°C.

Como el propósito principal de este trabajo era confirmar que la característica de bajo diacetilo de M49 podía ser introducida en el trasfondo PE-2, se seleccionaron unos pocos clones de esporas identificados en el relevamiento inicial para análisis adicionales (Tabla 11). Se analizaron los clones de esporas en cuanto a desempeño de fermentación en 150 mL de mosto de 70% de malta de cebada/30% de agregado de cebada (70/30) a 16°C en una botella de vidrio de 250 mL monitoreando la producción de CO₂ mediante el Sistema de Producción de Gas ANKOM RF. Al final de la fermentación, los líquidos se analizaron en cuanto a niveles de 4-vinil-guayacol (4VG/POF) y dicetonas vecinales (diacetilo/butano-2,3-diona) utilizando Headspace GS-MSMS y GC-ECD, respectivamente. Como se describe en los ejemplos previos, también se analizaron los líquidos en cuanto a niveles de propanol utilizando Headspace GC-FID. Los cuatro clones de esporas ST55, ST56, ST57 y ST59 mostraron capacidad de baja formación de diacetilo junto con baja producción de POF. Además, se apreciaron una mayor producción de propanol o proporción de propanol a isobutanol para los cuatro clones de esporas correspondientes a aquellas con el diacetilo total más bajo. ST46, el clon de esporas que produjo elevados niveles de diacetilo tenía los niveles más bajos de propanol formado y también la más baja proporción de propanol a isobutanol. Así, el clon de esporas ST46 fue considerado como una espora no deseada ya que era también fenólica y aún elevada en diacetilo.

A partir de estos resultados, se confirmó que la característica de bajo diacetilo de M49 podía combinarse también con el trasfondo de la cepa PE-2 además del trasfondo de cepa utilizado en el ejemplo con la PPU191.

Tabla 11. Perfiles de Diacetilo Total, POF (4-VG) y propanol de unas pocas esporas diferentes derivadas de esporulación del híbrido de M49xPE-2 (M49 X ST13). Se muestreó líquido de las fermentaciones realizadas en 150 mL de mosto 70/30 a 16°C mediante el Sistema de Producción de Gas ANKOM RF.

	Cepa de Levadura	Propanol (mg/L)	Proporción Propanol: Isobutanol	Diacetilo Total (µg/L)	4-Vinilguayacol, (Área 4-VG / Área ISTD)
5	M49	38.51	2.39	10.0	1.82
	PE2-ST13	22.12	1.11	88.0	0.36
	ST55	31.02	2.26	20.0	0.30
	ST56	47.38	2.53	15.0	0.40
	ST57	66.54	3.91	13.0	0.44
10	ST59	104.37	5.6	23.0	0.44
	ST46	20.32	1.50	574.0	2.32

Ejemplo 12 – Tercer mejoramiento – Cruzamiento entre M49 y la levadura X2180-1A

El fenotipo de bajo diacetilo de la cepa M49 puede fácilmente ser cruzado en otros linajes de cepas. Este ejemplo muestra el cruzamiento de M49 (MAT α His- *ilv2*) (número de acceso DSM 34496) con la X2180-1A derivada de S288C públicamente disponible (MAT α *SUC2* Mel- Mal- Gal- *CUP1*) (número de acceso DSM 4266; NCYC 956; ATCC 26786). Con ese objetivo, se hicieron crecer inicialmente ambas cepas durante la noche en medio YPD líquido a 30°C. Al día siguiente, se mezclaron 20 µL de cada cultivo, se hicieron manchas con las células sobre una placa de agar YPD, y la placa se incubó a 30°C. Después de 4-5 horas, una pequeña muestra de las células en manchas se separaron y chequearon microscópicamente en cuanto a la formación de cigotos. Subsiguientemente, se aislaron los cigotos en una placa YPD fresca utilizando un microscopio de disección de tétradas Singer MSM400. Uno de los cigotos que resultó del cruzamiento entre M49 y X2180-1A se incubó en forma de una colonia en una placa YPD a 30°C durante tres días y esta levadura diploide fue denominada Híbrido M49X2180.

Se untaron colonias del Híbrido M49X2180 sobre placas de esporulación de levaduras estándares y se incubaron las placas durante varios días a 30°C. Durante ese período, se chequearon microscópicamente regularmente los parches celulares en cuanto a esporulación/formación de tétradas. A partir de uno de los parches bien esporulados, se aislaron esporas en una placa agar YPD utilizando nuevamente el microscopio de disección de tétradas Singer MSM400. Finalmente, se hicieron manchas con los clones de esporas resultantes (esporas que crecen en el medio YPD) sobre placas YPGalactose, SC-His y SC-Ile/Leu/Val para analizar la segregación del marcador. Los clones de esporas que mostraron segregación del marcador recombinante (His+ *ilv2* o Gal- *ilv2*) se fermentaron subsiguientemente en escala de laboratorio y se analizaron en cuanto a la formación de diacetilo.

Ejemplo 13 – Fermentación a escala de laboratorio con las cepas parentales, nuevo híbrido M49X2180 y clones de esporas del nuevo híbrido.

Se fermentaron a escala de laboratorio las cepas M49 (número de acceso DSM 34496) y X2180-1A (número de acceso DSM 4266; NCYC 956; ATCC 26786) parentales, la cepa híbrida diploide Híbrido M49X2180 y clones de esporas resultantes de la esporulación de Híbrido M49X2180.

Se precultivaron las células en 2 mL de YPD líquido durante la noche a temperatura ambiente y luego se agregaron a un frasco de agitación con 40 mL de mosto de elaboración de cerveza de 16.6° Plato

con la composición mostrada en la Tabla 12. Se realizó la incubación durante un fin de semana durante 72 horas. De cada frasco de agitación se recolectaron 10 mL de células mediante centrifugación y se lavaron con agua estéril. Finalmente, se resuspendieron 5 mL de células lavadas en 5 mL de mosto y se agregaron a 145 mL de mosto fresco y se llevó a cabo la fermentación en el mismo mosto (Tabla 12) a 16°C. Se llevaron a cabo fermentaciones a escala de laboratorio en probetas de vidrio altas de 250 mL (331 × 39 × 39 mm; Duran) que contenían 150 mL de medio de fermentación y se sellaron con un vaso de precipitados invertidos (Duran) en la parte superior de la probeta para permitir el escape de dióxido de carbono y un fácil acceso para análisis. Se realizaron las fermentaciones con agitación continua a 130 rpm y se siguieron a lo largo del tiempo la pérdida de peso que es una indicación de la velocidad de fermentación por pérdida de peso y el diacetilo (Tablas 13 y 14). Como puede apreciarse, los clones de esporas resultantes de la esporulación de Híbrido M49X21 diploide están todos por debajo de 50 ppb de diacetilo en todos los puntos de tiempo medidos y la cepa parental X2180-1a y la Híbrido M49X2180 diploide están por encima de 100 ppb de diacetilo total en el día 2. La densidad relativa en Plato al final de la fermentación se muestra en la Tabla 15. Esta muestra que la característica de bajo diacetilo fue transferida desde M49 a los nuevos clones de esporas junto con otros marcadores genéticos de X2180-1A. Los mostos pudieron sólo fermentar parcialmente el mosto de 16.6° Plato a 11.6 ya que ambas M49 y X2180-1A son levaduras negativas para maltosa y maltotriosa y el mosto contenía una cantidad sustancial de maltosa y maltotriosa.

Tabla 12. Mosto utilizado en fermentaciones a escala de laboratorio de M49, X2180-1A, diploide, y clones de esporas del Híbrido M49X2180. La densidad de partida de este mosto era 16.6° Plato.

Azúcares	
Fructosa, g/100 mL	0.24
Glucosa, g/100 mL	4.06
Sacarosa, g/100 mL	0.26
Maltosa, g/100 mL	6.28
Maltotriosa g/100 mL	2.02
Azúcar (Mono Disacáridos), g/100 mL	10.84
Suma de Azúcares Fermentables, g/100 mL	12.86
Aminoácidos	
Ácido aspártico (Asp), mg/L	58
Ácido Glutámico (Glu), mg/L	66
Serina (Ser), mg/L	83
Histidina (His), mg/L	61
Glicina (Gly), mg/L	37
Treonina (Thr), mg/L	68
Arginina (Arg), mg/L	191
Alanina (Ala), mg/L	103
Tirosina (Tyr), mg/L	133
Metionina (Met), mg/L	50

	Valina (Val), mg/L	132
	Fenilalanina (Phe), mg/L	197
	Isoleucina (Iso), mg/L	79
	Leucina (Leu), mg/L	237
5	Lisina (Lys), mg/L½	98
	NAL (nitrógeno alfa amino libre), mg/L	254
	Minerales	
	Ca Calcio, mg/L	87
10	Mg Magnesio, mg/L	115
	Na Sodio, mg/L	14
	K Potasio, mg/L	631
	Zn Zinc, mg/L	0.23
	Cu Cobre, mg/L	0.06
15	Fe Hierro, mg/L	0.26
	Aluminio, mg/L	0
	Manganeso, mg/L	0.38
	Fósforo, mg/L	453
	Sílice, mg/L	15
20	Cl Cloruro, mg/L	419
	SO4 Sulfato, mg/L	72
	NO3 Nitrato, mg/L	6.3
	Ácido oxálico libre, mg/L	13
	Fosfato, mg/L	1496

Tabla 13. Pérdida de peso en gramos a lo largo del tiempo que refleja la velocidad de fermentación debido a la pérdida de dióxido de carbono durante la fermentación alcohólica.

	Levadura	Marcadores genéticos	Día 0	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 8
30	M49	<i>ilv2</i> His+	0	2.07	3.35	3.55	4	4.11
	X2180-1A	gal-	0	2.63	3.16	3.3	3.66	3.77
	Híbrido M49X2180	ILV2+ His+ Gal+	0	3	3.37	3.55	4.02	4.15
	Clon 1 de esporas (KL1)	<i>ilv2</i> gal-	0	2.45	3.21	3.35	3.74	3.89
	Clon 3 de esporas (KL3)	<i>ilv2</i> gal-	0	0.47	1.08	1.82	3.45	3.7
35	Clon 4 de esporas (KL4)	<i>ilv2</i> gal-	0	1.08	3.01	3.31	3.61	3.74
	Clon 6 de esporas (KL6)	<i>ilv2</i> HIS+	0	0.4	1.33	2.64	3.71	3.82
	Clon 7 de esporas (KL7)	<i>ilv2</i> HIS+	0	0.3	1.16	2.74	3.47	3.64

Tabla 14. Diacetilo total a lo largo del tiempo durante las fermentaciones a escala de laboratorio de las levaduras parentales M49, X2180-1A, el nuevo Híbrido M49X2180 y clones de esporas seleccionados a partir del nuevo Híbrido.

Levadura	Marcadores Genéticos	Día 0	Día 2	Día 4	Día 7
M49	<i>ilv2</i> His+	35	31	19	12
X2180-1A	gal-	67	322	99	33
Híbrido M49X2180	ILV2+ His+ Gal+	35	118	28	12
Clon 1 de esporas (KL1)	<i>ilv2</i> gal-	35	27	14	11
Clon 3 de esporas (KL3)	<i>ilv2</i> gal-	30	19	17	18
Clon 4 de esporas (KL4)	<i>ilv2</i> gal-	31	19	11	10
Clon 6 de esporas (KL6)	<i>ilv2</i> HIS+	47	21	30	38
Clon 7 de esporas (KL7)	<i>ilv2</i> HIS+	39	17	15	10

Tabla 15. Densidad relativa del mosto de partida, cerveza después de la fermentación. Las fermentaciones no llegaron por debajo de 11 °Plato ya que las levaduras eran todas negativas para maltosa.

Mosto fermentado por	Plato
Mosto de partida	16.6
M49	11.7
X2180-1A	11.8
Híbrido M49X2180	11.9
Clon 1 de esporas	11.8
Clon 3 de esporas	11.9
Clon 4 de esporas	11.8
Clon 6 de esporas	11.6
Clon 7 de esporas	11.7

Ejemplo 14 - Ejemplo de ensayo de 50L en mosto de bajo alcohol con las levaduras PPU191, M49 y LONA

Se precultivaron las levaduras en el mismo mosto que el utilizado en la fermentación, que es mosto AFB de 9° Plato. Se cultivaron las levaduras a temperatura ambiente en botellas de tapa azul de 3 L con aire estéril aplicado y un agitador magnético.

Se cosecharon las levaduras y se recolectaron mediante centrifugación. Se calcularon las cantidades de células deseadas mediante peso de la pasta celular y contador de núcleos. Se realizaron las fermentaciones a escala de 50 L a 15°C y una tasa de infusión diana de 7-10 millones de células por mL. Las 3 levaduras se compararon al mismo tiempo: M49 (número de acceso DSM 34496), PPU191 y la levadura de bajo alcohol negativa para maltosa de Lallemmand denominada LONA. Se llevó a cabo la fermentación del mosto de 9° Plato a 15°C. El perfil de fermentación fue como sigue para las levaduras M49, PPU191 y la levadura de bajo alcohol de Lallemmand denominada LONA (Tablas 16 a 18).

Tabla 16. Ensayo de 50 L con la levadura M49 a 15°C y tasa de infusión de 7-10 millones de células por mL

Tiempo	Plato	Diacetilo total [ppb]	APV [%]	pH	Recuento de levaduras [10 ⁶ células por mL] Contador de núcleos	Recuento de levaduras [10 ⁶ células por mL] Cellometer	Temperatura [°C]
Día 0		6					15
Día 1	9.01	7	0	4.3	4	13	14.8
Día 2	8.37	7	0.42	4.11	1	8	15.2
Día 3	8.02	6	0.40	4.04	20	12	14.9
Día 4	7.80	5	0.50	4.04	26	15	14.9
Día 5							
Día 6			0.55				

Tabla 17. Ensayo de 50 L con la levadura LONA at 15 °C y tasa de infusión de 7-10 millones de células por mL

Tiempo	Plato	Diacetilo total [ppb]	APV [%]	pH	Recuento de levaduras [10 ⁶ células por mL] Contador de núcleos	Recuento de levaduras [10 ⁶ células por mL] Cellometer	Temperatura [°C]
Día 0		10					15
Día 1	9.0	143	0	4.30	10	18	14.6
Día 2	7.94	70	0.42	4.0	24	52	15.4
Día 3	7.80	40	0.47	3.99	8	84	15.3
Día 4	7.77	29	0.53	4.03	27	50	15.3
Día 5							
Día 6			0.51				

Tabla 18. Ensayo de 50 L con la levadura PPU191 a 15 °C y tasa de infusión de 7-10 millones de células por mL

Tiempo	Plato	Diacetilo total [ppb]	APV [%]	pH	Recuento de levaduras [10 ⁶ células por mL] Contador de núcleos	Recuento de levaduras [10 ⁶ células por mL] Cellometer	Temperatura [°C]
Día 0		8					15
Día 1	8.95	16	0	4.28	7	12	15.1
Día 2	8.02	13	0.35	4.0	9	53	14.8
Día 3	7.88	9	0.43	3.94	25	57	14.1
Día 4	7.88	6	0.48	4.01	7	38	14.3
Día 5							
Día 6			0.49				

Como puede apreciarse en las Figuras 3 y 4, la tasa de fermentación por caída en Plato fue similar en todos los casos excepto para M49 que fue más lenta en fermentación. Para las dos levaduras M49 y PPU191, el diacetilo estaba siempre por debajo de 45 ppb a lo largo de todo el tiempo de fermentación. Esta característica de no acetilo facilita controlar el proceso de fermentación de bajo alcohol.

Además, los bajos recuentos celulares de la cepa PPU191 (38*10⁶ células por mL) vs. LONA (50*10⁶ células por mL) en el día 4 es una medida del elevado grado de floculación de la PPU191, ya que el puerto de muestreo para recuento celular está situado a 1/3 del recipiente por encima del cono de sedimentación, por lo que un recuento celular bajo significa más células en el cono al final de la fermentación, es decir una sedimentación más fuerte y en consecuencia una elevada floculación.

Referencias

Briggs, D. E. et al. Malting and Brewing science. 1981.

Colomer, M. S., Funch, B., Solodovnikova, N., Hobley, T. J., & Förster, J. (2020). Biotransformation of hop derived compounds by Brettanomyces yeast strains. Journal of the Institute of Brewing, 126(3), 280-288. <https://doi.org/10.1002/jib.610>

Dohlman HG, Song J, Ma D, Courchesne WE, Thorner J. Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha subunit). Mol Cell Biol. 1996 Sep;16(9):5194-209. doi: 10.1128/MCB.16.9.5194. PMID: 8756677; PMCID: PMC231520.

Dunham MJ, Gartenberg MR, Brown GW. (2015) Methods in yeast genetics and genomics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual.

Egan S. Reproducibility of some gas chromatographic methods used in beer flavour analysis. Brygmesteren 1971:28:191-199

Gutiérrez A, Boekhout T, Gojkovic Z, Katz M. Evaluation of non-Saccharomyces yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. Journal of the Institute of Brewing 2018:DOI 10.1002/jib.512

Hough, J. S. et al. Malting and Brewing science: Hopped Wort and Beer, Volume 2. 1982.

5 Kempf C, Lengeler K, Wendland J, 2017. Differential stress response of *Saccharomyces* hybrids revealed by monitoring Hsp104 aggregation and disaggregation. Microbiological Research 200:53-63.

Lundblad, V y Struhl, K, 2008. Yeast. Current Protocols in Molecular Biology 82(1): 1934-3639. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1300s82>.

10 Mertens S, Steensels J, Gallone B, Souffriau B, Malcorps P, Verstrepen KJ. Rapid Screening Method for Phenolic Off-Flavor (POF) Production in Yeast. Journal of the American Society of Brewing Chemists 2017:75:318-323. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-4142-01>

Sanchez RG, Solodovnikova N, Wendland J. Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance. Yeast 2012:29:343-355

15 Treco, D.A., Winston, F., 2008. Growth and manipulation of yeast. Curr Protoc Mol Biol Chapter 13, Unit 13.2. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1302s82>

20

25

30

35