

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 537**

51 Int. Cl.:

**C12C 12/00** (2006.01)

**C12R 1/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2021 PCT/EP2021/067882**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2022 WO22002960**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2021 E 21737438 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 4172301**

54 Título: **Levadura de bajo contenido en diacetilo**

30 Prioridad:

**30.06.2020 EP 20183134**

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

**03.12.2024**

73 Titular/es:

**CARLSBERG A/S (100.0%)  
J. C. Jacobsens Gade 1  
1799 Copenhagen V, DK**

72 Inventor/es:

**LENGELER, KLAUS;  
KATZ, MICHAEL;  
FÖRSTER, JOCHEN;  
FENNESSY, ROSS;  
GJERMANSEN, CLAES y  
CHAILYAN, ANNA**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 991 537 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Levadura de bajo contenido en diacetilo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la producción de cerveza, y en particular al campo de la producción de cerveza lager. Más específicamente, la invención proporciona levadura con bajo contenido en diacetilo, que es particularmente útil para fermentación rápida y eficiente durante la producción de cerveza, en particular en la producción de cervezas lager.

Antecedentes de la invención

15 Las cervezas lager se caracterizan frecuentemente por perfiles de sabor frescos y limpios. El diacetilo contribuye al perfil de sabor de muchos productos fermentados. Sin embargo, su sabor típico a mantequilla se considera como un sabor desagradable en las cervezas estilo lager, y la eliminación de este compuesto tiene un mayor impacto en el tiempo y gasto de energía en las cervecerías.

20 Una cerveza lager se prepara usualmente por fermentación de mosto, un líquido rico en carbohidratos, con una levadura de lager. La levadura de lager en general difiere de la levadura de ale en varias formas. La levadura de lager pertenece en general a la especie *Saccharomyces pastorianus*. Frecuentemente, la levadura de lager también es referida como "levadura de fermentación de fondo" debido a que se asienta en el fondo durante la fermentación. El asentamiento o floculación, de la levadura también puede afectar el tiempo de procesamiento, puesto que la levadura necesita asentarse de manera suficiente para recolectarla para la siguiente ronda de preparación de cerveza. Para levaduras de lager que no son muy floculantes (se asientan lentamente) esto requerirá enfriamiento y por lo tanto dará por resultado tiempo de procesamiento adicional. Adicionalmente, las cepas de levadura de lager son en general las mejores usadas en temperaturas que varían de 7°C a 18°C. En contraste con la levadura de ale, que pertenecen en general a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura de lager es capaz de usar melibiosa como la única fuente de carbono y habitualmente no puede crecer a 37°C.

35 Durante la fermentación, se forma diacetilo por oxidación no enzimática de acetolactato excretado por la célula de levadura, sin embargo, durante el periodo de maduración, el diacetilo es captado por la célula de levadura nuevamente y se metaboliza. Parte del manejo de fermentación se lleva a cabo para asegurar que la cerveza terminada contenga diacetilo abajo de un umbral establecido. El problema de reducir el contenido de acetilo en la cerveza terminada es esencialmente prominente con la cerveza lager conforme la fermentación se presenta en una temperatura más baja y esto da por resultado una más lenta recaptación y metabolismo del diacetilo por la levadura de lager.

40 El límite inferior para la percepción de sabor del diacetilo en la cerveza se considera en general que es 50 ppb de diacetilo, y la necesidad de reducir la concentración de diacetilo a este nivel en la cerveza terminada agrega convencionalmente una cantidad significativa de tiempo extra necesario para maduración de la cerveza lager, antes de que se complete el proceso de preparación de cerveza. El documento JP2012217430 describe cepas de levadura con una variante específica de ILV2 y varias copias del gen ILV5. Las cepas tienen una menor producción de diacetilo durante la fermentación. El documento WO2007/097089 describe una levadura con un gen ILV2 alterado, que también muestra una menor producción de diacetilo. Zhao-Yue Wang, Int. J. Food Science Technology, 2008 vol 43, (6), 989-994 muestra una producción reducida de diacetilo por levadura con un gen ILV2 alterado.

50 Compendio

55 Como se describe en lo anterior, la fermentación de mosto con cepas de levadura de lager de *Saccharomyces pastorianus* convencionales en temperaturas entre 7°C y 18°C, da por resultado niveles de acetilo en el mosto muy por arriba del límite 50 ppb de la percepción de sabor. En consecuencia, varios días adicionales de maduración por la levadura han sido requeridos previamente para reducir estos niveles para asegurar que el contenido de acetilo de la cerveza terminada esté por debajo de un umbral establecido.

60 Interesantemente, la presente invención proporciona nuevas variantes híbridas de cepas de levadura de *Saccharomyces pastorianus* que producen bajo niveles de diacetilo y/o consumen rápidamente el diacetilo durante la fermentación a 18°C o menos, y en consecuencia la cerveza producida por esta cepa requiere muy poco tiempo para maduración. En particular, cuando se fermenta el mosto con las cepas de levadura de la invención, el nivel de diacetilo total es ≤60 ppb, de manera preferente ≤50 ppb, en el momento en que se completa la fermentación del azúcar, es decir, en un momento durante la fermentación cuando el nivel de azúcar es más o menos estable. En general, una reducción en el tiempo de fermentación de al menos 1 día o al menos 2 días se observa cuando se compara con las cepas lager actuales.

La presente invención también proporciona métodos para producir bebidas que requieran muy poco tiempo de maduración de la cerveza después de la fermentación a 18°C o abajo, al usar cepas de levadura de *S. pastorianus*, y que tienen un sabor agradable.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un extracto acuoso fermentado, el método comprende los pasos de:

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

10 ii) proporcionar una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces pastorianus*, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba fermentada contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, de manera preferente como máximo 50 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba fermentada no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de 18°C o menos, de manera preferente entre 12 y 16 °C; y

15  
20 iii) fermentar el extracto acuoso proporcionado en el paso i) con la cepa de levadura del paso ii), obteniendo de esta manera un extracto acuoso fermentado.

Como se usa en la presente, el término "extracto acuoso" se usa para indicar un extracto acuoso de malta y/o granos de cereal, tal como mosto, que se usa para preparar una bebida, por ejemplo, una cerveza, mientras que el término "solución de prueba" se usa para indicar una solución con una composición más estrictamente definida que se usa para evaluar las propiedades del microorganismo usado para fermentación

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una bebida, el método comprende los pasos de:

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

ii. proporcionar una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces pastorianus*, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, de manera preferente como máximo 50 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C;

35  
40 iii. fermentar el extracto acuoso proporcionado en el paso i) con la cepa de levadura, obteniendo de esta manera un extracto acuoso fermentado; y

iv. procesar el extracto acuoso fermentado en una bebida.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una bebida, el método comprende los pasos de:

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

50 ii. proporcionar una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces pastorianus*, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, de manera preferente como máximo 50 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C;

55  
60 iii. fermentar el extracto acuoso proporcionado en el paso i) con la cepa de levadura, obteniendo de esta manera un extracto acuoso fermentado; y

iv. procesar el extracto acuoso fermentado en una bebida, en donde los pasos de procesamiento comprenden uno o más de lo siguiente:

65 1. Filtración,

2. Carbonación,

3. Maduración, o

4. Embotellado

5

En otro aspecto, la presente invención proporciona una cepa de levadura, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato y en donde la solución de prueba contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, de manera preferente como máximo 50 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores después de la incubación de la cepa de levadura en el extracto.

10

Breve descripción de las figuras

15

La Figura 1 muestra el diacetilo y los niveles de los grados °Plato del mosto incubado con la cepa de Levadura Híbrida ZDA1 y la cepa de levadura de control Levadura Híbrida 7 de un ensayo de 50L a (A) 16°C y (B) 18°C. La Figura 1C es una gráfica como la Figura 1B, pero con la cepa ZDA1 sola y un eje diferente para el diacetilo total 18°C. Los resultados se describen en el Ejemplo 1.

20

La Figuras 2 muestra los niveles de diacetilo del mosto incubado con las cepas de Levadura Híbrida ZDA1 y la cepa de levadura de control Levadura Híbrida 7 de un ensayo de 10 HL a 16° (Figura 2A). El °Plato se muestra adicionalmente para la cepa de Levadura Híbrida ZDA1 (Figura 2B). Los resultados se describen en el Ejemplo 4.

25

La Figura 3 muestra la relación entre el propanol por isobutanol en nueve diferentes cervezas comerciales comparadas con una cerveza preparada por la cepa de Levadura ZDA2 (89-84393 ZDA F1) de acuerdo con la presente invención. Todas las cervezas están cerca del 5% de ABV.

30

Las Figuras 4A a 4F muestran una alineación de secuencias de proteína ILV2 entre WS34-78, cer (*Saccharomyces cerevisiae*), eub (*Saccharomyces eubayanus*), Híbrida7 (Levadura híbrida 7), ZDA1 y ZDA2.

Las Figuras 5A a 5C muestran una alineación de las secuencias de proteína ILV6 entre WS34-78, cer (*Saccharomyces cerevisiae*), eub (*Saccharomyces eubayanus*), Híbrida7 (Levadura híbrida 7), ZDA1 y ZDA2.

35

Las Figuras 6A a 6E muestran una alineación de secuencias de proteína ILV3 entre WS34-78, cer (*Saccharomyces cerevisiae*), eub (*Saccharomyces eubayanus*), Híbrida7 (Levadura híbrida 7), ZDA1 y ZDA2.

Las Figuras 7A a 7D muestran una alineación de secuencias de proteína ILV5 entre WS34-78, cer (*Saccharomyces cerevisiae*), eub (*Saccharomyces eubayanus*), Híbrida7 (Levadura híbrida 7), ZDA1 y ZDA2.

40

Las Figuras 8A a 8E: muestran un alineamiento de las secuencias de la proteína BAT1 entre WS34-78, cer (*Saccharomyces cerevisiae*), eub (*Saccharomyces eubayanus*), Híbrida7 (Levadura híbrida 7), ZDA1 y ZDA2.

45

Las Figura 9A a 9D muestran una alineación de secuencias de proteína BAT2 entre WS34-78, cer (*Saccharomyces cerevisiae*), eub (*Saccharomyces eubayanus*), Híbrida7 (Levadura híbrida 7), ZDA1 y ZDA2.

La Figura 10 muestra el °Plato y los niveles de diacetilo del mosto incubado con la cepa de Levadura ZDA2 y la cepa de levadura de control Levadura híbrida 7 de un ensayo de escala comercial a 16°C. Los resultados se describen en el Ejemplo 8.

50

Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

55

Como se usa en la presente, "un" o "una" puede significar uno o más, dependiendo del contexto en el que se usa.

Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" como se usa en la presente significa  $\pm 10\%$ , de manera preferente  $\pm 5\%$ , de manera aún más preferente  $\pm 2\%$ .

60

El término "cerveza" como se usa en la presente se refiere a una bebida preparada por fermentación de mosto. De manera preferente, la fermentación se hace por levadura.

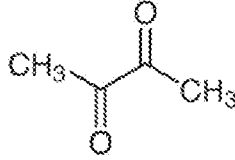
65

El término "cerveza verde" como se usa en la presente se refiere a una solución directamente obtenida después de la fermentación del mosto, de manera preferente por levadura. De esta manera "cerveza verde" se obtiene antes de la maduración. En otras palabras, la cerveza verde es la solución obtenida inmediatamente después

de que se ha completado la fermentación de azúcar. Hablando en general, la cerveza ya no se considera "verde" cuando ha alcanzado la madurez completa del sabor y aroma.

El término "diacetilo" como se usa en la presente se refiere al compuesto químico de la fórmula:

5



La concentración de diacetilo en una muestra se puede medir por cromatografía de gas de acuerdo con el método EBC 9.24.2 de European Brewing Convention que incluye un periodo de incubación de las muestras a 60°C durante 90 minutos para determinar el diacetilo total, que reflejará la suma total del acetolactato precursor y el diacetilo libre. A lo largo de la presente descripción, cuando se describe el diacetilo producido por las cepas de levadura actualmente descrita, el término "diacetilo" se refiere a "diacetilo total" a menos que se indique de otra manera. La concentración de diacetilo de una muestra se refiere de esta manera a la concentración de diacetilo total, es decir la suma total del acetolactato precursor y el diacetilo libre.

10

15

El término "cereal" como se usa en la presente se refiere a cualquier planta de la familia de las gramíneas que producen un grano comestible, tal como trigo, mijo, arroz, cebada, avenas, centeno, triticale, sorgo y maíz.

El término "grano" como se usa en la presente se refiere a semillas de un cereal que comprende la cariopsis de cereales, también denominada semilla interna. Además, el grano puede comprender el 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 de grano después de la trilla. Sin embargo, también se presentan variedades de cebada desnudas. En estas, la carióspside está libre del lema y pálea y se trilla libremente como en el trigo. Los términos "grano" y "grano" se usan intercambiamente en la presente.

20

25

Por el término "mosto" se propone un extracto líquido de malta y/o grano de cereal y adjuntos opcionalmente adicionales. El mosto se obtiene en general por maceración, opcionalmente seguido por "rociado", en un proceso para extraer los azúcares residuales y otros compuestos de los granos agotados después de la maceración con agua caliente. El rociado se conduce habitualmente en una cuba de filtrado, un filtro de maceración, u otro aparato para permitir la separación del agua extraída de los granos agotados. El mosto obtenido después de la maceración es en general referido como "primer mosto", mientras que el mosto obtenido después del rociado es en general referido como el "segundo mosto". Si no se especifica, el término mosto puede ser el primer mosto, segundo mosto, o una combinación de ambos. Durante la producción de cerveza convencional, el mosto se hierve junto con los lúpulos. El mosto sin lúpulos también puede ser referido como "mosto dulce", y mientras que el mosto hervido con lúpulo puede ser referido como "mosto hervido" o simplemente como mosto.

30

35

El término "extracto acuoso" como se usa en la presente se refiere a cuál extracto acuoso de malta y/o granos de cereal. De esta manera, ejemplos no limitantes de los mismos puede ser el mosto con una cantidad dada de azúcares fermentables.

40

El término "extracto acuoso fermentado" como se usa en la presente se refiere a cualquier extracto acuoso incubado con un microorganismo, tal como una cepa de levadura, donde la fermentación de azúcar se ha completado. La fermentación de azúcar se considera terminada en el punto en el tiempo durante la fermentación, cuando el nivel de azúcar, medido por °Plato, ya no se reduce significativamente. De manera preferente, la fermentación de azúcar se puede considerar finalizada, cuando el nivel de azúcar no ha cambiado por más de 0.5 °Plato durante un periodo de 24 horas, o cuando el nivel de azúcar no ha cambiado por más de 0.25 °Plato durante un periodo de 12 horas. Un extracto acuoso fermentado por ejemplo puede ser una malta fermentada y/o extracto basado en cereal.

45

50

El término "solución de prueba" como se usa en la presente se refiere a cualquiera de los líquidos o soluciones acuosas. La solución de prueba puede contener niveles predeterminados de compuestos específicos. De esta manera, ejemplos no limitantes de los mismos pueden ser mosto con un contenido de azúcar especificado.

55

El término "solución de prueba fermentada" como se usa en la presente se refiere a cualquier solución de prueba incubada con un microorganismo, tal como una cepa de levadura, donde se ha completado la fermentación de azúcar.

60

El término "°Plato" como se usa en la presente se refiere a la densidad medida en la escala de Plato. La escala de Plato es una escala de hidrómetro empíricamente derivada para medir la densidad de la cerveza o mosto

en términos de porcentaje de extracto en peso. La escala expresa la densidad como gramos de extracto por 100 g de mosto. Plato también por ejemplo se puede medir con un Alcoalyzer o un dispositivo portátil de Anton Paar.

5 El término "Extracto evidente" como se usa en la presente se refiere a la densidad de una cerveza o mosto dado medido en °Plato. Conforme la densidad se determina principalmente por el contenido de azúcar, el extracto evidente es una indicación del contenido de azúcar de la solución o extracto. El extracto evidente de una solución se puede medir por ejemplo por un Anton-PAAR portátil número de serie DM.

10 El término "Alcohol por volumen (ABV)" como se usa en la presente se refiere a la cantidad de alcohol (etanol) en un volumen dado de una bebida alcohólica (expresado como un porcentaje en volumen). Se define como el número de mililitros de alcohol puro presente en 100 ml de solución a 20°C. ABV se puede medir con un Alcoalyzer.

15 El término "RDF" o "grado real de fermentación" como se usa en la presente se refiere al grado al cual el azúcar en el mosto se ha fermentado en alcohol en la cerveza, también llamada atenuación. El RDF expresa el porcentaje de extracto que se fermentó. Un RDF entre 50 y 60% representa cervezas con mucho cuerpo con más de 40% de su extracto original dejado si fermentar, mientras que un RDF arriba de 80% representa cervezas altamente atenuadas con menos de 20% de su extracto original no fermentado. La sensación en boca se determina en gran medida por el porcentaje de RDF; cuando más alto es el porcentaje RDF, más ligera y seca será la cerveza.

25 El término "floculación" como se usa en la presente se refiere al proceso por el cual las partículas finas, tal como células de levadura, se agrupa conjuntamente en un floculo. El floculo entonces puede flotar a la parte superior del líquido (crema), se asienta al fondo del líquido (sedimentación), o se filtra fácilmente del líquido. Los especialistas en levadura y los productores de cerveza categorizan frecuentemente el comportamiento de la floculación de la levadura por ser "alta", "media", o "baja" 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 clara con menos levadura suspendida, haciendo más fácil la filtración. La floculación se puede incrementar por temperaturas más bajas, de esta manera para levaduras floculantes bajas puede ser necesario un paso de enfriamiento adicional después de que se completa la fermentación. Las levaduras de alta floculación por lo tanto tienen la posibilidad de tiempo de procesamiento reducido comparado con levaduras de baja floculación, puesto que no se necesita enfriamiento para lograr la cerveza más clara y fácilmente filtrada. La floculación por ejemplo se puede determinar al contar el número de células de levadura en solución después de la fermentación, por ejemplo, al contar el número de células de levadura en una muestra tomada de las  $\frac{3}{4}$  partes superiores del recipiente que comprende el extracto acuoso fermentado o la solución de prueba.

40 El término "fermentación" como se usa en la presente se refiere a la incubación de un extracto acuoso o una solución de prueba con un microorganismo, tal como una cepa de levadura.

45 El término "malta" como se usa en la presente se refiere a granos de cereal, que se han malteado. El término "malta verde" se refiere a granos de cereal germinados, que no se han sometido a un paso de secado en horno. En algunas realizaciones la malta verde es malta verde molido. El término "malta secada en horno" como se usa en la presente se refiere a granos de cereal germinados, que se han secado mediante secado en horno. En algunas realizaciones la malta secada en horno es malta secada en horno molida. En general, los granos de cereal se han germinado bajo condiciones ambientales controladas.

50 El término "fuente de carbono" como se usa en la presente se refiere a cualquier molécula orgánica, que pueda proporcionar energía a la levadura y proporcionar carbono para la biosíntesis celular. En particular, la fuente de carbono puede ser carbohidratos, y de manera más preferente, la fuente de carbono pueden ser monosacáridos, disacáridos, trisacárido, tetrasacáridos y/u oligosacáridos cortos. Las fuentes de carbono que se pueden fermentar por la levadura so frecuentemente denominadas azúcares fermentables, incluidas, pero no limitadas a glucosa, fructosa, maltosa, maltotriosa y sacarosa.

55 Los aminoácidos pueden ser denominados en la presente usando los códigos de una letra y tres letras IUPAC. Si no se indica de otra manera el término "aminoácidos" se refiere a los aminoácidos estándares.

60 El término "gen funcional" como se usa en la presente se refiere a un gen que, cuando se transfiere y se traduce, expresa una proteína, con al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 99%, tal como 100% de identidad de secuencia a la proteína codificada por el gen correspondiente de la cepa de tipo silvestre en donde el gen es endógeno. La proteína expresada por el gen funcional debe ser un homólogo funcional de la proteína codificada por el gen correspondiente de la cepa de tipo natural en donde el gen es endógeno, es decir debe tener el mismo tipo de actividad enzimática y la actividad debe estar en un nivel similar a la proteína codificada por el gen correspondiente de la cepa de tipo silvestre en donde el gen es endógeno. En particular, el término "gen funcional" no cubre genes que codifican productos de proteína truncados con poco o nada de actividad enzimática. De manera preferente el

término “gen” como se usa en la presente, se refiere a un gen funcional.

5 El término “número de copias funcionales” como se usa en la presente se refiere al número total de genes funcionales dentro de una cepa de levadura. “Número de copias funcionales” se usa intercambiamente con “número de copias activas” en la presente.

10 El término “homólogo funcional” como se usa en la presente indica un polipéptido que comparte al menos una función biológica con un polipéptido de referencia. En general el homólogo funcional también comparte una identidad de secuencia significativa con el polipéptido de referencia. De manera preferente un homólogo funcional de un polipéptido de referencia es un polipéptido, que tiene la misma función biológica como la proteína de referencia y que comparte un alto nivel de la secuencia con el polipéptido de referencia.

15 El término “promotor nativo” como se usa en la presente se refiere a un promotor de la secuencia de nucleótidos de la cual tiene al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90% tal como al menos 95”, tal como al menos 99%, tal como 100% de identidad de secuencia a aquella del promotor de la cepa de tipo silvestre en donde el gen es endógeno. Un gen expresado bajo su promotor nativo de esta manera se expresa usualmente en los niveles endógenos.

20 El término “identidad de secuencia” como se usa en la presente describe la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos, es decir, una secuencia candidato (por ejemplo, una secuencia mutante) y una secuencia de referencia (tal como una secuencia de tipo silvestre) basada en su alineación en pares. Para propósitos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mo/ Biol. 48: 443-453) como es implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277.), de manera preferente versión 5.0.0 o posterior (disponible en [https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)). Los parámetros usados son penalización abierta de hueco de 10, penalización de extensión de hueco de 0.5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de 30 BLOSUM62). La salida de “identidad más larga” etiquetada de Needle (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula como sigue:  $(\text{Residuos Idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de Alineación} - \text{Número Total de Gaps en Alineación})$ . El algoritmo de Needleman-Wunsch también se usa para determinar si un aminoácido dado en una secuencia diferente a la secuencia de referencia corresponde a una posición dada de la secuencia de referencia. Para propósitos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como se implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), de manera preferente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización abierta de hueco de 10, penalización de extensión de hueco de 0.5, y la matriz de sustitución DNAFULL (versión en EMBOSS de NCBI NUC4.4). La salida de “identidad más larga” etiquetada de Needle (obtenida usando la opción) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula como sigue:  $(\text{Desoxiribonucleótidos Idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de Alineación} - \text{Número Total de Huecos en Alineación})$ . La identidad de secuencia siempre se mide comparada con la secuencia de referencia de longitud completa, es decir proteínas truncadas sin huecos o coincidencias erróneas no se consideran 100% idénticas de secuencia a la secuencia de referencia.

45 El término “mutaciones” como se usa en la presente incluyen inserciones, deleciones, sustituciones, transversiones, y mutaciones puntuales en las regiones de codificación y no de codificación de un gen. Las mutaciones puntuales pueden referirse a cambios de un par de bases, y puede dar por resultado codones de paro prematuros, mutaciones por desplazamiento del marco de lectura, mutación de un sitio de empalme o sustituciones de aminoácidos. Un gen que comprende una mutación puede ser referida como un “gen mutante”. Si el gen mutante codifica un polipéptido con una secuencia diferente al tipo silvestre, el polipéptido puede ser referido como un “polipéptido mutante” y/o “proteína mutante”. Un polipéptido se puede recibir por portar una mutación, cuando comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de tipo silvestre.

55 El término “deleciones” como se usa en la presente puede ser una deleción del gen completo, o de solo una porción del gen, o una parte de un cromosoma.

60 El término “codón de paro” como se usa en la presente se refiere a un triplete de nucleótidos en el código genético, que dentro de ARNm da por resultado la terminación de la traducción. El término “codón de paro” como se usa en la presente también se refiere a un triplete de nucleótidos dentro de un gen que codifica el codón de paro en el ARNm. El codón de paro en el ADN tiene habitualmente una de las siguientes secuencias: TAG, TAA o TGA.

65 El término “crecimiento” como se usa en la presente en relación con la levadura, se refiere al proceso por el cual las células de levadura se multiplican. De esta manera, cuando las células de levadura crecen el número de células de levadura se incrementa. El número de células de levadura se puede determinar por cualquier método útil.

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

5 Cepa de levadura

La presente descripción se refiere a una cepa de levadura, tal como una cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus*, que produce sorprendentemente bajos niveles de diacetilo total y/o consume rápidamente diacetilo durante la fermentación a 18°C o menor, cuando se incuba en un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato.

Se usan diferentes tipos de levadura para la producción de cerveza, las más notables son *Saccharomyces pastorianus* y *Saccharomyces cerevisiae*. La cerveza lager se fermenta habitualmente usando levadura de la especie *Saccharomyces pastorianus*. De esta manera, la *Saccharomyces pastorianus* de acuerdo con la invención por ejemplo puede ser cualquier levadura útil para la producción de cerveza lager. En particular, la *Saccharomyces pastorianus* puede ser una cepa de levadura de fermentación de fondo. Se prefiere que la *Saccharomyces pastorianus* sea un híbrido entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*. También se prefiere que la *Saccharomyces pastorianus* sea capaz de utilizar maltosa y melibiosa. De esta manera, de manera preferente la *Saccharomyces pastorianus* es una cepa de levadura, que es un híbrido entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*. También se prefiere que la *Saccharomyces pastorianus* sea capaz de utilizar maltosa y melibiosa.

En un aspecto, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, y en donde la solución de prueba fermentada contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, de manera preferente como máximo 50 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores después de la incubación de la cepa de levadura en el extracto, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C.

De esta manera, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* de acuerdo con la invención es de manera preferente capaz de producir una solución de prueba fermentada, cuando se prueba en un método que comprende los pasos de:

a) proporcionar una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereales que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato,

b) incubar la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* con la solución de prueba en una temperatura de 18°C o menos, de manera preferente entre 12 y 18 °C, de manera más preferente a 16°C,

c) determinar el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores durante la incubación, y

d) determinar el nivel de diacetilo en el punto de tiempo más temprano,

en donde la solución de prueba contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, de manera preferente como máximo 50 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano.

En algunas realizaciones la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación con la cepa de levadura en una solución de prueba, en donde la solución de prueba puede ser cualquiera de las soluciones de pruebas descritas a continuación, de manera preferente la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereales que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, y en donde solución de prueba fermentada contiene un nivel máximo de diacetilo como se describe a continuación en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato, tal como no ha disminuido por más de 0.40 °Plato, tal como no ha disminuido por más de 0.30 °Plato, tal como no ha disminuido por más de 0.20 °Plato en las 24 horas anteriores después de la incubación con la cepa de levadura en la solución de prueba en donde la fermentación se presenta en una temperatura como se especifica a continuación. En particular, el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores.

El nivel máximo de diacetilo es de manera preferente como máximo 60 ppb, tal como como máximo 55 ppb de diacetilo, tal como como máximo 50 ppb de diacetilo, por ejemplo, como máximo 45 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de del °Plato mencionado en lo anterior. En particular, el nivel de diacetilo en el punto de tiempo más temprano puede ser como máximo 45 ppb.

Cuando se identifican las propiedades de la levadura, como se describe en lo anterior, la incubación se lleva a cabo de manera preferente en una temperatura de como máximo 18 °C, tal como en una temperatura de en el intervalo de 12°C a 18°C o en el intervalo de 14 a 16 °C. En particular, la incubación se puede llevar a cabo en una temperatura de aproximadamente 16°C.

5

En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato y en donde la solución de prueba fermentada contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, de manera preferente como máximo 50 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.25 °Plato en las 12 horas anteriores después de la incubación de la cepa de levadura en el extracto en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C.

10

De esta manera, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* de acuerdo con la invención es de manera preferente capaz de producir una solución de prueba fermentada, cuando se prueba en un método que comprende los pasos de:

15

a) proporcionar una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereales que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato,

20

b) incubar la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* con la solución de prueba en una temperatura de como máximo 18°C,

25

c) determinar el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.25 °Plato en las 12 horas anteriores durante la incubación, y

d) determinar el nivel de diacetilo en el punto de tiempo más temprano,

30

en donde la solución de prueba contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, de manera preferente como máximo 50 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano.

En algunas realizaciones la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba, en donde la solución de prueba puede ser cualquiera de las soluciones de prueba como se describe a continuación, y en donde solución de prueba fermentada contiene un nivel máximo de diacetilo como se describe a continuación en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.25 °Plato, tal como no ha disminuido por más de 0.20 °Plato, tal como no ha disminuido por más de 0.15 °Plato, tal como no ha disminuido por más de 0.10 °Plato en las 24 horas anteriores después de la incubación de la cepa de levadura en el extracto en donde la fermentación se presenta en una temperatura como se especifica a continuación. En particular, el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.25 °Plato en las 12 horas anteriores.

35

40

Este nivel máximo de diacetilo es de manera preferente como máximo 60 ppb de diacetilo, tal como como máximo 55 ppb de diacetilo, tal como como máximo 50 ppb de diacetilo, por ejemplo, como máximo 45 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más del °Plato mencionado en lo anterior. En particular, el nivel máximo de diacetilo en el punto de tiempo más temprano puede ser 50 ppb.

45

La incubación mencionada en lo anterior se lleva a cabo de manera preferente en una temperatura de como máximo 18°C, tal como en una temperatura de en el intervalo de 12°C a 18°C. En particular, la incubación se puede llevar a cabo en una temperatura de aproximadamente 16°C.

50

En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba contiene como máximo 120 ppb de diacetilo, por ejemplo como máximo 60 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.50 °Plato en las siguientes 24 horas, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C.

55

60

De esta manera, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* de acuerdo con la invención es de manera preferente capaz de producir una solución de prueba fermentada, cuando se prueba en un método que comprende los pasos de:

65

a) proporcionar una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereales que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato,

b) incubar la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* con la solución de prueba en una temperatura de como máximo 18°,

5 c) determinar el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.50 °Plato en las siguientes 24 horas durante la incubación, y

d) determinar el nivel de diacetilo en el punto de tiempo más temprano,

10 en donde la solución de prueba contiene como máximo 120 ppb de diacetilo, por ejemplo, como máximo 60 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano.

15 En algunas realizaciones la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba, en donde la solución de prueba puede ser cualquiera de las soluciones de prueba como se describe a continuación, y en donde solución de prueba fermentada contiene un nivel máximo de diacetilo como se describe a continuación en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.50 °Plato, tal como no disminuye por más de 0.40 °Plato, tal como no disminuye por más de 0.30 °Plato, tal como no disminuye por más de 0.20 °Plato en las siguientes 24 horas después de la incubación de la cepa de levadura en el extracto, en donde la fermentación se presenta en una temperatura como se especifica a continuación. En particular, el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.50 °Plato en las siguientes 24 horas.

25 El nivel máximo de diacetilo es de manera preferente como máximo 120 ppb de diacetilo, tal como como máximo 115 ppb de diacetilo, por ejemplo, como máximo 110 ppb de diacetilo, tal como como máximo 60 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de del °Plato mencionado en lo anterior. En particular, el nivel máximo de diacetilo en el punto de tiempo más temprano puede ser 110 ppb. En particular, el nivel máximo de diacetilo en el punto de tiempo más temprano puede ser 55 ppb.

30 La incubación mencionada en lo anterior se lleva a cabo de manera preferente en una temperatura de como máximo 18°C, tal como en una temperatura de en el intervalo de 12 °C a 18°C. En particular, la incubación se puede llevar a cabo en una temperatura de aproximadamente 16°C.

35 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba contiene como máximo 120 ppb de diacetilo, tal como como máximo 65 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.25 °Plato en las siguientes 12 horas, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C.

45 De esta manera, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* de acuerdo con la invención es de manera preferente capaz de producir una solución de prueba fermentada, cuando se prueba en un método que comprende los pasos de:

a) proporcionar una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereales que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato,

50 b) incubar la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* con la solución de prueba en una temperatura de como máximo 18°,

c) determinar el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.25 °Plato en las siguientes 12 horas durante la incubación, y

55

d) determinar el nivel de diacetilo en el punto de tiempo más temprano,

en donde la solución de prueba contiene como máximo 120 ppb de diacetilo, tal como como máximo 65 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano.

60

65 En algunas realizaciones la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba, en donde la solución de prueba puede ser cualquiera de las soluciones de prueba como se describe a continuación, y en donde solución de prueba fermentada contiene un nivel máximo de diacetilo como se describe a continuación en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.25 °Plato, tal como no disminuye por más de 0.20 °Plato, tal como no

disminuye por más de 0.15 °Plato, tal como no disminuye por más de 0.10 °Plato en las siguientes 12 horas, en donde la fermentación se presenta en una temperatura como se especifica a continuación. En particular, el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.25 °Plato en las siguientes 12 horas.

5 El nivel máximo de diacetilo es de manera preferente como máximo 120 ppb de diacetilo, tal como como máximo 115 ppb de diacetilo, tal como como máximo 110 ppb de diacetilo, por ejemplo, como máximo 105 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de del °Plato mencionado en lo anterior. En particular, el nivel máximo de diacetilo en el punto de tiempo más temprano puede ser 110 ppb, tal como como máximo 55 ppb de diacetilo.

10 La incubación mencionada en lo anterior se lleva a cabo de manera preferente en una temperatura de como máximo 18 °C, tal como en una temperatura de en el intervalo de 12°C a 18°C. En particular, la incubación se puede llevar a cabo en una temperatura de aproximadamente 16°C.

15 En algunas realizaciones la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, y en donde la solución de prueba contiene como máximo 265 ppb de diacetilo en cualquier punto de tiempo dentro de 5 días después del inicio de la incubación con la levadura, en donde la incubación se lleva a cabo en una temperatura de como máximo 18°C y en donde en el intervalo de 7 a 15 millones de células de levadura viables/ml se agregan a la solución de prueba.

20 En algunas realizaciones la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, y en donde la solución de prueba fermentada contiene como máximo 50 ppb de diacetilo después de la incubación con la cepa de levadura como máximo 6 días. En particular, la solución de prueba fermentada puede contener como máximo 50 ppb de diacetilo después de la incubación con la cepa de levadura como máximo 5 días. En particular, la solución de prueba fermentada puede contener como máximo 50 ppb de diacetilo después de la incubación con la cepa de levadura como máximo 4 días.

25 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, y en donde la solución de prueba contiene como máximo 50 ppb de diacetilo después de la incubación con la solución de prueba como máximo 5 días en una temperatura de como máximo 16°C. En particular, la solución de prueba fermentada puede contener como máximo 50 ppb de diacetilo después de la incubación con la cepa de levadura como máximo 4 días en una temperatura de como máximo 16°C.

30 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, y en donde la cepa de levadura es capaz de generar al menos 4.0 ml/L de etanol por °Plato, cuando la cepa de levadura se incuba en la solución de prueba.

35 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, y en donde la cepa de levadura es capaz de generar al menos 4.0 ml/L de etanol por °Plato, cuando la cepa de levadura se incuba en la solución de prueba durante el intervalo de 4 a 6 días. En particular, la cepa de levadura se puede incubar en la solución de prueba durante aproximadamente 4 días.

En una realización muy preferida la cepa de levadura es una cepa de levadura capaz de:

40 - producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba fermentada contiene como máximo 60 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores;

45 - producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución fermentada contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, de manera preferente como máximo 50 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.25 °Plato en las 12 horas anteriores;

5 - producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba fermentada contiene como máximo 120 ppb de diacetilo, tal como como máximo 60 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.50 °Plato en las siguientes 24 horas; y

10 - producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba fermentada contiene como máximo 120 ppb de diacetilo, tal como como máximo 60 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.25 °Plato en las siguientes 12 horas;

en donde la fermentación se presenta como se describe en el ejemplo 6.

15 En algunas realizaciones, la cepa de levadura tiene alta floculación. La floculación por ejemplo se puede determinar cómo células en suspensión después de la fermentación. "Células en suspensión" se determina en general al contar las células de levadura en una muestra tomada del  $\frac{3}{4}$ , superior por ejemplo del  $\frac{2}{3}$  superior, tal como de la mitad superior del recipiente que comprende la solución de prueba fermentada. Si la fermentación se lleva a cabo en un tanque cilíndrico cónico, la muestra se toma de manera preferente arriba del cono. Un  
20 bajo número de células en solución después de la fermentación es indicativo de alta floculación.

25 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, y en donde la solución de prueba contiene como máximo 10 millones de células por mililitro, tal como como máximo 9.5 millones de células por mililitro, tal como como máximo 9.0 millones de células por mililitro, tal como como máximo 8.5 millones de células por mililitro, tal como como máximo 8.0 millones de células por mililitro en solución, en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores.

30 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* es capaz de crecer en un medio con melibiosa como la única fuente de carbono.

35 En realizaciones preferidas, la cepa de levadura se describe en la presente como un organismo no de GMO. De esta manera, en realizaciones preferidas, la cepa de levadura no se ha sometido a un paso de modificación genética.

#### Solución de prueba

40 En algunas realizaciones, la solución de prueba es un mosto que tiene un extracto evidente de aproximadamente 16 °Plato. En algunas realizaciones, la solución de prueba comprende menos 40 g/kg de maltosa.

45 La solución de prueba es en general un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato. De esta manera la solución de prueba en particular puede ser mosto. La solución de prueba puede tener de manera preferente un extracto evidente en el intervalo de 12 a 18 °Plato, y de manera más preferente un extracto evidente de aproximadamente 16 °Plato. La solución de prueba puede comprender adicionalmente en el intervalo de puede comprender además en el intervalo de 0.20 mg/L a 0.40 mg/L de zinc y el pH se puede ajustar en el intervalo de 4.0 a 6.0.

50 Un ejemplo de una solución de prueba comprende glucosa en el intervalo de 12-25g/L, maltosa en el intervalo de 60-80g/L, maltotriosa en el intervalo de 15-20g/L, zinc en el intervalo de 0.20 mg/L a 0.40 mg/L, amino nitrógeno libre (FAN) en el intervalo de 110-250 mg/L y relación de Valina/FAN de 0.6 a 0.8.

55 En algunas realizaciones la solución de prueba se prepara de malta pilsner, potencialmente con la adición de adjunto de cebada.

#### Genotipo

60 Las cepas de levadura de *Saccharomyces pastorianus* de acuerdo con la invención tienen el fenotipo que son capaces de producir una solución de prueba fermentada con nivel de acetilo reducido como se describe en la sección con el título "cepa de levadura" anterior.

65 Además de la característica fenotípica, las cepas de levadura de acuerdo con la invención pueden tener de manera preferente uno o más de los genotipos descritos en a continuación en la presente.

## ES 2 991 537 T3

ILV2, ILV6, ILV5, ILV3, BAT1 y BAT2 se implican en sintetizar L-valina de piruvato. La producción espontánea de diacetilo puede presentarse en este proceso.

5 Una subunidad pequeña de acetolactato sintasa (ILV6) y subunidad catalítica de acetolactato (ILV2) convierten el piruvato a alfa-acetolactato.

La cetol-ácido reductoisomerasa (ILV5) cataliza la conversión del alfa-acetolactato a 2,3-hidroxi-isovalerato.

10 La dihidroxi-ácido deshidratasa (ILV3) cataliza la conversión de 2,3 hidroxi-isovalerato a 2-ceto isolaterato.

La aminotransferasa de aminoácido de cadena ramificada (BAT1) cataliza la conversión de 2-keto isolaterato a L-valina en la mitocondria y el aminoácido de cadena ramificada aminotransferasa (BAT2) cataliza la reacción en el citosol.

15 Ubicación del cromosoma:

Gen	Cromosoma	Inicio-final
<b>ILV2</b>	13	484084..486147
<b>ILV6</b>	3	104619..105548
<b>ILV5</b>	12	838066..839253
<b>ILV3</b>	10	464451..466208
<b>BAT1</b>	8	517532..518713
<b>BAT2</b>	10	705744..706874

Similitud de proteína *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* (secuencias de proteínas)

	% de identidad de secuencia	Longitud de secuencia aa
<b>ILV2</b>	93.17	688
<b>ILV6</b>	95.81	310
<b>ILV5</b>	96.97	396
<b>ILV3</b>	96.76	586
<b>BAT1</b>	94.42	394
<b>BAT2</b>	90.45	377

20

Se entiende que cuando una célula de levadura "tiene" un número exacto de genes, la célula no contiene más genes que el número indicado. Similarmente, si una célula de levadura "tiene" en el intervalo de XX a YY genes, la célula de levadura no contiene más de YY genes.

25

En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene como máximo cinco genes que codifican para la ILV2 funcional, por ejemplo como máximo 4 genes que codifican para la ILV2 funcional, tal como en el intervalo de 1 a 5 genes que codifican para la ILV2 funcional, tal como en el intervalo de 1 a 4 genes que codifican para la ILV2 funcional, en donde cada gen que codifica para ILV2 codifica para ScILV2 de SEQ ID NO: 32 o un homólogo funcional que comparte al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% de identidad de secuencia con la misma, o codifica SeILV2 de SEQ ID NO: 38 o un homólogo que comparte al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% de identidad de secuencia con la misma. Se prefiere que la cepa de levadura de la invención tenga como máximo dos genes funcionales que codifican para ILV2, por ejemplo, la cepa de levadura puede tener el intervalo de 1 a 2, tal como exactamente 2 genes funcionales que codifican para ILV2. De manera preferente, los genes funcionales codifican ScILV2 de SEQ ID NO: 32 o SeILV2 de SEQ ID NO: 38 o un homólogo funcional de cualquiera de los mencionados que compartan al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% de identidad de secuencia con la misma. En una realización los genes funcionales codifican ScILV2, de manera preferente ScILV de SEQ ID NO:32. En una realización los genes funcionales codifican para ILV2 de ZDA1, ZDA2 y/o ZDA3, en donde las secuencias de ILV2 de ZDA1, ZDA2 y/o ZDA3 se proporcionan en la Figura 4.

40

45

En algunas realizaciones, la cepa de levadura tiene como máximo dos genes funcionales que codifican para ILV2, en donde cada gen que codifica para ILV2 codifica para ScILV2 de SEQ ID NO: 32 o SeILV2 de SEQ ID NO: 38, o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con la misma; al menos cuatro genes funcionales que codifican para ILV3, tal como al menos cinco genes funcionales que codifican para ILV3, tal como al menos seis genes funcionales que codifican para ILV3, en donde cada gen que codifica para ILV3 codifica para ScILV3 de SEQ ID NO: 35 o SeILV3 de SEQ ID NO: 41, o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con la misma; y al menos tres genes funcionales que codifican para ILV5, tal como al menos cuatro genes funcionales que codifican para ILV5, tal como al menos cinco genes funcionales que codifican para ILV5, en donde cada gen que codifica para ILV5

50

codifica para ScILV5 de SEQ ID NO: 34 o SeILV5 de SEQ ID NO: 40, o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con la misma.

5 En algunas realizaciones, la cepa de levadura tiene como máximo dos genes funcionales que codifican para ILV2, en donde cada gen que codifica para ILV2 codifica para ScILV2 de SEQ ID NO: 32 o SeILV2 de SEQ ID NO: 38 o un homólogo funcional de cualquiera de los mencionados en lo anterior que compartan al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% de identidad de secuencia con la misma; y en el intervalo de 5 a 9 genes funcionales que codifican para ILV3, tal como en el intervalo de 5 a 7, tal como 6 genes funcionales que codifican para ILV3, en donde cada gen que  
10 codifica para ILV3 codifica para ScILV3 de SEQ ID NO: 35 o SeILV3 de SEQ ID NO: 41 o un homólogo funcional de cualquiera de los mencionados en lo anterior que compartan al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% de identidad de secuencia con la misma; y en el intervalo de 4 a 8 genes funcionales que codifican para ILV5, tal como en el intervalo de 4 a 6, tal como 5 genes funcionales que codifican para ILV5, en donde cada gen que codifica para ILV5 codifica para ScILV5 de SEQ ID NO: 34 o SeILV5 de SEQ ID NO: 40 o un homólogo funcional de cualquiera de los mencionados en lo anterior que compartan al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% de identidad de secuencia con la misma.

20 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene como máximo cuatro genes que codifican para ILV6 funcional, por ejemplo en el intervalo de dos a cuatro genes que codifican para ILV6 funcional, en donde cada gen que codifica para ILV6 codifica para ScILV6 de SEQ ID NO: 33 o un homólogo funcional que comparta al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% de identidad de secuencia con el mismo, o codifica SeILV6 de SEQ ID NO: 39 o un homólogo funcional que comparta al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% de identidad de secuencia con el mismo.

30 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene al menos dos genes que codifican para ILV5 funcional, tal como al menos cuatro genes que codifican para ILV5 funcional, tal como al menos cinco genes que codifican para ILV5 funcional, en donde cada gen que codifica para ILV5 codifica para ScILV5 de SEQ ID NO: 34 o un homólogo funcional que comparta 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 el mismo, o codifica SeILV5 de SEQ ID NO: 40 o un homólogo funcional que comparta al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% hasta 99% de identidad de secuencia con el mismo. En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene como máximo 20 genes, tal como máximo 15 genes, tal como máximo 10 genes alélicos que codifican para ILV5 funcional, en donde el gen que codifica para ILV5 funcional puede ser cualquiera de los mencionados en lo anterior. En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene en el intervalo de 5 a 20 genes alélicos, tal como 5 a 15 genes alélicos, tal como 5 a 10 genes que codifican para ILV5 funcional, en donde el gen que codifica para ILV5 funcional puede ser cualquiera de los  
40 mencionados en lo anterior.

45 En una realización, la cepa de levadura tiene en el intervalo de 4 a 8 genes funcionales que codifican para ILV5, tal como en el intervalo de 4 a 6, tal como 5 genes funcionales que codifican para ILV5, en donde cada gen que codifica para ILV5 codifica para ScILV5 de SEQ ID NO: 34 o SeILV5 de SEQ ID NO: 40 o un homólogo funcional de cualquiera de los mencionados en lo anterior que compartan al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% de identidad de secuencia con el mismo. En una realización, la cepa de levadura tiene en el intervalo de 4 a 8 genes funcionales que codifican para ILV5, tal como en el intervalo de 4 a 6, tal como 5 genes funcionales que codifican para ILV5, en donde cada gen codifica ILV5 de ZDA1, ZDA2 y/ o ZDA3, en donde las secuencias de ILV5 de ZDA1, ZDA2 y/o ZDA3 se dan en la figura 7.

55 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene al menos tres genes que codifican para ILV3 funcional, tal como al menos cuatro genes que codifican para ILV3 funcional, por ejemplo como al menos seis genes que codifican para ILV3 funcional, en donde cada gen que codifica para ILV3 funcional codifica para ScILV3 de SEQ ID NO: 35 o un homólogo funcional que comparta al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% hasta 99% de identidad de secuencia adjunta, o codifica SeILV3 de SEQ ID NO: 41 o un homólogo que comparta al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% hasta 99% de identidad de secuencia adjunto. En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene como máximo 20 genes alélicos, tal como máximo 15 genes alélicos, tal como máximo 10 genes alélicos que codifican para ILV3, en donde cada gen que codifica para ILV3 funcional puede ser cualquiera de los mencionados en lo anterior. En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene en el intervalo de 5 a 20 genes alélicos, tal como 5 a 15 genes alélicos, tal como 5 a 10 genes que codifican para ILV3 funcional, en donde el gen que codifica para ILV3 funcional puede ser cualquiera de los  
60 mencionados en lo anterior.

5 En una realización la levadura de la invención tiene en el intervalo de 5 a 9 genes funcionales que codifican para ILV3, tal como en el intervalo de 5 a 7, tal como 6 genes funcionales que codifican para ILV3, en donde cada gen que codifica para ILV3 codifica para ScILV3 de SEQ ID NO: 35 o SeILV3 de SEQ ID NO: 41 o un homólogo funcional de cualquiera de los mencionados en lo anterior que compartan al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% de identidad de secuencia con el mismo. En una realización la levadura de la invención tiene en el intervalo de 5 a 9 genes funcionales que codifican para ILV3, tal como en el intervalo de 5 a 7, tal como 6 genes funcionales que codifican para ILV3, en donde cada gen codifica ILV3 de ZDA1, ZDA2 y/o ZDA3, en donde las secuencias de ILV3 de ZDA1, ZDA2 y/o ZDA3 se dan en la figura 6.

10 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene al menos tres genes que codifican para BAT1 funcional, tal como al menos cuatro genes que codifican para BAT1 funcional, por ejemplo al menos cinco genes que codifican para BAT1 funcional, en donde cada gen que codifica para BAT1 funcional codifica ScBAT1 de SEQ ID NO: 36 o un homólogo funcional que comparta al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% hasta 99% de identidad de secuencia con el mismo, o codifica para SeBAT1 de SEQ ID NO: 42 o un homólogo funcional que comparta al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% hasta 99% de identidad de secuencia con el mismo. En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene como máximo 20 genes, tal como máximo 15 genes, tal como máximo 10 genes que codifican para BAT1, en donde cada gen que codifica para BAT1 puede ser cualquiera de los mencionados en lo anterior. En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene en el intervalo de 5 a 20 genes alélicos, tal como 5 a 15 genes alélicos, tal como 5 a 10 genes alélicos que codifican para BAT1 funcional, en donde cada gen alelo que codifica para BAT1 funcional puede ser cualquiera de los mencionados en lo anterior.

25 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene al menos cuatro genes que codifican para BAT2 funcional, tal como al menos cinco genes que codifican para BAT2 funcional, por ejemplo al menos seis genes que codifican para BAT2 funcional, en donde cada gen que codifica para BAT2 funcional codifica ScBAT2 de SEQ ID NO: 37 o un homólogo funcional que comparta al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% hasta 99% de identidad de secuencia con el mismo, o codifica para SeBAT2 de SEQ ID NO: 43 o un homólogo funcional que comparta al menos 80%, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 98% hasta 99% de identidad de secuencia con el mismo. En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene como máximo 20 genes, tal como máximo 15 genes, tal como máximo 10 genes que codifican para BAT2 funcional, en donde el gen que codifica para BAT2 funcional puede ser cualquiera de los mencionados en lo anterior. En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* tiene en el intervalo de 5 a 20 genes, tal como 5 a 15 genes, tal como 5 a 10 genes que codifican para BAT2 funcional, en donde cada gen que codifica para BAT2 funcional puede ser cualquiera de los mencionados en lo anterior.

40 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* porta una mutación en o una delección de uno o más genes *ILV2*.

45 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* porta una mutación por desplazamiento del marco de lectura en uno o más genes *ILV2*.

En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* porta una mutación que da por resultado menos o nada de expresión de uno o más genes *ILV2*.

50 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* porta una mutación en o una delección de uno o más genes *ILV6*.

55 En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* porta una mutación por desplazamiento del marco de lectura en uno o más genes *ILV6*.

En algunas realizaciones, la cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* porta una mutación que da por resultado menos o nada de expresión de uno o más genes *ILV6*.

60 En algunas realizaciones de la presente invención, la suma de los genes que codifican para ILV2 funcional e ILV6 funcional es menor que la suma de los genes que codifican para ILV5 funcional e ILV3 funcional, en donde las ILV2, ILV6, ILV3 e ILV5 funcionales pueden ser cualquiera de las mencionadas en lo anterior. En algunas realizaciones de la presente invención, la suma de los genes que codifican para ILV2 funcional es menor que la suma de los genes que codifican para ILV5 funcional e ILV3 funcional, en donde las ILV2, ILV5 e ILV3 funcionales pueden ser cualquiera de las mencionadas en lo anterior. En una realización, la suma de los genes que codifican para ILV2 funcional e ILV6 funcional es menor que la suma de los genes que codifican para ILV5 funcional, ILV3 funcional, BAT1 funcional y BAT2 funcional, en donde las ILV2, ILV6, ILV3, ILV5 funcionales;

BAT1 y BAT2 pueden ser cualquiera de las mencionadas en lo anterior. En otras palabras, en algunas realizaciones la suma de los genes que codifican para ILV5 e ILV3 es más alta que la suma de los genes que codifican para ILV2 e ILV6. De esta manera, en algunas realizaciones, la suma de los genes que codifican para ILV5 e ILV3 es más alta que la suma de los genes que codifican para ILV2, ILV6, BAT1 y BAT2.

5

En algunas realizaciones, la relación génica de los genes *ILV5* e *ILV3* vs. genes *ILV2* es al menos 1, tal como al menos 1.5, tal como al menos 2, tal como al menos 2.5, tal como al menos 3, en donde los genes *ILV2*, *ILV5* e *ILV3* codifican cualquiera de las *ILV2*, *ILV5* e *ILV3* funcionales mencionadas en lo anterior, respectivamente.

10

En algunas realizaciones, la relación génica de los genes *ILV5* e *ILV3* vs. *ILV2* e *ILV6* es al menos 1, tal como al menos 1.2, tal como al menos 1.4, tal como al menos 1.6, tal como al menos 1.8 o tal como al menos 2, en donde los genes *ILV2*, *ILV6*, *ILV5* e *ILV3* codifican cualquiera de las *ILV2*, *ILV6*, *ILV5* e *ILV3* funcionales mencionadas en lo anterior, respectivamente.

15

En algunas realizaciones, la relación génica de *ILV5*, *ILV3*, *BAT1* y *BAT2* vs. *ILV2* es al menos 1, tal como al menos 1.5, tal como al menos 2, tal como al menos 2.5, tal como al menos 3, tal como al menos 4, tal como al menos 5, tal como al menos 6, en donde los genes *ILV2*, *ILV5*, *ILV3*, *BAT1* y *BAT2* codifican cualquiera de los *ILV2*, *ILV5*, *ILV3*, *BAT1* y *BAT2* funcionales mencionados en lo anterior, respectivamente.

20

En algunas realizaciones, la relación génica de *ILV5*, *ILV3*, *BAT1* y *BAT2* vs. *ILV2* e *ILV6* es al menos 1, tal como al menos 1.5, tal como al menos 2, tal como al menos 2.5, tal como al menos 3, tal como al menos 4, en donde los genes *ILV2*, *ILV6*, *ILV5*, *ILV3*, *BAT1* y *BAT2* codifican cualquiera de las *ILV2*, *ILV6*, *ILV5*, *ILV3*, *BAT1* y *BAT2* funcionales mencionadas en lo anterior, respectivamente.

25

Extracto acuoso fermentado basado en malta y/o cereal y métodos de producción de este

La invención proporciona cepas de levadura de *Saccharomyces pastorianus* descritos en la sección del título "cepa de levadura" anterior, así como métodos para preparar extracto acuoso fermentado basado de malta y/o cereal, usando las cepas de levadura.

30

Es un aspecto de la invención proporcionar métodos para producir un extracto acuoso fermentado, el método comprende los pasos de:

35

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

ii) proporcionar una cepa de levadura, en donde la cepa de levadura puede ser cualquiera de las cepas de levadura descritas en la presente en lo anterior en la sección "Cepa de levadura"; y

40

iii) fermentar el extracto acuoso proporcionado en el paso i) con la cepa de levadura del paso ii),

obteniendo de esta manera un extracto acuoso fermentado.

45

El extracto acuoso, puede ser cualquier extracto acuoso de malta y/o granos de cereal. De esta manera, un ejemplo no limitante de los mismos es mosto. El extracto acuoso, por ejemplo, se puede preparar al preparar un extracto de malta mediante macerado y opcionalmente rociado como se describe en la presente en esta siguiente sección.

50

La malta son granos de cereal, tal como granos de cebada, que se han malteado. Por el término "maltear" se debe entender un proceso que implica maceración y germinación de los granos en un proceso que se lleva a cabo bajo condiciones ambientales controladas, opcionalmente seguido por un paso de secado. El paso de secado puede ser de manera preferente secado en horno de los granos germinados a temperaturas elevadas. La malta verde que no se ha sometido a calentamiento en horno también se puede usar, en particular malta obtenida por el proceso descrito en WO 2018/001882.

55

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

60

El macerado se puede llevar a cabo mediante cualquier método convencional conocido por la persona experta. Un ejemplo no limitante implica maceración a una temperatura en el intervalo de 10°C a 25°C con condiciones de secado y húmeda alternas. La germinación se puede llevar a cabo por cualquier método convencional conocido por la persona experta. Un ejemplo no limitante implica germinación en una temperatura en el intervalo de 10 a 25°C, opcionalmente con cambio de temperatura en el intervalo de 1 a 4 h. La maceración y germinación también se pueden llevar a cabo en un método combinado, por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2018/001882.

65

5 El secado en horno se puede llevar a cabo en temperaturas convencionales, tal como al menos 75 °C, por ejemplo, en el intervalo de 80 a 90 °C, tal como en el intervalo de 80 a 85 °C. De esta manera, la malta, por ejemplo, se puede producir por cualquiera de los métodos descritos por Briggs et al. (1981) y por Hough et al. (1982). Sin embargo, cualquier otro método adecuado para producir malta también se puede usar con la presente invención, tal como los métodos para la producción de maltas de especialidad, incluidos, pero no limitados a, métodos para tostar la malta.

10 La malta se puede procesar posteriormente, por ejemplo, mediante molienda. La molienda se puede llevar a cabo en estado seco, es decir la malta se muele mientras que está seca o en estado húmedo si se usa la malta verde.

15 La malta, por ejemplo, la malta molida, se puede triturar para preparar un extracto acuoso de la malta. El líquido de partida para preparar la bebida puede ser un extracto acuoso de malta, por ejemplo, un extracto acuoso de malta preparado por trituración.

20 De esta manera, el método para preparar un extracto acuoso fermentado basado en malta y/o cereal de acuerdo con la invención puede comprender un paso de producir un extracto acuoso, tal como mosto, al triturarla malta y opcionalmente adjuntos adicionales. El paso de trituración también puede comprender opcionalmente rociado y, por consiguiente, el paso de trituración puede ser un paso de trituración que incluye un paso de rociado o un paso de trituración que excluye un paso de rociado.

25 En general, la producción del extracto acuoso se inicia por la molienda de la malta y/o los granos. Si se son necesarios adjuntos adicionales, estos también se pueden moler dependiendo de su naturaleza. Si el adjunto es un cereal, por ejemplo, se puede moler, mientras que los jarabes, azúcares y similar generalmente no se molerán. La molienda facilitará el acceso de agua a las partículas del grano en la fase de trituración. Durante la trituración, se puede continuar la despolimerización enzimática de los sustratos iniciada durante el malteado.

30 En general, el extracto acuoso se prepara al combinar e incubar malta molida y agua, es decir en un proceso de trituración. Durante la trituración, la composición de malta/líquido se puede complementar con composiciones de adjuntos ricos en carbohidratos adicionales, por ejemplo, cebada molida, maíz, o adjuntos de arroz. Los adjuntos de cereal no malteados contienen usualmente poco o nada de enzimas activas, haciéndolo importante para complementarlo con malta o enzimas exógenas para proporcionar enzimas  
35 necesarias para la despolimerización de polisacáridos, etc. Durante el triturado, la malta molida y/o los granos molidos y, opcionalmente adjuntos adicionales se incuban con una fracción líquida, tal como agua. La temperatura de incubación es en general ya sea constante mantenida (trituration isotérmica) o se incrementa gradualmente, por ejemplo, se incrementa en una manera secuencial. En cualquier caso, las sustancias solubles en la malta/grano/adjuntos se liberan en la fracción líquida. Una filtración subsecuente confiere  
40 separación del extracto acuoso y partículas sólidas residuales, el último también puede indicar "grano agotado". El extracto acuoso obtenido de esta manera también se puede indicar "primer mosto". El líquido adicional, tal como agua se puede agregar a los granos agotados durante un proceso también indicado rociado. Después del rociado y filtración, se puede obtener un "segundo mosto". Los mostos adicionales se pueden preparar al repetir el procedimiento. Ejemplos no limitantes de procedimientos adecuados para preparación de mosto se describe por Briggs et al. (1981) y Hough et al. (m1982).  
45

50 Como se menciona en lo anterior, el extracto acuoso también se puede preparar al triturar solo los granos no malteados. Los granos no malteados carecen o contienen solo una cantidad limitada de enzimas benéficas para la producción de mosto, tal como enzimas capaces de degradar las paredes celulares o las enzimas capaces de despolimerizar el almidón en azúcares. De esta manera, en las realizaciones de la invención donde hasta 80%, tal como 90% o tal como 100% de granos no malteados, tal como granos de cebada, se usan para trituración, se prefiere que una o más enzimas de preparación de cerveza externas, adecuadas se agreguen a la trituración. Las enzimas adecuadas pueden ser lipasas, enzimas degradadoras de almidón (por ejemplo, amilasas), glucanasas [de manera preferente (1-4)- y/o (1-3,1-4)-β-glucanasa], y/o xilanasas (tal como arabinoxilanasas), y/o proteasas, o mezclas enzimáticas que comprenden una o más de las enzimas  
55 mencionadas en lo anterior, por ejemplo, Cereflo, Ultraflo u Ondea Pro (Novozymes).

60 El extracto acuoso también se puede preparar usando una mezcla de granos malteados y no malteados, en cuyo caso una o más enzimas adecuadas se pueden agregar durante la preparación. Aun en las realizaciones, donde la malta se usa como enzimas también se puede agregar. Más específicamente, los granos se pueden usar juntamente con malta en cualquier combinación para trituración, con o sin enzimas de preparación de cerveza 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.

65 El extracto acuoso obtenido después de la trituración también puede ser referido como "mosto dulce". En métodos convencionales, el mosto dulce se hierve con o sin lúpulo, donde después puede ser referido como

mosto hervido.

5 El extracto acuoso se puede calentar o hervir antes de que se someta a la fermentación con la levadura de la invención. En un aspecto de la invención, los segundos y adicionales mostos se pueden combinar, y después se someten a calentamiento o hervido. El extracto acuoso se puede calentar o hervir por cualquier cantidad de tiempo adecuada, por ejemplo, en el intervalo de 60 min a 120 min.

10 El resultado del extracto acuoso fermentado basado en malta y/o cereal es altamente dependiente de la cantidad y tipo de azúcares fermentables presentes en el extracto acuoso de la malta y/o granos de cereal, así como de las características de la cepa de levadura usadas durante la fermentación.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, el extracto acuoso tiene un extracto evidente de al menos 12 °Plato, tal como al menos 15 °Plato, tal como en el intervalo de 5-15 °Plato, tal como en el intervalo de 10-20 °Plato, tal como en el intervalo de 15-25 °Plato.

En algunas realizaciones, el extracto acuoso se fermenta con la cepa de levadura durante como máximo 6 días, tal como durante como máximo 5 días, tal como durante como máximo 4 días, tal como durante como máximo 3 días.

20 Una ventaja adicional de las cepas de levadura de la presente invención puede ser que sean útiles para fermentación de mosto con bajos niveles de aminoácidos. De esta manera, en algunas realizaciones, el extracto acuoso comprende como máximo 3500 mg/L, tal como máximo 3000 mg/L, por ejemplo, como máximo 2500 mg/L de aminoácidos.

25 De esta manera, el extracto acuoso, por ejemplo, mosto, se puede preparar como se describe en lo anterior. El extracto acuoso fermentado basado en malta y/o cereal se puede preparar por fermentación del extracto acuoso con la cepa de levadura de acuerdo con la invención.

30 En algunas realizaciones preferidas, el extracto acuoso fermentado es una cerveza verde.

35 En términos generales, los extractos acuosos fermentados alcohólicos, tal como cerveza, se pueden preparar de granos malteados y/o no malteados. La malta, además del lúpulo y levadura, contribuye al sabor y color de la bebida, tal como cerveza. Adicionalmente, la malta funciona como una fuente de azúcar fermentable y enzimas. Las descripciones no limitadas de los ejemplos de los métodos adecuados para malteado y preparación de cerveza se pueden encontrar, por ejemplo, en las publicaciones por Briggs et al. (1981) y Hough et al. (1982). Numerosos, métodos regularmente actualizados para análisis de grano, malta y productos de cerveza son disponibles, por ejemplo, pero no limitados a, American Association of Cereal Chemists (1995), American Society of Brewing Chemists (1992), European Brewery Convention (1998), e Institute of Brewing (1997). Es reconocido que se emplean muchos procedimientos específicos para una cervecería dada, con las variaciones más significativas que se relacionan con las preferencias locales del consumidor. Cualquier método para producir cerveza se puede usar con la presente invención.

45 El primer paso para producir cerveza de mosto implica de manera preferente calentar el mosto como se describe en la presente en lo anterior, seguido por una fase subsecuente de enfriamiento de mosto y opcionalmente reposo en remolino.

50 Los métodos de la invención comprenden un paso para fermentar un extracto acuoso de malta y/o granos de cereal con la cepa de levadura de acuerdo con la invención. La fermentación puede ser una fermentación de un extracto acuoso no fermentado o un extracto acuoso fermentado que aún contenga azúcares fermentables para la levadura. De esta manera, en algunas realizaciones la fermentación se puede llevar a cabo esencialmente de manera inmediata después de finalización de la trituración o después del calentamiento del mosto.

55 La fermentación se puede llevar a cabo en los tanques de fermentación que contienen levadura de acuerdo con la invención, es decir, levadura que tiene una o más de las características descritas en la presente en lo anterior. Durante el proceso de fermentación que dura varios días, se desarrollan sustancias de sabor. Si la cepa de levadura no es capaz de convertir los compuestos específicos, estos aún estarán presentes después del paso de fermentación iii).

60 En algunas realizaciones, el paso de fermentación iii) se presenta en cualquiera de las temperaturas especificadas a continuación, en donde el extracto acuoso que ha incubado con cualquiera de los números de células de levadura como se describe a continuación, en donde el extracto acuoso fermentado contiene un nivel máximo de diacetilo como se describe a continuación, y donde la fermentación es 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  
65 fermentación es completa después de un máximo de 4 días.

En una realización específica la fermentación que usa una cepa de levadura de la invención es completa y el diacetilo está abajo de 60 ppb, tal como 50 ppb al menos 12 horas, tal como al menos 24 horas más temprano que una fermentación conducida con la cepa de levadura W-34/78 bajo las mismas condiciones.

5 La fermentación mencionada en lo anterior se lleva a cabo de manera preferente en una temperatura de como máximo 18°C, tal como en una temperatura en el intervalo de 12°C a 18°C. En particular, la fermentación se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente 16°C.

10 El nivel máximo de diacetilo es de manera preferente como máximo 60 ppb de diacetilo, tal como máximo 55 ppb de diacetilo, tal como máximo 50 ppb de diacetilo, por ejemplo, como máximo 45 ppb de diacetilo cuando la fermentación se completa. En particular, el nivel de diacetilo en la finalización de la fermentación es como máximo 60 ppb.

15 La fermentación mencionada en lo anterior se lleva a cabo de manera preferente al incubar el extracto acuoso con al menos 6 millones de células de levadura viables por mililitro, tal como al menos 10 millones de células de levaduras viables por mililitro, tal como al menos 14 millones de células de levadura viables por mililitro, tal como en el intervalo de 7-8 millones de células de levadura viables por mililitro, por ejemplo en el intervalo de 14-16 millones de células de levadura viables por mililitro. En particular, la fermentación se puede llevar a cabo al incubar el extracto acuoso con aproximadamente 15 millones de células de levadura por mililitro.

20 En algunas realizaciones, el extracto acuoso fermentado tiene un contenido de alcohol de al menos 4% de ABV, tal como al menos 5% de ABV, tal como al menos 6% de ABV, tal como al menos 7% de ABV.

25 En algunas realizaciones, el extracto acuoso fermentado contiene al menos 25 mg/L de propanol, tal como al menos 30 mg/L de propanol.

En algunas realizaciones, dicho extracto acuoso fermentado contiene como máximo 8 mg/L de isobutanol, tal como máximo 7 mg/L de isobutanol, tal como máximo 6 mg/L de isobutanol.

30 En algunas realizaciones, el extracto acuoso fermentado contiene una relación benéfica de propanol:isobutanol. En particular, la relación de propanol:isobutanol puede ser al menos 1.5, tal como al menos 2.0, tal como al menos 2.5, tal como al menos 3.0, tal como al menos 3.5, tal como al menos 4.0, tal como al menos 4.5, tal como al menos 5.0, tal como al menos 5.5, tal como al menos 6.0, tal como al menos 6.5.

35 En algunas realizaciones, un extracto acuoso fermentado obtenido con una levadura de la invención tiene un grado real de fermentación (RDF) que es al menos 1.5%, tal como 2% más bajo en el mismo % de ABV que una fermentación conducida con la cepa de levadura W-34/78 o la cepa de levadura, levadura Híbrida 7 bajo las mismas condiciones.

40 *Bebida basada en malta y/o cereal y métodos de producción de esta*

El extracto acuoso fermentado basado en malta y/o cereal descrito en la presente en lo anterior se puede procesar adicionalmente en una bebida.

45 Es un aspecto de la invención proporcionar métodos para producir una bebida basada en malta y/o cereal, el método comprende los pasos de:

50 i. preparar un extracto acuoso fermentado como se describe en la presente en lo anterior en la sección "Extracto acuoso fermentado basado en malta y/o cereal y métodos de producción de este", y

ii. procesar adicionalmente el extracto acuoso fermentado en una bebida.

55 En alguna realización de la presente invención, la bebida basada en malta y/o cereal se diluye con un líquido, tal como agua.

60 Opcionalmente, el agua se puede usar para diluir la bebida basada en malta y/o cereal y ajusta de esta manera, por ejemplo, el contenido de etanol. En una realización de la presente invención, las proporciones de la bebida basada en agua:malta y/o cereal puede estar en el intervalo de 0.1 a 5 partes de agua a 1 parte de bebida basada en malta y/o cereal.

65 El proceso adicional, por ejemplo, también puede incluir enfriado y/o filtración de la bebida basada en malta y/o cereal. También se pueden agregar aditivos. Adicionalmente, se puede agregar CO<sub>2</sub>. Finalmente, la bebida basada en malta y/o cereal, tal como cerveza, se puede pasteurizar y/o filtrar, antes de ser envasada (por ejemplo, embotellar o enlatar).

En realizaciones preferidas, la bebida es una cerveza.

En un aspecto de la presente invención, la bebida basada en malta y/o cereal, producida al fermentar el extracto acuoso con la cepa de levadura de acuerdo con la presente invención, tiene un sabor agradable.

5 El sabor de la bebida basada en malta y/o cereal producido por fermentación con las levaduras de acuerdo con la invención se puede analizar, por ejemplo, por un panel de especialistas para el sabor de cerveza. De manera preferente, el panel está entrenado en catar y describir los sabores de la cerveza, con enfoque especial en los aldehídos, sabor a papel, sabor añejo, ésteres, alcoholes superiores, ácidos grasos y componentes sulfurosos.

10 En general, el panel de sabor consistirá en el intervalo de 3 a 30 miembros, por ejemplo, en el intervalo de 5 a 15 miembros, de manera preferente en el intervalo de 8 a 12 miembros. El panel de sabor puede evaluar la presencia de varios sabores, tal como sabores desagradables a papel, oxidado, añejo y a pan, así como sabores de ésteres, alcoholes superiores, componentes de azufre y cuerpo de cerveza. El sabor genera de la  
15 cerveza se clasificará en general por el panel de sabor en varias características diferentes en una escala de 1 a 9, donde una clasificación promedio de más de 5 significa que la cerveza tiene un sabor aceptable.

La presente invención también proporciona bebidas basadas en malta y/o cereal, preparadas por los métodos descritos en lo anterior.

20 En algunas realizaciones, la bebida contiene al menos 25 mg/L de propanol, tal como al menos 30 mg/L de propanol.

25 En algunas realizaciones, la bebida contiene como máximo 8 mg/L de isobutanol, tal como máximo 6 mg/L de isobutanol.

30 En general, un extracto acuoso fermentado o bebida preparada usando las cepas de levadura de la invención tendrá una relación específica de propanol:isobutanol, por ejemplo, una relación similar a las relaciones mostradas en las Figuras 2A y 2B. De esta manera, si un extracto acuoso fermentado o una bebida tiene esta relación específica de propanol:isobutanol, es una indicación de que el extracto acuoso fermentado o una  
35 bebida se ha producido por fermentación con una cepa de levadura de la invención. En particular, la relación propanol:isobutanol puede ser al menos 1.5, tal como al menos 2.0, tal como al menos 2.5, tal como al menos 3.0, tal como al menos 3.5, tal como al menos 4.0, tal como al menos 4.5, tal como al menos 5.0, tal como al menos 5.1, tal como al menos 5.2, tal como al menos 5.3, tal como al menos 5.4, tal como al menos 5.5, tal como al menos 6.0, tal como al menos 6.5.

#### Puntos

La invención se puede definir adicionalmente por los siguientes puntos:

- 40 1. Un método para producir un extracto acuoso fermentado, el método comprende los pasos de:
- i) proporcionar un extracto acuoso de malta y/o cereal;
  - 45 ii) proporcionar una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces pastorianus*, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba fermentada contiene como máximo 60 ppb de diacetilo en el punto de  
50 tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C; y
  - iii) fermentar el extracto acuoso proporcionado en el paso i) con la cepa de levadura del paso ii), obteniendo de esta manera un extracto acuoso fermentado.
- 55 2. Una cepa de levadura que codifica dentro de su genoma para
- a. como máximo dos genes funcionales que codifican para ILV2, en donde cada gen que codifica para ILV2 codifica para ScILV2 de SEQ ID NO: 32 o SeILV2 de SEQ ID NO: 38, o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo; y
  - 60 b. al menos cinco genes funcionales, tal como al menos seis genes funcionales que codifican para ILV3, en donde cada gen que codifica para ILV3 codifica para ScILV3 de SEQ ID NO: 35 o SeILV3 de SEQ ID NO: 41, o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 65 3. Una cepa de levadura capaz de producir un extracto acuoso fermentado tras la incubación en un extracto

acuoso de malta y/o cereal, en donde el extracto acuoso fermentado contiene una relación propanol:isobutanol de al menos 2.0.

5 4. La cepa de levadura de acuerdo con los puntos 2 a 3, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba fermentada contiene como máximo 60 ppb total diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C.

10 5. El método o cepa de levadura de acuerdo con los puntos 1 ó 4, en donde el punto del tiempo es el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.40 °Plato, tal como 0.30 °Plato, tal como 0.20 °Plato en las 24 horas anteriores.

15 6. El método o cepa de levadura de acuerdo con los puntos 1 y 4-5, en donde la solución de prueba contiene como máximo 55 ppb de diacetilo, tal como como máximo 50 ppb de diacetilo, tal como como máximo 45 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano.

20 7. Un método para producir un extracto acuoso fermentado, el método comprende los pasos de:

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

25 ii) proporcionar una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces pastorianus*, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.25 °Plato en las 12 horas anteriores, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C; y

30 iii) fermentar el extracto acuoso proporcionado en el paso i) con la cepa de levadura, obteniendo de esta manera un extracto acuoso fermentado.

35 8. La cepa de levadura de acuerdo con los puntos 2 a 6, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba contiene como máximo 60 ppb total diacetilo, en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.25 °Plato en las 12 horas anteriores, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C.

40 9. El método o cepa de levadura de acuerdo con los puntos 7 a 8, en donde el punto del tiempo es el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.20 °Plato, tal como 0.15 °Plato, tal como 0.10 °Plato en las 12 horas anteriores.

45 10. El método o cepa de levadura de acuerdo con los puntos 7 a 8, en donde la solución de prueba contiene como máximo 55 ppb de diacetilo, por ejemplo, como máximo 50 ppb de diacetilo, tal como como máximo 45 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano.

11. Un método para producir un extracto acuoso fermentado, el método comprende los pasos de:

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

55 ii) proporcionar una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces pastorianus*, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba contiene como máximo 120 ppb de diacetilo, por ejemplo como máximo 60 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.50 °Plato en las siguientes 24 horas, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C; y

60 iii) fermentar el extracto acuoso proporcionado en el paso i) con la cepa de levadura, obteniendo de esta manera un extracto acuoso fermentado.

65 12. La cepa de levadura de acuerdo con los puntos 2 a 6 y 8 a 10, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba contiene como máximo 120 ppb total diacetilo, por ejemplo como máximo 60 ppb de

diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.50 °Plato en las siguientes 24 horas, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C.

- 5 13. El método o cepa de levadura de acuerdo con los puntos 11 a 12, en donde el punto del tiempo es el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.40 °Plato, tal como 0.30 °Plato, tal como 0.20 °Plato en las siguientes 24 horas.
- 10 14. Un método para producir un extracto acuoso fermentado, el método comprende los pasos de:
- i) proporcionar un extracto acuoso de malta y/o cereal;
- 15 ii) proporcionar una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces pastorianus*, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba contiene como máximo 120 ppb de diacetilo, por ejemplo como máximo 65 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.25 °Plato en las siguientes 12 horas, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C; y
- 20 iii) fermentar el extracto acuoso proporcionado en el paso i) con la cepa de levadura, obteniendo de esta manera un extracto acuoso fermentado.
- 25 15. La cepa de levadura de acuerdo con los puntos 2 a 6, 8 a 10 y 12 a 13, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada tras la incubación en una solución de prueba, en donde la solución de prueba es un extracto de malta y/o cereal que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato, en donde la solución de prueba contiene como máximo 120 ppb de diacetilo, por ejemplo como máximo 65 ppb total diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.25 °Plato en las siguientes 12 horas, en donde la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 18°C.
- 30 16. El método o cepa de levadura de acuerdo con los puntos 14 a 15, en donde el punto del tiempo es el punto de tiempo más temprano cuando el extracto evidente de la solución de prueba no disminuye por más de 0.20 °Plato, tal como 0.15 °Plato, tal como 0.10 °Plato en las siguientes 12 horas.
- 35 17. El método o cepa de levadura de acuerdo con los puntos 11 a 15, en donde la solución de prueba contiene como máximo 115 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano.
- 40 18. El método o cepa de levadura de acuerdo con los puntos 1 y 4 a 17, en donde la solución de prueba contiene como máximo 10 millones de células por mililitro, tal como como máximo 9.5 millones de células por mililitro, tal como como máximo 9.0 millones de células por mililitro, tal como como máximo 8.5 millones de células por mililitro en solución en el punto de tiempo más temprano.
- 45 19. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la solución de prueba del paso ii) o la solución de prueba es mosto que tiene un extracto evidente de aproximadamente 16 °Plato.
- 50 20. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la solución de prueba del paso ii) o la solución de prueba comprende al menos 40 g/kg de maltosa.
- 55 21. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la fermentación en el paso ii) o la fermentación se presenta en una temperatura en el intervalo de 12°C a 18°C.
22. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la fermentación en el paso ii) o la fermentación se presenta en una temperatura de como máximo 16°C.
- 60 23. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la fermentación en el paso ii) o la fermentación se presenta después de la inoculación en el intervalo de 7,000,000 a 20,000,000 células de levadura viables por ml de solución de prueba.
24. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde el extracto acuoso se fermenta con la cepa de levadura durante como máximo 6 días, tal como como máximo 5 días, tal como como máximo 4 días.
- 65 25. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde el extracto acuoso has un extracto evidente de al menos 12 °Plato, tal como al menos 15 °Plato.

26. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde el extracto acuoso es mosto.
- 5 27. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde el extracto acuoso comprende como máximo 3500 mg/L, tal como como máximo 3000 mg/L, tal como como máximo 2500 mg/L de aminoácidos.
- 10 28. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores en donde el extracto acuoso fermentado contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, tal como como máximo 55 ppb de diacetilo, tal como como máximo 50 ppb de diacetilo, tal como como máximo 45 ppb de diacetilo, tal como como máximo 40 ppb de diacetilo.
- 15 29. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde el extracto acuoso fermentado contiene como máximo 10 millones de células por mililitro, tal como como máximo 9.5 millones de células por mililitro, tal como como máximo 9.0 millones de células por mililitro, tal como como máximo 8.5 millones de células por mililitro en solución en el punto de tiempo más temprano.
- 20 30. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde el extracto acuoso fermentado tiene un contenido de alcohol de al menos 4% de ABV, tal como al menos 5% de ABV.
31. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde el extracto acuoso fermentado contiene al menos 25 mg/L propanol, tal como al menos 30 mg/L de propanol.
- 25 32. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde el extracto acuoso fermentado contiene como máximo 8 mg/L isobutanol, tal como como máximo 6 mg/L isobutanol.
- 30 33. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde el extracto acuoso fermentado contiene una relación propanol:isobutanol de al menos 2.0, tal como al menos 2.5, tal como al menos 3.0, tal como al menos 4.0, tal como al menos 5.0, tal como al menos 5.5.
- 35 34. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada, en donde la solución de prueba contiene como máximo 265 ppb de diacetilo en cualquier punto de tiempo dentro de 5 días después del inicio de la incubación, y en donde en el intervalo de 7 a 8 millones de células de levadura se agregan a la solución de prueba.
- 40 35. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada que contiene como máximo 50 ppb de diacetilo después de la incubación en la solución de prueba durante como máximo 6 días, tal como como máximo 5 días, tal como máximo 4 días.
- 45 36. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada que contiene como máximo 50 ppb de diacetilo después de la incubación en la solución de prueba en una temperatura de como máximo 16°C como máximo 5 días, tal como como máximo 4 días.
- 50 37. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una primera solución de prueba fermentada que contiene como máximo 60 ppb de diacetilo después de la incubación en la solución de prueba durante un tiempo dado, en donde el tiempo dado es al menos 12 horas, tal como al menos 24 horas menor que el tiempo requerido para la cepa de levadura W-34/78 incubada bajo las mismas condiciones para producir una segunda solución de prueba fermentada que contiene como máximo 60 ppb de diacetilo después de la incubación en la solución de prueba.
- 55 38. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura es capaz de generar al menos 4.0, tal como al menos 4.7 ml/L de etanol por °Plato, cuando la cepa de levadura se incuba en la solución de prueba.
- 60 39. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura es capaz de generar al menos 4.0, tal como al menos 4.7 ml/L de etanol por °Plato, cuando la cepa de levadura se incuba en la solución de prueba en el intervalo de 4 a 6 días, tal como durante aproximadamente 4 días.
- 65 40. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura es capaz de crecer en un medio con melibiosa como la única fuente de carbono.

- 5 41. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene como máximo cinco genes que codifican para ILV2, en donde cada gen que codifica para ILV2 codifica para ScILV2 de SEQ ID NO: 32 o SeILV2 de SEQ ID NO: 38, o un homólogo que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 10 42. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene como máximo cuatro genes que codifican para ILV2, en donde cada gen que codifica para ILV2 codifica para ScILV2 de SEQ ID NO: 32 o SeILV2 de SEQ ID NO: 38, o un homólogo que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 15 43. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene como máximo dos genes que codifican para ILV2, en donde cada gen que codifica para ILV2 codifica para ScILV2 de SEQ ID NO: 32 o SeILV2 de SEQ ID NO: 38, o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 20 44. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura has en el intervalo de 1 a 2, tal como exactamente 2 genes funcionales que codifican para ILV2, en donde cada gen que codifica para ILV2 codifica para ScILV2 de SEQ ID NO: 32 o SeILV2 de SEQ ID NO: 38, o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 25 45. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura has en el intervalo de 1 a 2, tal como exactamente 2 genes funcionales que codifican para ILV2, en donde cada gen que codifica para ILV2 codifica para ScILV2 de SEQ ID NO:32 o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 30 46. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene como máximo cuatro genes que codifican para ILV6, en donde cada gen que codifica para ILV6 codifica para ScILV6 de SEQ ID NO: 33 o SeILV6 de SEQ ID NO: 39, o un homólogo que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 35 47. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene como máximo cuatro genes funcionales que codifican para ILV6, en donde cada gen que codifica para ILV6 codifica para ScILV6 de SEQ ID NO: 33 o SeILV6 de SEQ ID NO: 39, o un homólogo que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 40 48. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene al menos cuatro genes que codifican para ILV5, tal como al menos cinco genes que codifican para ILV5, en donde cada gen que codifica para ILV5 codifica para ScILV5 de SEQ ID NO: 34 o SeILV5 de SEQ ID NO: 40, o un homólogo que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 45 49. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura codifica dentro de su genoma para al menos cuatro genes funcionales que codifican para ILV5, tal como al menos cinco genes funcionales que codifican para ILV5, en donde cada gen que codifica para ILV5 codifica para ScILV5 de SEQ ID NO: 34 o SeILV5 de SEQ ID NO: 40, o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 50 50. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene como máximo 15 genes funcionales que codifican para ILV5, tal como entre 4 y 10 genes funcionales que codifican para ILV5, tal como entre 4 y 5 genes funcionales que codifican para ILV5.
- 55 51. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene en el intervalo de y en el intervalo de 4 a 8 genes funcionales que codifican para ILV5, tal como en el intervalo de 4 a 6, tal como 5 genes funcionales que codifican para ILV5, en donde cada gen que codifica para ILV5 codifica para ScILV5 de SEQ ID NO: 34 a SeILV5 de SEQ ID NO: 40 o a homólogo funcional de cualquiera de los mencionados que compartan al menos 80% de identidad de secuencia con la misma.
- 60 52. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene al menos tres genes, tal como al menos cuatro genes que codifican para ILV3, en donde cada gen que codifica para ILV3 codifica para ScILV3 de SEQ ID NO: 35 o SeILV3 de SEQ ID NO: 41, o un homólogo que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 65 53. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene como máximo 15 genes funcionales que codifican para ILV3, tal como entre 5 y 10 genes funcionales que codifican para ILV3, tal como entre 5 y 6 genes funcionales que codifica para ILV3.
54. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de

- levadura has en el intervalo de 5 a 9 genes funcionales que codifican para ILV3, tal como en el intervalo de 5 a 7, tal como 6 genes funcionales que codifican para ILV3, en donde cada gen que codifica para ILV3 codifica para ScILV3 de SEQ ID NO: 35 o SeILV3 de SEQ ID NO: 41 o a homólogo funcional de cualquiera de los mencionados que compartan al menos 80% de identidad de secuencia con la misma.
- 5 55. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene al menos tres genes, tal como al menos cuatro genes que codifica para BAT1, en donde cada gen que codifica para BAT1 codifica ScBAT1 de SEQ ID NO: 36 o SeBAT1 de SEQ ID NO: 42, o un homólogo que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 10 56. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene al menos tres genes funcionales, tal como al menos cuatro genes funcionales que codifican para BAT1, en donde cada gen que codifica para BAT1 codifica ScBAT1 de SEQ ID NO: 36 o SeBAT1 de SEQ ID NO: 42, o un homólogo que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 15 57. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene al menos cuatro genes, tal como al menos cinco genes que codifica para BAT2, en donde cada gen que codifica para BAT2 codifica ScBAT2 de SEQ ID NO: 37 o SeBAT2 de SEQ ID NO: 43, o un homólogo que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 20 58. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura tiene al menos cuatro genes funcionales, tal como al menos cinco genes funcionales que codifican para BAT2, en donde cada gen que codifica para BAT2 codifica ScBAT2 de SEQ ID NO: 37 o SeBAT2 de SEQ ID NO: 43, o un homólogo que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
- 25 59. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la suma de los genes en la cepa de levadura que codifica para ILV2 y ILV6 es menos que la suma de los genes que codifica para ILV5 y ILV3.
- 30 60. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la suma de los genes en la cepa de levadura que codifica para ILV2 es menor que la suma de los genes que codifican para ILV5 y ILV3.
- 35 61. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde el gene ratio en la cepa de levadura de *ILV5* e *ILV3* vs. *ILV2* es al menos 1, tal como al menos 1.5, tal como al menos 2, tal como al menos 2.5 o tal como al menos 3.
- 40 62. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la relación del gen funcional en la cepa de levadura de *ILV5* y *ILV3* vs. *ILV2* es al menos 1, tal como al menos 1.5, tal como al menos 2, tal como al menos 2.5, tal como al menos 3.
- 45 63. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la relación del gen en la cepa de levadura de *ILV5* e *ILV3* vs. *ILV2* y *ILV6* es al menos 1, tal como al menos 1.2, tal como al menos 1.4, tal como al menos 1.6, tal como al menos 1.8 o tal como al menos 2.
- 50 64. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la relación del gen funcional en la cepa de levadura de *ILV5* e *ILV3* vs. *ILV2* y *ILV6* es al menos 1, tal como al menos 1.2, tal como al menos 1.4, tal como al menos 1.6, tal como al menos 1.8 o tal como al menos 2.
- 55 65. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde los genes que codifican para ILV2, ILV3 y/o ILV5 se expresan de sus promotores nativos.
- 60 66. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde los genes que codifican para ILV2, ILV3, ILV5, ILV6, BAT1 y/o BAT2 se expresan de sus promotores nativos.
67. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura porta una mutación en o una delección de uno o más genes *ILV2*.
68. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura porta una mutación por desplazamiento del marco de lectura de uno o más genes *ILV2*.
69. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura porta una mutación que da por resultado una expresión menor o nula de uno o más genes *ILV2*.
- 65 70. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura porta una mutación en o una delección de uno o más genes *ILV6*.

71. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura porta una mutación por desplazamiento del marco de lectura en uno o más genes *ILV6*.
- 5 72. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura porta una mutación que da por resultado una expresión menor o nula de uno o más genes *ILV6*.
73. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura no comprende ninguna ADN heterólogo.
- 10 74. El método o cepa de levadura de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en donde la cepa de levadura no se somete a un paso de modificación genética.
75. Un extracto acuoso fermentado preparado por el método de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores.
- 15 76. Un método para producir una bebida, el método comprende los pasos de:
- i. preparar un extracto acuoso fermentado de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, y
- 20 ii. procesar el extracto acuoso fermentado en una bebida.
77. El método de acuerdo con el punto 76, en donde los pasos de procesamiento comprenden uno o más de lo siguiente:
- 25 i. Filtración,
- ii. Carbonación,
- 30 iii. Maduración, o
- iv. Embotellado
78. Una bebida preparada por el **método** de acuerdo con los puntos 76 a 77.
- 35 79. La bebida de acuerdo con el punto 78, en donde la bebida contiene al menos 25 mg/L de propanol, tal como al menos 30 mg/L de propanol.
80. La bebida de acuerdo con los puntos 78 a 79, en donde la bebida contiene como máximo 8 mg/L isobutanol, tal como como máximo 6 mg/L isobutanol.
- 40 81. La bebida de acuerdo con los puntos 78 a 80, en donde la bebida es una cerveza.
82. El extracto acuoso fermentado de acuerdo con el punto 75 o la bebida de acuerdo con los puntos 78-81, en donde el extracto o la bebida tiene una relación propanol:isobutanol de al menos 3.0, tal como al menos 4.0, tal como al menos 5.0, tal como al menos 5.5.
- 45 83. Una cepa de levadura, en donde la cepa de levadura es capaz de producir una solución de prueba fermentada después de la incubación de la cepa de levadura en una solución de prueba que tiene un extracto evidente de al menos 10 °Plato y en donde la solución de prueba contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, por ejemplo como máximo 50 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano donde el extracto evidente de la solución de prueba no ha disminuido por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores después de la incubación de la cepa de levadura en el extracto.
- 50 84. Una cepa de levadura de *Saccharomyces pastorianus* de acuerdo con el punto 83, en donde la cepa de levadura es como se define en cualquiera de los puntos 1 a 72.

#### Ejemplos

#### 60 Materiales y métodos

##### Preparación de mosto

65 En general, el mosto usado en los ejemplos experimentales se hizo al triturar 70% de malta pilsner y 30 % de adjunto de cebada en 2.7 L de agua/kg de malta.

## ES 2 991 537 T3

El régimen de trituración fue como se muestra en la siguiente tabla 1:

Tabla 1. Régimen de trituración para la preparación del mosto.

	Temperatura en el inicio ( °C)	Temperatura al final ( °C)	Tiempo (min)	Tiempo total (min)
En la trituración	52.0	52.0	5	5
<i>Retención</i>	52.0		15	20
Incremento de temperatura	52.0	65.0	13	33
<i>Retención</i>	65.0		50	83
Incremento de temperatura	65.0	72.0	7	90
<i>Retención</i>	72.0		20	100
Incremento de temperatura	72.0	78.0	6	106
<i>Retención</i>	78.0		10	116

5

Las variaciones en este régimen de trituración aún pueden producir un mosto adecuado para fermentación.

Después de la trituración, el mosto se hirvió durante 60 min. Para asegurar que el mosto sea adecuado para la fermentación, debe tener de manera preferente contenidos dentro de los siguientes intervalos:

10

- Glucosa 12-25 g/L
- Maltosa 60-80 g/L
- Maltotriosa 15-20 g/L
- Zinc 0.16 a 0.18 mg/L
- Amino nitrógeno libre (FAN) 110-250 mg/L
- Valina/FAN 0.6 a 0.8

Como guía, un contenido promedio de mosto fabricado de 70% de malta pilsner y 30% de adjunto de cebada se da en la siguiente tabla 2. Los mostos que están fuera de algunos de los siguientes parámetros aún se esperan que produzcan buena cerveza.

15

Tabla 2. Composición ejemplar de un mosto fabricado de 70 de malta pilsner y 30% de adjunto de cebada.

<b>Azúcares</b>	<b>g/100 ml de mosto</b>	<b>EST.</b>	<b>Minerales</b>	<b>mg/L</b>	<b>EST.</b>
Fructosa	0.29	0.06	Calcio Ca	46.15	9.28
Glucosa	1.93	0.70	Magnesio Mg	115.73	15.31
sacarosa	0.35	0.09	Sodio Na	21.03	10.63
Maltosa	7.84	0.52	Potasio K	815.82	170.68
Maltotriosa	1.69	0.55	Zinc Zn	0.17	0.10
Sumar Azúcares Fermentables	12.10	0.95	Cobre Cu	0.07	0.02
Azúcar (monodisacáridos)	10.59	0.45	Hierro Fe	0.12	0.08
Azúcares invertidos BUR Ley FR	2.30	0.40	Aluminio Al	0.01	0.01
			Manganeso Mn	0.11	0.08
			Fósforo P	511.96	61.85
			Sílice Si	18.43	9.03
<b>Aminoácidos</b>	<b>mg/L</b>	<b>EST.</b>			
Ácido aspártico (Asp)	89.53	16.66	<b>FAN* mg/L</b>	207.16	52.16
Ácido glutámico (Glu)	91.43	15.62			
Serina (Ser)	92.10	28.01	<b>VAL/FAN</b>	0.61	0.03
Histidina (His)	59.09	15.86			
Glicina (Gly)	44.98	12.42			
Treonina (Thr)	81.00	25.22			
Arginina (Arg)	161.68	59.35			
Alanina (Ala)	120.60	27.66			
Tirosina (Tyr)	133.16	39.81			

Metionina (Met)	47.92	17.61
Valina (Val)	141.48	34.78
Fenilalanina (Phe)	147.45	30.83
Isoleucina (Iso)	81.80	21.26
Leucina (Leu)	181.02	31.62
Lisina (Lys)	115.49	36.49
Suma de Aminoácidos Clase 1	410.67	90.89
Suma de Aminoácidos Clase 2	681.55	148.43
Suma de Aminoácidos Clase 3	532.18	113.77
*FAN= Amino nitrógeno libre		

Para ayudar a la floculación de la levadura, se puede agregar zinc adicional al mosto antes de la fermentación, como se describe en algunos de los siguientes ejemplos.

## 5 PCR de gotas

Se preparó ADN genómico de cepas de levadura diploides y clones de esporas haploides usando el kit de purificación de ADN Genómico MasterPure de Epicentre. Las concentraciones de cada una de la preparación de ADN final se ajustaron a 50 ng/microlitro de ADN usando agua Milli Q. El ADN se cuantificó usando Espectrofotómetros NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Usando la PCR de gotas Biorad (QX200) y las sondas diseñadas para reconocer los genes *ILV2* de *Saccharomyces eubayanus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Estas sondas se usaron para dirigirse al ADN genómico en clones de esporas haploides y cepas de levadura diploides de control. Usando este método, los inventores fueron capaces de determinar la relación entre los dos genes *ILV2* variantes en una manera cuantitativa. A fin de distinguir los alelos *ILV2* de *S. eubayanus* y *S. cerevisiae* se diseñó una reacción de PCR digital específica de especie basada en un ensayo TaqMan. Para este propósito, los cebadores específicos diana se diseñaron en regiones homólogas del gen *ILV2* para *S. eubayanus* y *S. cerevisiae*, significa que el mismo cebador directo e inverso podría amplificar ambas copias de especies *ILV2* simultáneamente. Las sondas específicas de especie se diseñaron para ser idénticas a parte de un nucleótido individual, permitiendo una discriminación entre los alelos *ILV2* de tipo *S. eubayanus* y *S. cerevisiae*. La sonda específica de especies para *S. cerevisiae* tiene una T en la posición de nucleótido 1515 en la secuencia de tipo silvestre *ILV2* de *S. cerevisiae*, mientras que la sonda específica de especies para *S. eubayanus* tiene una C en la posición de nucleótidos 1515 en la secuencia tipo silvestre *ILV2* de *S. eubayanus*. Los siguientes cebadores y sondas se desarrollaron para distinguir entre el alelo *ILV2* de *S. eubayanus* y el alelo *ILV2* de *S. cerevisiae*:

Cebadores *ILV2* específicos diana que amplificarán tanto la *ILV2* de *S. cerevisiae* como *ILV2* de *S. eubayanus* simultáneamente:

30 Cebador directo específico diana (5'- GCCAACGACACAGGAAGAC - 3') (SEQ ID NO: 1)

Cebador inverso específico diana (5'- GTACCTAAACCACCTGATGT - 3') (SEQ ID NO: 2)

Las sondas específicas de especie que permitirán la discriminación entre copias de *ILV2* de *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*:

Sonda específica de alelo *ILV2* de *S. cerevisiae* (5'- TGGGCTGCTCAACAC - 3') (SEQ ID: 3) – etiquetado con 5' FAM y 3' BHQ1

40 Sonda específica de alelo *ILV2* de *S. eubayanus* (5'- ACGTACGGAATGTGGATT - 3') (SEQ ID NO: 4) – etiquetada con 5' HEX y 3' BHQ1

Usando un sistema Droplet Digital PCR QX200 (Bio-Rad Laboratories), ddPCR se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para propósitos analíticos, 5 µl de ADN purificado (5 ng/µl de concentración de ADN) de cepas de levadura se agregaron a 17 µl de mezcla de PCR que contiene 11 µl de 2x ddPCR Supermix para las sondas (No. dUTP; Bio-Rad), 900 nM de cebador directo de PCR específico diana, 900 nM de cebador inverso de PCR específico diana, 250 nM de sonda específica de alelo *ILV2* de *S. cerevisiae* y 250 nM de sonda específica de alelo *ILV2* de *S. eubayanus*. La mezcla de reacción se cargó en el generador de gotas AutoDG (Bio-Rad Laboratories) y la generación de gotas se llevó a cabo de acuerdo con el manual del fabricante. La emulsión de las gotas se cicló térmicamente usando condiciones de PCR estándares: desnaturalización a 95°C durante 10 min, 40 ciclos de PCR a 94°C durante 30 s y 55°C durante 1 min, y una extensión final de 98°C durante 10 min. antes del almacenamiento de la placa de microtítulo a 8°C. La amplificación de PCR en gotas se confirmó usando el lector de gotas QX200 (Bio-Rad Laboratories) y los datos se analizaron usando el software QuantaSoft (versión v1.7, Bio-Rad Laboratories).

55

Detección del número de copias del gen *ILV2* total

En la primera ronda, las relaciones entre *ILV2* de *S. eubayanus* y *S. cerevisiae* se analizaron directamente en el ADN genómico purificado de cada clon de esporas individual. Algunos clones de esporas, a pesar de que se originan de la misma levadura parental, tuvieron diferente constitución genética de *ILV2* velos. Algunos clones de esporas parecen que tienen solo 100% de genes *ILV2* de *S. cerevisiae* que el clon de esporas. Puesto que la mayoría de las levaduras de lager parentales son tri- o tetraploides (Wahlter et al, 2014), se puede suponer que el 100% de clones de esporas de *ILV2* de *S. cerevisiae* de alguna manera pueden ser entre 1-3 copias. Para los clones de esporas con ambos tipos de *ILV2* tal como 50/50 uno podría asumir 1 copia de cada tipo en los clones de esporas o 2 + 2 en las levaduras parentales. Las cepas con relaciones cercanas a 67/33 significarían 1 copia de *S. cerevisiae* y 2 copias de *ILV2* de *S. eubayanus*.

Para permitir una estimación más precisa del número de copias en los clones de esporas con cercana 100% de *ILV2* de *S. cerevisiae*, en el sello se repitió al agregar o al enriquecer ADN de *S. eubayanus* externo puro a las muestras para obtener la distribución de *S. cerevisiae*/ *S. eubayanus* después del enriquecimiento. Las relaciones *SciLV2*/*SeiLV2* que cambiarían en gran medida hacia *S. eubayanus* después del enriquecimiento indicaría copias bajas de *ILV2* de *S. cerevisiae* y si la relación cambiara solo poco hacia el ADN de *S. eubayanus* y aún se dominaría por la *ILV2* de *S. cerevisiae* alta indicaría que el clon de esporas original tiene muchas copias de *ILV2* de *S. cerevisiae*.

El enriquecimiento se hizo tal que cada muestra de 50 ng/microlitro de ADN se mezcló con ADN de *S. eubayanus* de la misma concentración de 50 ng/microlitro en una relación 50/50 (10 microlitros de muestra + 10 microlitros de ADN de *S. eubayanus*).

El método de estimación de QPCR de gota refleja cuantitativamente las copias de *ILV2* totales presentes, pero no puede revelar si existen algunos alelos *ILV2* inactivados debido a la presencia de SNPs particulares o las mutaciones por desplazamiento del marco de lectura. Estas mutaciones primero se pueden detectar por un ADN genómico subsecuente que se secuenciará por la secuenciación de Sanger o la secuenciación de próxima generación.

Detección para la floculación

Para evaluar las capacidades de floculación de los clones de esporas de levadura, primero se hicieron crecer en un mosto regular a temperatura ambiente durante varios días. Para cada cepa, se transfirieron 2 ml de cultivo a un tubo de reacción de 2 ml, se aplicó movimiento vorticial completamente y las células se dejaron asentar durante 10 min. Para determinar la floculación dependiente de calcio, las células de 2 ml de los cultivos previamente mencionados anteriormente se recolectaron, se lavaron dos veces con solución de EDTA 50 mM y se resuspendieron subsecuentemente en 2 ml de Tris 50 mM, ácido succínico 50 mM y KOH 100 mM sin calcio (Stratford 1996). El pH se ajustó a pH 4.0, lo que se asemeja a los valores de pH finales de los cultivos de mosto. Las suspensiones celulares nuevamente se les aplicó movimiento vorticial completamente y las células se dejaron asentar durante 5 min. Los resultados se documentaron fotográficamente.

Medición de diacetilo total de los clones de esporas en las fermentaciones de mosto usando cilindros con agitación magnética

Clones de esporas y levaduras de control se hicieron crecer durante tres días en 2 ml de YPD líquido en una unidad giratoria Stuart SB2 (www.stuart-equipment.com). Matraces agitación sin deflectores de 25 ml de mosto Pilsner estándar pasteurizado de 16 Plato se inocularon con dos ml de pre-cultivos y se hicieron crecer a temperatura ambiente en una tabla de agitación con agitación intermedia durante 5 días para alcanzar los cultivos de fase estacionaria densos.

Se condujeron fermentaciones de cerveza en cilindros de vidrio como se describe previamente (Guitierrez et al., 2018). Las fermentaciones se llevaron a cabo en cilindros de medición de vidrio altos de 250 ml (331 × 39 × 39 mm; Duran) que contienen 200 ml de mosto Pilsner y se sellaron con un vaso de precipitados de vidrio invertido (Duran) en la parte superior del cilindro para permitir el escape de dióxido de carbono y acceder fácil al muestreo para análisis. Se llevaron a cabo las fermentaciones con agitación continua a 150 rpm usando una barra magnética en una plataforma de agitación Variomag a 16°C dentro de un refrigerador (Gabinete incubadora de tipo TS 606-G/4-i). Los conteos de células de levadura se estimaron con un celómetro. (<https://www.nexcelom.com/applications/cellometer>) y se inocularon (se sembraron) en una velocidad de 15 millones de células por ml de mosto y el desempeño de la fermentación se monitoreó al medir la pérdida de peso que resulta de la liberación de CO<sub>2</sub> metabólico. Se recolectaron de 10 ml de muestras durante la fermentación en los días 2, 3 y 4 para los análisis de diacetilo. Las muestras se centrifugaron a 1900 g durante 10 min y los sobrenadantes se almacenaron en un congelador a -20 °C hasta uso futuro. Las fermentaciones se consideraron terminadas cuando no se pudo medir la pérdida de peso adicional de los cilindros de fermentación. Los inventores midieron diacetilo total mediante cromatografía de gas de acuerdo con el European Brewing Convention method EBC 9.24.2 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 acetolactato precursor y el diacetilo libre.

Cepas de levadura

5

**Levadura híbrida 7 de *Saccharomyces pastorianus***, es una cepa de producción de lager y tiene una alta floculación que permite la recolección de la levadura al final de la fermentación sin enfriamiento adicional. La levadura híbrida 7 se usa como referencia a las levaduras de la presente invención.

10 **ZDA1** es una levadura de la invención.

**ZDA2** es una levadura de la invención

**ZDA3** es una levadura de la invención

15

**W-34/78 de *Saccharomyces pastorianus***, es una cepa de la levadura lager comercialmente disponible de Weihenstephan Hefebank (info@hefebank-weihenstephan.de), Alemania. Esta levadura se sabe que reduce el diacetilo muy eficientemente y muestra alta floculación, pero aun significativamente menos que la cepa de Levadura híbrida 7 que cuando se fermentó en el mosto descrito en lo anterior. Se usa como referencia a la levadura de la presente invención. W-34/78 también es referido en la presente WS34/78.

20

*Ejemplo 1 – Ensayo de 50 L a 16 y 18 °C con la cepa de levadura ZDA1 y la cepa comparativa Levadura híbrida 7*

25

Para probar la diferencia en los niveles de diacetilo durante la fermentación de una nueva cepa de levadura híbrida contra una cepa de levadura de control, se prepararon 50 L de cerveza de un mosto como se describe en la sección de materiales y métodos con un °Plato de entre 15 y 16. Antes de la fermentación, el mosto se ajustó a un pH de 4.9 y se agregó zinc a una concentración final de 0.30 mg/L. El mosto se inoculó con 12-15 millones de células de levadura viables por ml de mosto. La fermentación se llevó a cabo a 16°C o 18°C. En general, los lagers se fermentaron entre 12°C y 16°C. Si la levadura tolera 18°C, esto puede servir para acelerar el proceso de fermentación. Las muestras se obtuvieron en el día 0 y en varios puntos de tiempo durante la fermentación, como es indicado en las siguientes tablas. Los resultados se muestran en las siguientes Tablas 3 y 4 y se grafican representando en las Figuras 1A a 1C.

30

35 Tabla 3. Fermentación de 50 L a 18 °C.

Levadura	Día	Temp °C	°Plato	Diacetilo ppb	pH	Alcohol %Vol
ZDA1	0		15.79		4.90	
	1	18.3	13.61	87	4.33	
	3		3.33	54		
	4	18.0	3.23	26	4.16	6.95
Levadura híbrida 7	0		15.78		4.90	
	1	17.9	13.6	489	4.45	
	3		3.06	137		
	4	17.7	3.01	56	4.05	7.02

Tabla 4. Fermentación de 50 L a 16 °C.

Levadura	Día	Temp °C	°Plato	Diacetilo ppb	pH	Alcohol %Vol
ZDA1	0		15.27		4.89	
	4	15.8	3.52	93	4.11	
	5	15.7	3.38	50	4.15	
	6	15.7	3.38	31	4.15	
	7	15.7		19	4.15	6.55
Levadura híbrida 7	0		15.27		4.89	
	4	16.2	3.39		4.04	
	5	16.3	3.28		4.09	
	6	16.3	3.26	77	4.09	
	7	16.3		42	4.09	6.59

40

Se dice que una cerveza está en especificaciones cuando el nivel de diacetilo está por debajo de 50 ppb y el Plato es estable (se ha utilizado todo el azúcar fermentable). Es una ventaja obtener la cerveza en especificaciones en el tiempo más corto posible, mientras se produce al menos una cantidad similar de alcohol en comparación con la levadura de control.

Niveles de diacetilo a 18°C

5 Como se puede observar a partir de la tabla 3 y las Figuras 1B y 1C, la cepa de levadura ZDA1 fue capaz de producir un mosto fermentado (cerveza verde) dentro de tres días donde el nivel de diacetilo estuvo cercano de 50 ppb y al mismo tiempo todo el azúcar fermentable presente en el mosto se utilizó (lo cual es evidente por la caída en °Plato que es menor de 0.50 durante 24 h) cuando se fermentó a 18 °C. En contraste, la cepa de levadura de control Levadura híbrida 7 comenzó con un nivel de diacetilo muy alto (Figura 1B) y necesitó 4 días para alcanzar un nivel similar de diacetilo como la cepa ZDA1 lo tuvo en el día 3.

10 El punto en el tiempo más temprano donde el extracto evidente no disminuyó por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores se consideró que es el día 4 para ambas cepas. En el día 4 la cerveza verde obtenida con Levadura híbrida 7 contuvo nía aproximadamente 56 ppb de diacetilo, mientras que la cerveza verde obtenida con ZDA1 contuvo solo 26 ppb.

15 Cuando se llevó a cabo la fermentación a 16°C (tabla 4 y Figura 1A) el punto en el tiempo más temprano donde el extracto evidente no disminuyó por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores fue en el día 5 para ambas cepas. En ese tiempo, la cepa ZDA1 había alcanzado el nivel de diacetilo de 50 ppm deseado, mientras que la levadura de control Levadura híbrida 7 tuvo que ser fermentada dos días adicionales más para alcanzar un nivel de diacetilo por debajo de 50 ppm.

Niveles de propanol, isobutanol y SO<sub>2</sub> después de la fermentación a 16°C o 18°C

25 Además del diacetilo y Plato, se midieron los niveles de propanol e isobutanol en una cerveza final preparada de la cerveza de ensayo de 50 L. La cerveza final se ajustó a un contenido alcohol de 5.0% en vol, CO<sub>2</sub> a 5.1g/L y se embotelló en botellas verdes de 33 cl. Sin que sea limitado por la teoría, se cree que el propanol e isobutanol isobutanolis pueden ser indicadores del flujo de la ruta restringida dentro de la ruta de aminoácidos de cadena ramificada, en particular baja actividad de *ILV2* de la levadura, y por lo tanto es una buena forma de evaluar si una cepa de levadura tiene el potencial depara ser un productor de bajo contenido de diacetilo.

30 Una alta relación de propanol:isobutanol es una indicación de una levadura que produce bajo diacetilo. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 5:

Tabla 5. Contenido de propanol e isobutanol en el mosto fermentado (cerveza verde)

Levadura	Temp °C	Propanol	Isobutanol	Relación de propanol:isobutanol	SO <sub>2</sub>
ZDA1	16	35.09	4.93	7.73	7
	18	42.18	6.39	6.60	6
Levadura híbrida 7	16	15.53	17.50	0.89	4
	18	19.3	19.57	0.97	2

35 Como se puede observar a partir de la tabla 5, tanto a 16°C como 18°C, la cerveza verde obtenida de la fermentación con la cepa de levadura híbrida ZDA1 mostró mayores niveles de propanol comparado con la cerveza verde obtenida con la cepa de levadura de control Levadura híbrida 7. El mosto incubado con la cepa de levadura híbrida ZDA1 también tuvo menores niveles de isobutanol comparados con la Levadura híbrida 7, dando por resultado una diferencia de al menos 6.8 veces en la relación de propanol:isobutanol.

40 También se observó que los niveles de SO<sub>2</sub> en la cerveza verde obtenidos con la cepa de levadura ZDA1 fue más alto que en la cerveza verde de la cepa control. Esto puede proporcionar una ventaja en términos de conservación de la cerveza final.

45 La Figura 3 muestra la relación de propanol por isobutanol de las cervezas comerciales comparado con una cerveza de "botella de control 89-84393 ZDA2" producida usando la cepa de levadura ZDA2 de acuerdo con la invención. La "botella de control 89-84393 ZDA2" se produce en un ensayo de 50 L y se destila a 5%. Todas las cervezas comerciales tuvieron menor relación de propanol a isobutanol.

Ejemplo 2 – Ensayo de 50 L a 16°C con cepas de levadura ZDA2 y ZDA3

50 Dos cepas híbridas de levadura adicionales con perfiles de diacetilo favorables se identificaron y se compararon con la cepa ZDA1 del ejemplo 1. 50 L de cerveza se prepararon de un mosto como se describe en la sección de materiales y métodos con un °Plato de 16. Antes de la fermentación, el mosto se ajustó a un pH de 4.9 y se agregó zinc a la concentración final de 0.30 mg/L. El mosto se inoculó con 14 millones de células de levadura viables por ml de mosto. La levadura para inoculación se obtuvo de una primera fermentación de 50 L, donde las células de levadura se recolectaron al final de la fermentación y se usaron para volver a sembrar un segundo ensayo de fermentación de 50 L. Esto se asemeja a la forma en que se lleva a cabo la producción de cerveza a gran escala. La fermentación se llevó a cabo a 16°C. Las muestras se obtuvieron en el día 0 y durante la

fermentación como se indica en la siguiente tabla. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 6.

Tabla 6. Fermentación de 50 L a 16°C.

Levadura	Día	Temp °C	°Plato	Diacetilo ppb	pH	Alcohol %Vol
ZDA1	0		16.05		4.9	
	1	16.2	13.7	90	4.45	
	3			63		
	4	16.4	2.99	48	4.22	
	5	16.3	2.94		4.24	7.29
ZDA2	0		16.05		4.9	
	1	16.2	14.13	48	4.47	
	3			55		
	4	16.5	3.09	42	4.21	
	5	16.4	3.01		4.24	7.28
ZDA3	0		16.05		4.9	
	1	15.9	13.73	68	4.41	
	3			45		
	4	16.2	3.04	35	4.28	
	5	15.9	3		4.29	7.26

5

Como se muestra en la tabla 6, los tres candidatos (ZDA1, ZDA2 y ZDA3) mostraron niveles de diacetilo por debajo de 50 ppb en el día 4, lo cual correspondió al tiempo donde el extracto evidente había alcanzado una meseta. Adicionalmente, ZDA3 tuvo niveles de diacetilo por debajo de 50 ppb ya en el día 3.

10 Ejemplo 3 – Resultados de sabor

El mosto fermentado obtenido en el ejemplo 2 se procesó adicionalmente a cervezas finales al ajustar el contenido de alcohol a 5% en volumen, CO<sub>2</sub> a 5.1g/L y se embotellaron en botellas verdes de 33 cl Danihs estándares. Las cervezas se evaluaron por un panel de catadores de cerveza especialistas, que consisten en 10 catadores. Cada miembro del panel de catadores estuvo extensivamente entrenado, en particular cada miembro tuvo experiencia en evaluar las propiedades de sabor de los ésteres, alcoholes superiores, componentes de azufre y cuerpo de la cerveza. Cada miembro de panel de catadores evaluó diferentes notas de sabor. En particular, el sabor general se evaluó en una escala de 1 a 9 y se proporcionó como el "Resultado principal" en la siguiente Tabla 7.

20

Tabla 7. Resultados de sabor de la cerveza del ensayo de 50 L del ejemplo 2.

Nombre de la muestra	Primera fermentación resultado principal
ZDA1	6.1 Satisfactorio
ZDA2	5.7 Satisfactorio
ZDA3	5.8 Satisfactorio

25 Como se muestra en la tabla 7, las muestras de las cervezas producidas por todas las cepas de levadura se clasificaron al menos con 5.7 (Satisfactorio).

Ejemplo 4 – Ensayo de cerveza 10 HL a 16°C con cepa de levadura ZDA1 y la cepa comparativa Levadura híbrida 7

30 El propósito de este ejemplo fue investigar si la cepa de levadura híbrida ZDA1 mostró el mismo perfil de diacetilo ventajoso como se observó en una escala de 50 L en el ejemplo 1. Se preparó cerveza de 10 HL de

un mosto como se describe en la sección de materiales y métodos con un °Plato de aproximadamente 16. Antes de la fermentación el mosto se ajustó a un pH de 4.95 y se agregó zinc a una concentración final de 0.8 mg/L. El mosto se inoculó con al menos 15 millones de células de levadura viables por ml de mosto de las cepas de levadura híbrida ZDA1 o la cepa de levadura lager de control Levadura híbrida 7, seguido por fermentación a aproximadamente 16°C. La levadura para inoculación se obtuvo de una primera preparación de cerveza como se describe en el ejemplo 2. Las muestras se obtuvieron en el día 0 y los días indicados en los resultados de la siguiente tabla 8. Los resultados se muestran en la tabla 8 y se ilustran en las Figuras 2A y 2B.

10 Tabla 8. Fermentación de 10 HL a 16°C.

Levadura	Día	Temp °C	°Plato	Diacetilo ppb	pH	Alcohol %Vol
ZDA1	0	15.7	16.05		4.73	
	1	15.9	14.24	239	4.49	0.92
	4	15.7	2.87	55	4.11	7.15
	5	15.9	2.73	28	4.19	7.28
	6	15.9	2.65	14	4.13	7.43
Levadura híbrida 7	0	15.8	16.1		4.72	
	1	15.8	14.41	868	4.54	0.87
	4	16.0	3.34	509	4.07	6.84
	5	15.7	2.67	205	4.06	7.32
	6	15.8	2.56	91	4.05	7.48
	7	15.0	2.53	36	4.11	7.48

La cepa de levadura ZDA1 produce un nivel inicial muy bajo de diacetilo y la cerveza verde obtenida con cepas de levadura híbrida ZDA1 alcanzó el umbral cercano al sabor de diacetilo (50 ppb) en el día 4 y en el día 5 que estuvo abajo de 28 ppb. La cerveza verde obtenida con la cepa de levadura de control Levadura híbrida 7, sin embargo, primero alcanzó este umbral en el día 7 (Figura 2A). La Figura 2B muestra que el nivel de diacetilo total en la cerveza verde obtenida con el híbrido de levadura ZDA1 está cercana a 50 ppb aproximadamente al mismo tiempo como los azúcares fermentables que están cercanos a completar la fermentación, es decir en el día 4.

20

*Ejemplo 5 – Resultados de sabor*

El mosto fermentado obtenido en el ejemplo 4 se procesó adicionalmente a una cerveza final al ajustar el contenido de alcohol a 4.6% en volumen, CO<sub>2</sub> a 5.4g/L y se embotelló en botellas color ámbar de 33 cl. Las cervezas se evaluaron por un panel de catadores de cerveza especialistas tanto en Dinamarca como en Francia, que consiste en 10 catadores. Cada miembro del panel de catadores estuvo extensivamente entrenado, en particular, cada miembro tuvo experiencia en evaluar las propiedades de sabor de los ésteres, alcoholes superiores, componentes de azufre y el cuerpo de la cerveza. Cada miembro del panel de catadores evaluó diferentes notas de sabor. En particular, el sabor general se evaluó en una escala de 1 a 9 y se proporcionó como el “Resultado principal” en la siguiente Tabla 9.

30

Tabla 9. Resultados de sabor de la cerveza del ensayo de 10 HL del ejemplo 4.

Nombre de la muestra	Resultado principal
ZDA1	6.6 Satisfactorio
Levadura híbrida 7	6.4 Satisfactorio

35 Como se muestra en la tabla 9, las muestras de cervezas producidas por la cepa de levadura ZDA1 se clasificaron 6.6 (Satisfactorio), que está un poco arriba de la cerveza producida con la cepa de control Levadura híbrida 7.

Ejemplo 6 – Ensayo a 16°C que incluye tres cepas de levadura lager de control

5 Este experimento se condujo para comparar las tres cepas de levadura novedosas del ejemplo 2 con cepas de levadura comercialmente disponibles adicionales, así como el control usado en los ejemplos 1, 2 y 4. 40 L de cerveza se prepararon de un mosto como se describe en la sección de materiales y métodos con el pequeño cambio que el primero mantenido a 52°C fue de 30 min. Para la fermentación, el °Plato fue entre 15 y 16. Antes de la fermentación, el mosto se ajustó a un pH de 4.9 y se agregó zinc a una concentración final de 0.30 mg/L. El mosto se inoculó con 7.5 millones de células de levadura viables por ml de las cepas de levaduras híbridas ZDA1, ZDA2 y ZDA3, así como con una cepa de levadura de lager de control Levadura híbrida 7, y las cepas de levadura lager de control W-34/78 que es comercialmente disponible de Weihenstephan, Alemania. El mosto se fermentó a aproximadamente 16°C. Las muestras se obtuvieron en el día 1 y los días indicados en la siguiente tabla de resultados. Los resultados se muestran en la tabla 10.

15 Tabla 10. Fermentación de 40 L a 16°C.

Levadura	Día	Temp °C	% Plato	Diacetilo ppb	pH	Células en líquido (millones/ml)	Alcohol %Vol	Propanol	Isopropanol
Levadura híbrida 7	1	15.7	15.54	88	4.71				
	2	16.5	12.78	431	4.45				
	3			869					
	4			520					
	5	16.4	2.49	265	4.02				
	6	16.5	2.45	115	4.05	0.8			
	7		2.37	57	4.09				
	8				44			7.35	11.02
W-34/78	1	14.5	15.4	176	4.64				
	2	16.1	12.54	470	4.33				
	3			485					
	4			286					
	5	16.3	2.97	150	4.1				
	6	16.2	2.68	62	4.15				
	7	15.4	2.63	41	4.19	17			
	8				33			7.2	11.08
ZDA1	1	15.6	15.26	89	4.69				
	2	16.3	12.24	166	4.38				

Levadura	Día	Temp °C	% Plato	Diacetilo ppb	pH	Células en líquido (millones/ml)	Alcohol %Vol	Propanol	Isopropanol
	3			133					
	4			74					
	5	16.2	2.9	42	4.15				
	6	16.1	2.73	24	4.2	2.5			
	7	16.2	2.69	16	4.25				
	8	15.6	15.26	89	4.69		7.18	27.04	4.00
ZDA2	1	14.7	15.47	20	4.64				
	2	16.1	12.7		4.4				
	3			245					
	4			102					
	5	16.3	2.68	49	4.05				
	6	16.2	2.55	25	4.09	1.2			
	7	16.2	2.5	15	4.13		7.3	22.54	3.61
ZDA3	1	14.6	15.5	39	4.63				
	2	16.5	12.96	92	4.42				
	3			116					
	4			63					
	5	16.4	3.78	32	4.08				
	6	16.5	3.28	18	4.12	2.8			
	7	16.3	3.21	12	4.15		6.9	24.20	3.56

En este ensayo, las tres cepas con bajo contenido de diacetilo (ZDA1, ZDA2 y ZDA3) mostraron niveles de diacetilo por debajo de 50 ppb en el día 5, lo cual correspondió al tiempo donde el extracto evidente había alcanzado una meseta para todas las cepas de levadura probadas, mientras que ninguna de las cepas de control mostró niveles de acetilo por debajo de 110 ppb al mismo día. El punto en el tiempo más temprano donde el extracto evidente no disminuyó por más de 0.50 °Plato en las 24 horas anteriores se considera que es el día 6 para todos estos ensayos. En el día 6, todas las cepas con bajo contenido de diacetilo (ZDA1, ZDA2 y ZDA3) tuvieron un nivel de diacetilo abajo de 45 ppb (24 ppb, 25 ppb y 18 ppb, respectivamente), mientras que las cepas de control (Levadura híbrida 7, W-34/70 y W-34/78) tuvieron niveles más altos de diacetilo (115 ppb, 62 ppb y 62 ppb, respectivamente).

Estos resultados son muy remarcables considerando que la levadura Weihenstephan es menos floculante que la cepa de Levadura híbrida 7 y las cepas de la invención. El conteo de células en el líquido (arriba del gránulo de levadura) al final de la fermentación es una buena medida de floculación. Estos datos se muestran en la tabla 10 anterior como Células en Líquido (cuando más bajo es el volumen es más floculante la levadura). La alta floculación es una ventaja cuando la levadura que se debe recolectar del tanque de producción para inocular el siguiente mosto para la producción de cerveza. Si la floculación de la levadura es baja, este proceso requerirá enfriamiento de la cerveza verde por hasta 24 horas. La alta floculación, por otra parte, puede dar por resultado menos contacto entre la levadura y el mosto durante la fermentación, lo cual es probable que reduzca la velocidad en la cual la levadura puede consumir el diacetilo y prolongar el tiempo de fermentación.

Los ejemplos descritos en la presente por lo tanto proporcionan cepas de levadura que son capaces de reducir el diacetilo a menos de 50 ppb aproximadamente al mismo tiempo donde los azúcares fermentables se han consumido (o aún antes de eso) y al mismo tiempo no requiere ningún enfriamiento adicional de la cerveza verde para recolectar la levadura para la siguiente producción de cerveza debido a su alta floculación a 16°C.

Adicionalmente, se puede observar que las cepas de levadura con bajo contenido de acetilo se puede identificar fácilmente a través de la relación de propanol/isobutanol puesto que están por arriba de 6, mientras que las cepas de control están por debajo de 1.4.

5

Ejemplo 7 – Genotipificación de las cepas de levadura

Ensamble de los genomas

10 Para cuatro (Levadura híbrida 7, ZDA1, ZDA2 y W 34-78) de los cinco genomas se ha desplegado un procedimiento de análisis en tándem para usar los datos NGS de las plataformas Illumina y Pacbio. El control de calidad, filtración y ensamble se han llevado a cabo después de una canalización designada en el laboratorio. Todos los genomas se ensamblaron de novo usando el software Canu 1.9 que usa datos generados por la plataforma Pacbio. Subsecuentemente, las lecturas generadas por la plataforma Illumina se mapearon (Pilon 1.22) contra el ensamble producido por Canu 1.9 a fin de mejorar la precisión consenso de los borradores de ensamblados. Para el genoma ZDA3, debido a la ausencia de los datos Illumina, solo se ha usado Canu 1.9 sin la mejora del ensamble adicional.

20

Los genomas ensamblados resultantes se usaron en las consultas BLAST.

Blast y alineación de los aciertos

25

Para cada uno de los genes (*ILV2*, *ILV3*, *ILV5*, *ILV6*, *BAT1*, *BAT2*) la secuencia de aminoácidos correspondiente del gen de *S. cerevisiae* se usó como una secuencia de consulta contra cada uno de los 5 genomas usando el algoritmo TBLASTN. Finalmente, los aciertos se filtraron al retenerlos teniendo al menos 65-80% de identidad de secuencia o al convertir al menos 40% de la longitud de la secuencia de consulta. La alineación de secuencia de aminoácidos de *ILV2*, *ILV3*, *ILV5*, *ILV6*, *BAT1*, *BAT2* entre WS34-78, *cer* (*Saccharomyces cerevisiae*), *eub* (*Saccharomyces eubayanus*), Hybrid7 (Levadura híbrida 7), ZDA1 y ZDA2 se muestran en las Figuras 4 a 9.

30

El análisis BLAST no se repitió para los genes correspondientes de *S. eubayanus*, puesto que en el último paso de filtración en los aciertos se dejaron que estuvieran tan bajos como 65% de identidad de secuencia, de esta manera en esta configuración todos los aciertos tanto de *S. cerevisiae* como *S. eubayanus* se podrían capturar debido a la alta similitud entre ellos. Se usó la herramienta de alineación de secuencia múltiple MUSCLE (3.8) para alinear todos los aciertos identificados a través del análisis BLAST.

35

Análisis de identificación de ploidía

40

El análisis de identificación de ploidía se llevó a cabo al desarrollar una versión modificada del algoritmo sppIDer. Las lecturas cortas de la plataforma Illumina de cuatro de cinco genomas se mapearon a un genoma de referencia de combinación de *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* y las lecturas con una calidad de mapeo (MQ) >3 se retuvieron y se cortaron en el orden del genoma de referencia de combinación; luego, se calculó la cobertura a través del genoma de referencia de combinación. Luego se calculó una secuencia de comandos personalizada para la cobertura media para cada especie, y el genoma de referencia de combinación se dividió en ventanas.

45

Desventajas técnicas del análisis BLAST

50

Usando BLAST para estudiar el efecto de las diferencias genómicas en el fenotipo de las cepas que sufren de varias desventajas, los más importantes son:

i) la capacidad de evaluar las duplicaciones en el nivel de genes y/o cromosomas

55

ii) la sensibilidad de errores o ambigüedades en los ensamblados.

60

Todos los métodos de ensamblados de genomas tienen problemas en crear ensamblados significativos en la presencia de poliploidía. Esto da por resultado un resultado donde las múltiples regiones de diferentes copias de cromosomas se colapsan en un solo andamiaje. En principio, la situación es menos grave cuando se presentan eventos de duplicación génica, puesto que aquellos que se podrían identificar usando los métodos de ensamble específicos y las configuraciones experimentales apropiadas. Sin embargo, aún es muy probable que las duplicaciones génicas, especialmente si no están presentes o están limitadas las diferencias genómicas en las diferentes copias, fallarán para ser detectadas apropiadamente en la etapa de ensamble.

65

En cuando al segundo punto, BLAST sería en principio ser capaz de identificar más información detallada en las diferentes variantes tal como SNPs funcionales y ORFs no funcionales. Sin embargo, los errores o ambigüedad en el ensamble podrían producir un gran número de llamadas falsas, por ejemplo, SNPs espurios

y arquitecturas de genes ambiguas. Los inventores por lo tanto han decidido llevar a cabo, en paralelo a la identificación de BLAST simple de las variantes, una estimación de la ploidía observada de cada región genómica en los datos de secuenciación, que resultan por la ploidía del cromosoma, y la duplicación o deleción de genes.

5

En general, la generación de ensamblajes de novo resueltos por haplotipo sigue siendo no obstante un problema mayor. Las técnicas NGS (Pacbio e Illumina) producen grandes cantidades de datos, pero aún es técnicamente difícil distinguir entre errores y variantes de secuencias reales. En la parte superior de ella, se necesita asignar las variantes reales a las diferentes copias del genoma cuando la muestra es poliploide. Los ensamblajes en estos análisis se llevaron a cabo usando los algoritmos que desconocen los haplotipos, de esta manera el ensamblaje resultante final representó el genoma de haplotipo colapsado.

10

Resultados

15 Los resultados se muestran en la siguiente **Tabla 11**.

Tabla 11. Copias alélicas identificadas de los genes seleccionados en las cepas de levadura ZDA1, ZDA2, ZDA3, W-34/78 y Levadura híbrida 7.

Nombre del gen	n total basado en la ploidía del cromosoma del portador	Copias identificadas por BLAST (copias completas)	Genoma participante (basado en BLAST)	Copias truncadas
<b>ZDA1</b>				
<i>ILV2</i>	4	1	S. cer=1	1 (S. eub)
<i>ILV6</i>	4	2	S. cer=1 y S. eub=1	
<i>ILV5</i>	5	2	S. cer=1 y S. eub=1	
<i>ILV3</i>	6	4	S. cer=2 y S. eub=2	
<i>BAT1</i>	5 (6)	3	S. cer=2 y S. eub=1	
<i>BAT2</i>	6	3	S. cer=2 y S. eub=1	
<b>ZDA2</b>				
<i>ILV2</i>	5	1	S. cer=1	1 (S. eub)
<i>ILV6</i>	4	2	S. cer=1 y S. eub=1	
<i>ILV5</i>	5	2	S. cer=1 y S. eub=1	
<i>ILV3</i>	6	3	S. cer=1 y S. eub=2	
<i>BAT1</i>	5(6)	2	S. cer=1 y S. eub=1	1 (S. cer)
<i>BAT2</i>	6	2	S. cer=1 y S. eub=1	1 (S. cer)
<b>ZDA3</b>				
<i>ILV2</i>		1	S. cer=1	1 (S. Eub)
<i>ILV6</i>		4	S. cer=1 y S. eub=3	
<i>ILV5</i>		3	S. cer=2 y S. eub=1	
<i>ILV3</i>		2	S. cer=1 y S. eub=1	
<i>BAT1</i>		2	S. cer=1 y S. eub=1	
<i>BAT2</i>		3	S. cer=2 y S. eub=1	
<b>W-34/78</b>				

Nombre del gen	n total basado en la ploidía del cromosoma del portador	Copias identificadas por BLAST (copias completas)	Genoma participante (basado en BLAST)	Copias truncadas
<i>ILV2</i>	3	2	S. cer=1 y S. eub=1	
<i>ILV6</i>	3	1	S. eub=1	
<i>ILV5</i>	3	2	S. cer=1 y S. eub=1	
<i>ILV3</i>	4	2	S. cer=1 y S. eub=1	
<i>BAT1</i>	3	3	S. cer=2 y S. eub=1	
<i>BAT2</i>	4	2	S. cer=1 y S. eub=1	
<b>LEVADURA HÍBRIDA 7</b>				
<i>ILV2</i>	5	1	S. cer=1	
<i>ILV6</i>	5	1	S. cer=1	
<i>ILV5</i>	4	1	S. cer=1	1 (S. eub)
<i>ILV3</i>	4	1	S. eub=1	
<i>BAT1</i>	4	1	S. cer=1	
<i>BAT2</i>	4	1	S. eub=1	

El número entre paréntesis es el modo de ploidía del cromosoma. El número sin los paréntesis es la ploidía de la ubicación del gen en ese cromosoma.

5 *Ejemplo 8 – Ensayo de preparación de cerveza a escala comercial con la cepa de levadura ZDA2 y la cepa comparativa Levadura híbrida 7*

10 El propósito de este ejemplo fue investigar si la cepa de levadura híbrida ZDA2 mostró el mismo perfil de acetilo ventajoso como el observado en los ejemplos previos cuando se aplicó en la preparación de cerveza a escala comercial (aproximadamente 1800 HL) donde la levadura se recolecta y se vuelve a sembrar.

15 Se preparó cerveza de 1800 HL de un mosto que comprende malta y adjunto obtenidos por trituración de infusión convencional y con un °Plato de aproximadamente 16. Antes de la fermentación el mosto se ajustó a un pH de 4.9- 5.0. El mosto se volvió a sembrar con generación de 8 tanto del ZDA2 como del control la cepa de levadura de lager Levadura híbrida 7, y se fermentó a aproximadamente 16 °C. Las muestras se obtuvieron el día 0 y en los días indicados en la siguiente tabla de resultados 12 y se ilustra en la Figura 10.

Tabla 12. Fermentación de 1800 HL a 16°C.

Levadura	Día	Temp °C	°Plato	Diacetilo ppb	pH	Alcohol %Vol	RDF %
ZDA2	0	15.0	16.60		5.00		
	1	15.0	14.25	80.0	4.60		
	2	16.0	11.23	142.0	4.42		
	3	16.0	7.70	200.0	4.29		
	4	16.0	4.95	172.0	4.24		
	5	16.0	2.91	116.0	4.27		
	6	16.0	2.72	51.0	4.35		
	7	16.0	2.70	38.0	4.36	7.64	69.9

Levadura	Día	Temp °C	°Plato	Diacetilo ppb	pH	Alcohol %Vol	RDF %
Levadura híbrida 7	0	15.0	15.90		4.90		
	1	15.0	13.30	822.0	4.54		
	2	16.0	9.73	1387.0	4.37		
	3	16.0	6.85	1622.0	4.27		
	4	16.0	4.17	1469.0	4.23		
	5	16.0	2.39	713.0	4.25		
	6	16.0	2.18	429.0	4.29		
	7	16.0	2.18	148.0	4.28	7.52	71.9

La cepa de levadura ZDA2 produce un nivel muy bajo de diacetilo por toda la fermentación y la cerveza verde obtenida con la cepa de levadura híbrida ZDA2 alcanzó el umbral de sabor del diacetilo (50 ppb) ya en el día 6. En ese tiempo el plato no había disminuido más de 0.5 en las últimas 24 horas. La cerveza verde obtenida con la cepa de levadura de control Levadura híbrida 7, no había alcanzado un umbral de sabor para el diacetilo en el día 7, dos días después de que el plato no disminuyó más de 0.5 durante 24 horas (Figura 10). En consecuencia, las especificaciones para la cerveza verde en términos de diacetilo y plato se alcanzaron a al menos 2 días antes cuando se usó la levadura ZDA2 comparada con la levadura de referencia Levadura híbrida 7.

Interesantemente, la levadura ZDA2 alcanzó un grado real de fermentación (RDF) que fue 2% más bajo que la Levadura híbrida 7, mientras que el porcentaje de alcohol es casi similar en las dos cervezas verdes. En consecuencia, la levadura ZDA es capaz de producir la misma cantidad de alcohol con un grado real más bajo de fermentación, lo cual da por resultado una cerveza con una mejor sensación a la boca. Esta tendencia de 1.5 – 2.5% bajo de RDF en el mismo nivel de alcohol para la levadura ZDA2 se observó a través de las generaciones de fermentaciones que proceden de la 8<sup>a</sup> generación mostrada en este ejemplo (ver tabla 13).

Tabla 13 – RDF y ABV a través de 8 generaciones de fermentativos.

Generación de Levadura		1	2	3	4	5	6	7	8
ZDA2	RDF	68.2	69.5	69	69.5	68.9	69	70.4	69.9
	ABV	7.2	7.5	7.31	7.38	7.43	7.43	7.58	7.64
Levadura híbrida 7	RDF	70.1	70.6	71.1	71.1	71.3	71.3	72.1	71.9
	ABV	7.4	7.28	7.36	7.48	7.47	7.58	7.6	7.52

Ejemplo 9 - Nanoporo híbrido - evaluaciones de secuenciación y bioinformática Illumina de cepas de preparación de cerveza para calcular el número de copias de genes relevantes

Las cepas se secuenciaron usando la plataforma Illumina como se describe previamente.

Para la secuenciación de nanoporos, se preparó ADN de peso molecular ultra alta usando la metodología descrita por Denis et al.

Para preparar el HMW ADN<sub>g</sub> la secuenciación de las muestras se procesaron usando las Columnas Limpias y Concentradoras Genómicas Zymo después se verificaron para calidad y cantidad usando el ensayo fluorométrico de Novix dsDNA Broad Range.

Todas las muestras se multiplexaron y las bibliotecas se generaron al usar la química SQK-LSK109 y los paquetes de Extensión de Código de Barras Nativos EXP-NBD104 y EXP-NBD114 de Oxford Nanopore Technologies. Todos los pasos de limpieza necesarios se llevaron a cabo usando gránulos magnéticos de NA Limpios para NGS. La Secuenciación del Genoma se llevó a cabo en MinION FlowCells FLO-MIN106D durante 48-72h.

Los datos de secuenciación sin procesar se basaron utilizando bonito (<https://github.com/nanoporetech/bonito>) y se demultiplexaron usando guppy (<https://nanoporetech.com/nanopore-sequencing-data-analysis>). Se llevaron a cabo ensambles de Genoma Híbridos usando Marsurca (<https://github.com/alekseyzimin/masurca>) en combinación con los archivos Nanopore e Illumina y los genomas ensamblados se anotaron con prokka. (<https://github.com/tseemann/prokka>). La cobertura de secuenciación y número de copias de los genes de interés se calcularon con qualimap (<http://qualimap.conesalab.org/>) y se visualizaron usando el Integrative Genomics Viewer (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

El mapeo de lectura y la detección de SNP se llevó a cabo en CLC Genomics work Bench (versión 11). Brevemente, las lecturas recortadas se mapearon a un genoma híbrido de levadura “*in silico*” que comprendió una concatenación de los genomas de *S. eubayanus* (Acceso: GCA\_0012986.25.1) y *S. cerevisiae* (GCA\_000146045.2). Usando la herramienta de detección variante básica, se detectaron polimorfismos de nucleótido único (SNP) e inserciones/deleciones (indeles). En este punto, el número de copias funcionales de los genes ILV2 se podría estimar basado en los SNP de diagnóstico que existieron en los alelos individuales dentro de la levadura ZDA.

En los genes ILV2 de *S. cerevisiae* existe un desplazamiento del marco de lectura C’ que inactiva la proteína resultante (Leu575fs) debido a una iniciación de nucleótidos T dentro de este codón. El % del mapeo de lecturas Illumina en esta frecuencia fue de aproximadamente 33% sugiriendo que 1 de 3 copias ILV2sc han sido activadas. Adicionalmente, se observó que en los alelos ILV2 de *S. eubayanus*, una deleción de nucleótido T dio por resultado un desplazamiento del marco de lectura que da por resultado un truncamiento de inactivación (Leu304fs). Sabiendo el número de copias (CN) de genes ILV2 de *cerevisiae* permitió el caculo del número de copias de otros genes basados en el mapeo de lectura como se describe previamente. La estimación del WS34/78 CN también se basó en una estimación basada en el mapeo de lectura ILV2 donde el número de copias se basó en una evidencia previa que una cepa altamente similar (WS34/70) es una levadura tetraploide con el contenido de genoma de *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* (Walther et al.2014). adicionalmente, en el ejemplo 10, cuando se eliminan los alelos ILV2 de *eubayanus*, se observó que WS34/78 en realidad tuvo dos copias de alelos *eubayanus* de ILV2 (un total de 4 alelos de ILV2, incluidos alelos de *S. cerevisiae*). Estos resultados se resumen en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Números de copias funcionales calculados de genes de interés. Cere se refiere a alelos de *cerevisiae* y Eub se refiere a alelos de *eubayanus*.

	Número de copia funcional - ZDA1	Número de copia funcional - ZDA2	Número de copia funcional - WS3478
ILV2_Cere	2	2	2
ILV2_Eub	0	0	2
ILV3_Cere	4	4	2
ILV3_Eub	2	2	2
ILV5_Cere	3	3	1
ILV5_Eub	2	2	2
ILV6_Cere	2	2	1
IIV6_Eub	2	2	3
BAT1_Cere	3	3	4
BAT1_Eub	2	2	2
BAT2_Cere	4	4	2
BAT2_Eub	2	2	3

La cepa WS3478 de referencia tiene 4 copias funcionales del gen ILV2, mientras que ZDA1 y ZDA2 cada una solo tiene 2 copias funcionales de este gen. Además, WS3478 tiene 4 funcionales de ILV3 y 3 funcionales de ILV5, mientras que este número es 6 y 5, respectivamente, para las cepas ZDA1 y ZDA2.

Ejemplo 10 - Adaptaciones de número de copias de genes en la levadura W-34/78 del producto de cerveza modelo

El objetivo general de este experimento fue ajustar los números de copias de los genes relevantes en una cepa

de levadura modelo (cepa de *Saccharomyces pastorianus* ssp. *carlsbergensis* (WS34/78) para reflejarse al fenotipo de ZDA1 y ZDA2. WS34/78 es comercialmente disponible de Weihenstephan, Alemania y también es referida como W-34/78 en la presente. para hacer esto, los genes en la cepa WS34/78 tuvieron que ser ya sea inactivados o adicionalmente expresados de acuerdo con la **Tabla 15**.

5

Tabla 15. Alteraciones necesarias en el genotipo de la cepa WS34/78 para reflejar el genotipo relevante de las cepas con bajo contenido de diacetilo de interés

Gen	Alelo	Alteración
ILV2	<i>S. eubayanus</i>	-2 Copias
ILV3	<i>S. cerevisiae</i>	+2 Copias
ILV5	<i>S. cerevisiae</i>	+2 Copias

10 La inactivación se hizo con la ayuda de casete antibióticos que confieren resistencia que se dirigieron a las secuencias de codificación de los genes de interés (es decir ILV2). En este punto, la secuencia de ADN de codificación (cfs) se eliminó a través de recombinación homóloga en una forma que solo 99 pb de la región N-terminal, y 107 pb de la región C-terminal del gen permaneció. La sobreexpresión de los genes (es decir ILV3 e ILV5) se hizo en una forma que dejó el contexto genómico auténtico intacto, es decir se clonó un casete que comprendió aproximadamente 1 kbp cadena arriba de los cds, los cds, y 0.5 kbp cadena bajo de los cds. De esta manera el casete comprende las secuencias promotoras y terminadoras nativas, y la expresión de las copias de genes adicionales está presumiblemente bajo el control nativo. Adicionalmente, se usó un plásmido de una copia de levadura de modo que el número de copias estuvo bajo el control

15

20 *Transformación de las células WS34/78*

Las cepas WS34/78 de *Saccharomyces pastorianus* ssp. *carlsbergensis* se hicieron competentes para la captación de ADN siguiendo el método descrito por Gietz y Schiestel (DOI: 10.1038/nprot.2007.17). Rutinariamente, las células se transformaron con 1 µg de ADN plasmídico o amplicón de PCR. La duración del tratamiento de choque de calor se redujo a 15 min mientras que la temperatura se mantuvo a 42°C.

25

*Generación de los casetes de expresión*

Basada en la información de secuencia de ADN de la cepa WS34/78 del Ejemplo 9, los casetes de expresión se generaron por amplificación de PCR de las secuencias WS34/78 ADN que comprenden aproximadamente 1000 pb cadena arriba de los 500 pb cadena abajo de los cds, comprendiendo de esta manera las secuencias promotoras y terminadoras nativas. La longitud exacta de los amplicones se puede deducir de las secuencias de cebadores respectivas dadas en los ejemplos. Las regiones de flanco de cds de 1000 pb, o 500 pb, deben permitir el control auténtico/nativo de los genes de interés. Los amplicones de PCR clonados (en el plásmido/integrados en el cromosoma) se controlaron por secuenciación Sanger-ADN con el ADN plasmídico aislado como plantilla para las regiones de secuenciación.

30

35

*Integración cromosómica de los casetes de expresión*

En un primer paso, el casete de expresión se ensambló al fusionar el modelo de expresión génica con un módulo de resistencia a antibióticos que permite la selección positiva del evento de integración. El casete se fusionó a los amplicones PCR que codifican estiramientos de ADN para la recombinación homóloga con el cromosoma de WS34/78. Los sitios para la integración fueron los sitios PAD1 de WS34/78, ya que este gen no es funcional en esta levadura, y el reemplazo de este gen de esta manera has no tiene efecto en el perfil de sabor. Las regiones de flanco usadas para la recombinación homóloga tuvieron una longitud de aproximadamente 500 pb. Los clones de levadura que crecieron en presencia del antibiótico se analizaron por PCR (es decir PCR de colonias), para verificar la inserción del casete. Los clones positivos se analizaron adicionalmente para mutaciones en el módulo de expresión. Los amplicones que cubrieron el módulo de expresión fueron controlados por la secuenciación de Sanger-ADN.

45

50

*Clonación de los genes ILV en el plásmido pYESVIII*

El plásmido pYESVIII (BRAIN;) es un vector lanzadera de levadura de *E. coli* - que se replica en altos números de copias en *E. coli* y se mantuvo en un plásmido de copia individual en las células de levadura debido a el CEN6 ori de replicación. Los casetes de expresión se insertaron rutinariamente en el sitio de múltiple clonación usando el ensamble Gibson.

55

Si dos copias del mismo alelo tuvieron que ser insertadas, de manera preferente una copia del gen de interés (GOI) tuvo la secuencia de ADN auténtica, mientras que el cds de la segunda copia se alteró en una forma que dejó sin alterar la secuencia de proteínas nativas. Esto se logró por síntesis de genes química que emplean algoritmos para optimizar la expresión génica en las células de levadura (optimización de uso de codón). Esto

60

se hizo para reducir las probabilidades de los eventos de recombinación en la transformación del plásmido en las células de levadura.

5 Para la expresión de los genes ILV3 de un plásmido, se ensambló un constructo en tándem (expresión bicistrónica). En este punto, un solo promotor controla la expresión de las dos secuencias de codificación ILV3 (uno nativo, un cds sintético). Las dos secuencias de codificación serán unidas por un ligador de péptidos 2A que permite la omisión ribosómica, de modo que ambos cds se traducen bajo el control del promotor ILV3 nativo. La tecnología de péptido 2A altera la C-terminal de la primera proteína al agregar una etiqueta de 3 aminoácidos (NPG), mientras que N-terminal de la proteína subsecuente comienza con una prolina (Liu, Z. et al., 2017; DOI: 10.1038/s41598-017-02460-2).

10 *E. coli* se transformó con los plásmidos ensamblados *in vitro*, los plásmidos se aislaron de transformantes, se controlaron por digestión de restricción y secuenciación de ADN seguido por transformación de las células WS34/78 competentes.

15 Tabla 16. Cepas y plásmidos usados/construidos en el proyecto. El superíndice sc indica genes de *Saccharomyces cerevisiae* y eu indica genes de *Saccharomyces eubayanus* en la levadura de preparación de cerveza híbrida interespecie WS34/78.

Cepa	Genotipo ILV	Manipulación/Ajuste	Descripción
#1	Nativo	Ninguna (Cepa WT)	Cepa WS34/78 de <i>Saccharomyces pastorianus ssp. carlsbergensis</i>
#2	$\Delta\Delta ilv2eu$	WS34/78 [2x ILV2eu]:: Zeo R	Ambos alelos ILV2 ( <i>S. eubayanus</i> ) inactivados por inserción de ShBle-casete
#3	$\Delta\Delta ilv2eu$ ; ILV3eu +1	Cepa #2; PAD1::ILV3eu	Inserción del casete de expresión de ILV3 ( <i>S. eubayanus</i> ) en el sitio PAD1
#4	Nativo	Plásmido #0	Cepa #1 transformada con plásmido pYESVIII W/O inserto
#5	$\Delta\Delta ilv2eu$ ; ILV5sc +1	Cepa #2, plásmido #1	Cepa #2 que alberga pYESVIII que codifica 1 copia del alelo ILV5sc
#7	$\Delta\Delta ilv2eu$ ; ILV5sc; ILV3eu +1 +1	Cepa #3, plásmido #1	Cepa #3 que alberga pYESVIII que codifica 1 copia del alelo ILV5sc
<b>Plásmidos</b>			
#0	G418R	pYESVIII	Plásmido base; cen6-ori; Marcador de resistencia KanMX
#1	+1 ILV5sc	pYESVIII, 1x ILV5sc	Alelo ILV5sc clonado en plásmido #0

20 Ejemplos/variantes mutantes WS34/78 de *S. pastorianus*

Cepas Recombinantes

25 Generación de la cepa #2

Plantillas para PCR:

30 El plásmido pYES5-Cen6-Sh.ble (sc) 2.0 (BRAIN), que codifica el casete Sh.ble ADN *S. pastorianus* WS34/78, cepa #1 (Tabla. 16)

Cebadores usados:

35 CPA43: SEQ ID NO: 44

CPA44: SEQ ID NO: 45

CPA49: SEQ ID NO: 46

40 CPA50: SEQ ID NO: 47

CPA51: SEQ ID NO: 48

45 CPA52: SEQ ID NO: 49

El casete sh.ble (fragmento 1) se amplificó del plásmido pYES5-Cen6-Sh.ble (*Saccharomyces cerevisiae* (sc)) 2.0 (BRAIN Biotech AG) usando los cebadores CPA43/44. Los brazos de homología se generaron por

amplificación de las regiones de flanqueo y ILV2 (*Saccharomyces eubayanus* (se)) de la cepa de ADN<sub>g</sub> #1 con los cebadores específicos de alelo CPA49/51 (región de flanqueo 5'; fragmento 2) y CPA50/52 (región de flanqueo 3'; fragmento 3). La plantilla de HR se generó con la ayuda de PCR de extensión de solapamiento usando los cebadores CPA49/50 y los fragmentos 1 + 2 + 3 como plantilla. La inactivación específica de alelo de ILV2 (se) a través de la recombinación homóloga fue asistida por la tecnología NUCLEASE patentada por BRAIN. Esto dio por resultado el número de cepas que tuvieron integraciones individuales o dobles en los sitios ILV2 (se) y fue visible sobre un gel de agarosa. Una cepa con una delección doble de ILV2 (se) se eligió para el análisis cadena abajo.

10 Secuencia del casete de inactivación de ILV2 (se): SEQ ID NO: 50

Generación de la cepa #3

Plantillas para PCR:

15 ADN<sub>g</sub> *S. pastorianus* WS34/78, cepa #1 (Tabla. 16)

Casete de NTC-ADN (Nourseothricin); BRAIN Biotech AG

20 Cebadores usados:

CPA70: SEQ ID NO: 51

CPA71: SEQ ID NO: 52

25 CPA91: SEQ ID NO: 53

CPA96: SEQ ID NO: 54

30 CPA111: SEQ ID NO: 55

CPA112: SEQ ID NO: 56

CPA113: SEQ ID NO: 57

35 CPA114: SEQ ID NO: 58

CPA128: SEQ ID NO: 59

40 CPA129: SEQ ID NO: 60

El casete de expresión ILV3 (se) (producto1) se amplificó de la cepa de ADN<sub>g</sub> #1 con los cebadores específicos de alelo CPA70/71. El Producto1 luego se amplificó adicionalmente con los cebadores CPA70/129, dando por resultado el producto2. La amplificación del casete de expresión NTC (producto3) se llevó a cabo con los cebadores CPA91/96 y NTC-DNA-String como plantilla. El Producto4 se generó por amplificación del producto3 con los cebadores CPA91/128. El Producto3 y producto4 se ensamblaron a través del kit de ensamble de ADN NEBuilder<sup>MR</sup> HiFi y se amplificó con los cebadores CPA70/91 para crear el fragmento1. Los brazos de homología se generaron por amplificación de las regiones de flanqueo PAD1 de la cepa de ADN<sub>g</sub> #1 con los cebadores CPA111/112 (región de flanqueo 5'; fragmento 2) y CPA113/114 (región de flanqueo 3'; fragmento 3). El casete de integración de ILV3-NTC final se generó por el ensamble del fragmento 1 + 2 + 3, seguido por amplificación por los cebadores CPA111/114. A fin de generar la cepa #3, cepa #2 se transformó con el casete de integración ILV3-NTC final.

50 Secuencia del casete de integración ILV3 (se) – NTC: SEQ ID NO: 61

55 Plásmidos recombinantes

Construcción del plásmido #1

60 Preparación del Vector

El plásmido #0 (pYESVIII, BRAIN Biotech AG) se linealizó usando el PmeI presente en los múltiples sitios de clonación. Antes de la purificación, se desfosforiló el vector hidrolizado.

65 Generación del inserto del Vector

Plantilla para PCR:

ADNg de *S. pastorianus* WS34/78, cepa #1 (Tabla. 16)

5 cebadores usados:

CPA74: SEQ ID NO: 62

CPA75: SEQ ID NO: 63

10

CPA86: SEQ ID NO: 64

CPA87: SEQ ID NO: 65

15

La expresión de ILV5 (sc) nativo se amplificó de WS34/78 ADNg usando los cebadores específicos de alelo CPA74/75. El inserto del vector luego se generó por amplificación del producto de PCR restante con los cebadores CPA86/87.

20

El vector de expresión ILV5 (plásmido #1) se ensambló a través del ensamble de NEBuilder<sup>MR</sup> HiFi ADN y DH10 $\beta$  de *E. coli* se transformó con el producto de reacción.

Después de la preparación del plásmido el casete de expresión se analizó por la secuenciación de Sanger-ADN. Secuencia del casete de expresión ILV5 (sc): SEQ ID NO: 66

25

Ejemplo 11 - Otras adaptaciones del número de copias de genes en la levadura de cerveza modelo WS34/78

El propósito de este experimento fue similar al Ejemplo 10, es decir para generar las cepas de levadura WS34/78 genéticamente modificadas adicionales para ajustar los números de copias de los genes relevantes para reflejar el fenotipo de ZDA1 y ZDA2.

30

*PCR de los genes de Saccharomyces cerevisiae nativos*

Los genes de *S. cerevisiae* ILV3, BAT1, BAT2, y ILV6, junto con sus regiones promotoras y terminadoras nativas se amplificaron de la levadura lager Weihenstephan 34/78 (W34/78) usando los cebadores SEQ ID no 67 a SEQ ID no 74 y la ADN Polimerasa de Alta Fidelidad Phusion<sup>®</sup> (New England BioLabs). Las regiones al promotor nativo diana y el terminador se seleccionaron aproximadamente 1000 pares base cadena arriba de codón de paro (promotor) y 400 pares base en la dirección 3' del codón de paro (terminador) de acuerdo con la literatura previa (Mumberg et al, 1995). El ADN genómico usado como plantilla para las reacciones de PCR se extrajo de la levadura W34/78 usando el Kit de Purificación de ADN de Levadura MasterPure fact No MPY80200 de Lucigen.

40

Los cebadores usados para amplificar en la dirección 5' y en la dirección 3' de los genes *S. cerevisiae* deseados:

45

ScILV3\_F: SEQ ID NO: 67

ScILV3\_R: SEQ ID NO: 68

ScBAT1\_F: SEQ ID NO: 69

50

ScBAT1\_R: SEQ ID NO: 70

ScBAT2\_F: SEQ ID NO: 71

55

ScBAT2\_R: SEQ ID NO: 72

ScILV6\_F: SEQ ID NO: 73

ScILV6\_R: SEQ ID NO: 74

60

Clonación de los fragmentos de PCR en los vectores de plásmidos por el Ensamble de Gibson Assembly y Transformación en las células de *E. coli*

Los fragmentos de PCR puros se clonaron en un vector de copias individuales centroméricas que contienen el marcador de resistencia kanMX G418. En algunos casos, los genes se combinaron para crear plásmidos que contienen más de un gen. pSH67 de Euroscarf ([http://www.euroscarf.de/plasmid\\_details.php?accno=P30673](http://www.euroscarf.de/plasmid_details.php?accno=P30673))

65

se linealizó con PvuII-HF (New England BioLabs) a 37 °C durante 60 minutos para eliminar el constructo de expresión Cre. El plásmido linealizado luego se ligó con T7 ADN ligasa (New England BioLabs) a 25 °C durante la noche. El plásmido ligado se transformó en células competentes de *Escherichia coli* NEB 5α (New England BioLabs) y se sembraron en placas de agar de Caldo Lysogeny (LB) que contiene ampicilina (100 µg/ml). Este plásmido luego se usó como una cadena principal para inserción de los genes de interés.

El vector digerido con PvuII-HF y los insertos amplificados con PCR se ensamblaron usando el Ensamble de ADN NEBuilder® HiFi (New England BioLabs). Se usó una relación de 3:1 de inserto a vector y la reacción se incubó a 50 °C durante 60 minutos. La reacción luego se transformó en células competentes de *E. coli* NEB 5α (New England BioLabs) y se sembraron en placas de agar LB que contienen ampicilina (100 µg/ml). Los clones se hicieron crecer en medio líquido LB con la ampicilina (100 µg/ml) y el plásmido se extrajo usando el Kit Plasmid MiniPrep (New England BioLabs).

Los plásmidos de copias individuales creados en este estudio fueron:

1. pSH67-ScILV3
2. pSH67-ScILV3-ScBAT1
3. pSH67-ScILV3-ScBAT2
4. pSH67-ScILV6
5. pSH67-ScBAT2

*Transformación de levadura con vectores y levaduras construidas*

Weihenstephan 34/78 y cepa #2 de las levaduras del ejemplo 10 (Weihenstephan 34/78 con dos copias de genes ILV2 de *S. eubayanus* suprimidas también llamadas WS34/78 [2x ILV2eu]: Zeo R) se transformaron con los plásmidos a través de electroporación siguiendo el protocolo descrito por Benatuil et al. 2010. Se hicieron algunas modificaciones menores: la levadura se hizo crecer a 25 °C y se recuperó durante 2-3 horas después de la electroporación, y las células se sembraron en placas de agar YPD que contiene genética G418 (200 µg/ml).

Las levaduras generadas en ese estudio se muestran en la siguiente Tabla 17.

Tabla 17. Levaduras generadas por transformación de plásmidos de copia individual

Nombre de la cepa de levadura	Antecedentes de la levadura	Plásmido insertado
FGMG100	W34/78	pSH67-ScILV3-ScBAT2
FGMO101	W34/78	pSH67-ScILV6
FGMO102	W34/78	pSH67-ScBAT2
FGMO103	W34/78	pSH67-ScILV3
FGMO104	W34/78	sin inserto de pSH67 (vacío)
FGMO105	W34/78	pSH67-ScILV3-ScBAT1
FGMG0095	WS34/78 [2x ILV2eu]: Zeo R	pSH67-ScILV6
FGMO0096	WS34/78 [2x ILV2eu]: Zeo R	pSH67-ScILV3
FGMG0097	WS34/78 [2x ILV2eu]: Zeo R	pSH67-ScILV3-ScBAT2
FGMO0098	WS34/78 [2x ILV2eu]: Zeo R	pSH67-ScBAT2
FGMG0099	WS34/78 [2x ILV2eu]: Zeo R	pSH67-ScILV3-ScBAT1

Ejemplo 12 - Evaluación de las propiedades de fermentación de las cepas WS34/78 modificadas

Las cepas se fermentaron en recipiente cilíndricos como se describe previamente. Las células se hicieron crecer durante la noche en 10 ml de YPD líquido que contiene 25 µg/ml de gentamicina (G418) antes de ser

## ES 2 991 537 T3

transferido a 20 ml del mosto de pilsner previamente descrito que contiene 100 µg/ml de G418. El sembrado celular se llevó a cabo como se describe previamente en el mosto de pilsner que contiene 100 µg/ml de G418. Se hicieron las mediciones de Plato, Diacetilo y volátiles en los Días 3, 4 y 5 de las fermentaciones. En el día 5, se tomaron perfiles de carbohidratos y muestras de perfil de éster.

5

Los genotipos de la cepa de levadura probados se muestran en la siguiente Tabla 18.

Tabla 18. Levadura genéticamente modificada creada en los ejemplos 10 y 11 probada en este ejemplo.

Nombre de la cepa	Características de la resistencia	Genotipo	Fuente
FGMO 0092	Resistente a G418	WS34/78 Control de plásmido 0 (pYESVIII; sin inserto)	WS34/78
FGMO 0093	Resistente a G418 + Zeocina	2x ILV2eu KO: inserto de Zeocina, 1x copia de ILV5cer pYESVIII	Cepa #2 del Ejemplo 10
FGMO 0094	Resistencia a G418 + Zeocina + Nourseotricina	2x ILV2eu KO: inserto de Zeocina, 1x copia de ILV5cer pYESVIII, 1x ILV3eu inserto: KO PDC1	Cepa #2 del Ejemplo 10
FGMO 0095	Resistencia a G418 + Zeocina	ΔΔ Seu ILV2 Sc ILV6-G418	Cepa #2 del Ejemplo 10
FGMO 0096	Resistencia a G418 + Zeocina	ΔΔ Seu ILV2 Sc ILV3-G418	Cepa #2 del Ejemplo 10
FGMO 0100	Resistente a G418	WS34/78 Sc ILV3 - Sc BAT 2 -G418	WS34/78
FGMO 0101	Resistente a G418	WS34/78 Sc ILV 6 - G418	WS34/78
FGMO 0102	Resistente a G418	WS34/78 Sc BAT 2 - G418	WS34/78
FGMO 0103	Resistente a G418	WS34/78 Sc ILV 3 - G418	WS34/78
FGMO 0104	Resistente a G418	WS34/78 vector vacío G418	WS34/78
FGMO 0105	Resistente a G418	WS34/78 Sc ILV 3 - fBAT 1 - G418	WS34/78

10

Los resultados de la fermentación con cada cepa de levadura se resumen en las siguientes Tablas 19 y 20.

Tabla 19. Resultados de la fermentación con levadura genéticamente modificada creada en los ejemplos 10 y 11 (diacetilo total).

15

Nombre de la cepa	Diacetilo total			Plato		
	Día 3	Día 4	Día 5	Día 3	Día 4	Día 5
FGMO0092	319	216	170	10	7.6	5.5
FGMO0093	209	140	94	8.9	6.4	4.8
FGMO0094	184	123	87	9.2	6.4	4.9
FGMO0095	315	191	153	8.9	7.1	6.2
FGMO0096	201	121	97	8.6	5.5	4.4
FGMO0100	329	187	142	7.9	5.1	3.4
FGMO0101	293	167	153	7.6	4.4	3.3
FGMO0102	370	244	269	8	5.1	4.4
FGMO0103	396	234	197	7.8	4.4	4

FGMO0104	265	180	167	7.4	4	3.4
FGMO0105	279	203	154	8.1	4.7	3.5

Tabla 20. Resultados de la fermentación con la levadura genéticamente modificada creada en los ejemplos 10 y 11 (relación de Propanol/Isobutanol). n.m. = no medido.

Nombre de la cepa	Relación de Propanol/Isobutanol		Plato		
	Día 4	Día 5	Día 3	Día 4	Día 5
FGMO0092	1.9	1.6	10	7.6	5.5
FGMO0093	3.04	3.3	8.9	6.4	4.8
FGMO0094	2.92	n.m.	9.2	6.4	4.9
FGMO0095	2.97	2.77	8.9	7.1	6.2
FGMO0096	2.71	2.93	8.6	5.5	4.4
FGMO0100	1.55	1.44	7.9	5.1	3.4
FGMO0101	1.85	1.87	7.6	4.4	3.3
FGMO0102	1.32	1.37	8	5.1	4.4
FGMO0103	1.76	1.68	7.8	4.4	4
FGMO0104	1.69	1.64	7.4	4	3.4
FGMO0105	1.64	1.64	8.1	4.7	3.5

5

Se debe observar, que las cepas genéticamente modificadas de este ejemplo se fermentaron en presencia de antibióticos, y los resultados anteriores podrían por lo tanto ser ligeramente significativos cuando las cepas se fermenten industrialmente sin la presencia de antibióticos. En particular, las cepas probablemente tendrán una velocidad de crecimiento más rápida, y la fermentación de esta manera procederá más rápido. Similarmente, la reducción del diacetilo inicialmente producido también se espera que proceda más rápido.

10

La cepa con la cantidad más baja de diacetilo total en la solución de prueba en el día 5 fue la cepa con dos copias del gen ILV2 suprimido, una copia extra de ILV3 integrada genómicamente y una copia extra de ILV5 expresada de un plásmido de una copia (FGMO0094).

15

Listado de secuencias

SEQ ID NO:1	Cebador directo específico de diana <i>ILV2 S. cerevisiae</i> y <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:2	Cebador inverso específico de diana <i>ILV2 S. cerevisiae</i> y <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:3	Sonda específica del alelo <i>ILV2 de S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:4	Sonda específica del alelo <i>ILV2 de S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:5	ZDA1 ILV2
SEQ ID NO:6	ZDA1 ILV6 -tig00000158
SEQ ID NO:7	ZDA1 ILV6 -tig00002562
SEQ ID NO:8	ZDA1 ILV5 -tig00000010
SEQ ID NO:9	ZDA1 ILV5 -tig000052675
SEQ ID NO:10	ZDA1 ILV3 -tig00000103
SEQ ID NO:11	ZDA1 ILV3 -tig00002552
SEQ ID NO:12	ZDA1 ILV3 -tig00000090
SEQ ID NO:13	ZDA1 ILV3 -tig00000096
SEQ ID NO:14	ZDA1 BAT1 -tig00000105
SEQ ID NO:15	ZDA1 BAT1 -tig00000101
SEQ ID NO:16	ZDA1 BAT1 -tig000052676
SEQ ID NO:17	ZDA1 BAT2 -tig00000102
SEQ ID NO:18	ZDA1 BAT2 -tig00000090
SEQ ID NO:19	ZDA1 BAT2 -tig00002552
SEQ ID NO:20	ZDA2 ILV2
SEQ ID NO:21	ZDA2 ILV6 -tig00015333
SEQ ID NO:22	ZDA2 ILV6 -tig00000147
SEQ ID NO:23	ZDA2 ILV5 -tig00000655

SEQ ID NO:24	ZDA2 ILV5 -tig00000022
SEQ ID NO:25	ZDA2 ILV3 -tig00000088
SEQ ID NO:26	ZDA2 ILV3 -tig00000672
SEQ ID NO:27	ZDA2 ILV3 -tig00000669
SEQ ID NO:28	ZDA2 BAT1 -tig00000115
SEQ ID NO:29	ZDA2 BAT1 -tig00015328
SEQ ID NO:30	ZDA2 BAT2 -tig00000088
SEQ ID NO:31	ZDA2 BAT2 -tig00000669
SEQ ID NO:32	Referencia ILV2 <i>S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:33	Referencia ILV6 <i>S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:34	Referencia ILV5 <i>S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:35	Referencia ILV3 <i>S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:36	Referencia BAT1 <i>S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:37	Referencia BAT2 <i>S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:38	Referencia ILV2 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:39	Referencia ILV6 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:40	Referencia ILV5 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:41	Referencia ILV3 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:42	Referencia BAT1 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:43	Referencia BAT2 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:44	CPA43
SEQ ID NO:45	CPA44
SEQ ID NO:46	CPA49
SEQ ID NO:47	CPA50
SEQ ID NO:48	CPA51
SEQ ID NO:49	CPA52
SEQ ID NO:50	Casete de inactivación ILV2 (se)
SEQ ID NO:51	CPA70
SEQ ID NO:52	CPA71
SEQ ID NO:53	CPA91
SEQ ID NO:54	CPA96
SEQ ID NO:55	CPA111
SEQ ID NO:56	CPA112
SEQ ID NO:57	CPA113
SEQ ID NO:58	CPA114
SEQ ID NO:59	CPA128
SEQ ID NO:60	CPA129
SEQ ID NO:61	Casete de integración ILV3 (se) NTC
SEQ ID NO:62	CPA74
SEQ ID NO:63	CPA75
SEQ ID NO:64	CPA86
SEQ ID NO:65	CPA87
SEQ ID NO:66	Casete de expresión ILV5 (sc)
SEQ ID NO:67	ScILV3_F
SEQ ID NO:68	ScILV3_R
SEQ ID NO:69	ScBAT1_F
SEQ ID NO:70	ScBAT1_R
SEQ ID NO:71	ScBAT2_F
SEQ ID NO:72	ScBAT2_R
SEQ ID NO:73	ScILV6_F
SEQ ID NO:74	ScILV6_R

## Referencias

- 5 Lorenzo Benatuil, Jennifer M. Perez, Jonathan Belk, Chung-Ming Hsieh, An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries, *Protein Engineering, Design and Selection*, Volume 23, Issue 4, April 2010, Pages 155–159, <https://doi.org/10.1093/protein/gzq002>
- Briggs, D. E. et al. *Malting and Brewing science*. 1981.
- 10 Denis E, Sanchez S, Mairey B et al. Extracting high molecular weight genomic DNA from *Saccharomyces cerevisiae*, *Protocol Exchange* DOI 10.1038/protex.2018.076

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

Gutierrez 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 J Inst Brew 2018 DOI 10.1002/jib.512

5

Mumberg D, Müller R, Funk M

Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds Gene 1995;156:119-22.

10

doi: 10.1016/0378-1119(95)00037-7

Walther A, Hesselbart A, Wendland J. Genome Sequence of Saccharomyces Carlsbergensis, the World's First Pure Culture Lager Yeast G3 (Bethesda) 2014;4:783-93.

**REIVINDICACIONES**

1. Una cepa de levadura caracterizada porque codifica dentro de su genoma para:
- 5 a. como máximo dos genes funcionales que codifican para ILV2, en donde cada gen que codifica para ILV2 codifica para ScILV2 de SEQ ID NO: 32 o SeILV2 de SEQ ID NO: 38, o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo; y
- 10 b. al menos cinco genes funcionales, tal como al menos seis genes funcionales que codifican para ILV3, en donde cada gen que codifica para ILV3 codifica para ScILV3 de SEQ ID NO: 35 o SeILV3 de SEQ ID NO: 41, o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
2. La cepa de levadura según la reivindicación 1, en donde dicha cepa de levadura codifica dentro de su genoma para al menos cuatro genes funcionales que codifican para ILV5, tal como al menos cinco genes
- 15 funcionales que codifican para ILV5, en donde cada gen que codifica para ILV5 codifica para ScILV5 de SEQ ID NO: 34 o SeILV5 de SEQ ID NO: 40, o un homólogo funcional que comparte al menos 80% de identidad de secuencia con el mismo.
3. La cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los genes que
- 20 codifican para ILV2, ILV3 y/o ILV5 se expresan a partir de sus promotores nativos, opcionalmente en donde los genes que codifican ILV6, BAT1 y/o BAT2 se expresan a partir de sus promotores nativos
4. La cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha cepa de levadura no comprende ningún ADN heterólogo y/o dicha cepa de levadura no se ha sometido a un paso de
- 25 ingeniería genética.
5. La cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha cepa de levadura tiene como máximo 15 genes funcionales que codifican para ILV3, tal como entre 5 y 10 genes
- 30 funcionales que codifican para ILV3, tal como entre 5 y 6 genes funcionales que codifican para ILV3, y/o
- en donde dicha cepa de levadura tiene como máximo 15 genes funcionales que codifican ILV5, tal como entre 4 y 10 genes funcionales que codifican ILV5, tal como entre 4 y 5 genes funcionales que codifican ILV5 y/o en donde dicha cepa de levadura tiene como máximo cuatro genes funcionales que codifican ILV6, en donde cada
- 35 gen que codifica ILV6 codifica ScILV6 de SEQ ID NO: 33 o SeILV6 de SEQ ID NO: 39, o un homólogo que comparte al menos un 80% de identidad de secuencia con la misma, y/o
- en donde dicha cepa de levadura tiene al menos tres genes funcionales, tales como al menos cuatro genes
- 40 funcionales que codifican BAT1, en donde cada gen que codifica BAT1 codifica ScBAT1 de SEQ ID NO: 36 o SeBAT1 de SEQ ID NO: 42, o un homólogo que comparte al menos un 80 % de identidad de secuencia con el mismo, y/o
- en donde dicha cepa de levadura tiene al menos cuatro genes funcionales, tales como al menos cinco genes
- 45 funcionales que codifican BAT2, en donde cada gen que codifica BAT2 codifica ScBAT2 de SEQ ID NO: 37 o SeBAT2 de SEQ ID NO: 43, o un homólogo que comparte al menos un 80 % de identidad de secuencia con el mismo.
6. La cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la suma de los genes
- 50 funcionales en dicha cepa de levadura que codifica ILV2 e ILV6 es menor que la suma de los genes funcionales que codifican ILV5 e ILV3.
7. La cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la relación de genes
- 55 funcionales en dicha cepa de levadura de ILV5 y ILV3 vs. ILV2 es al menos 1, tal como al menos 1.5, tal como al menos 2, tal como al menos 2.5 o tal como al menos 3 y/o la relación génica funcional en dicha cepa de levadura de ILV5 y ILV3 vs. ILV2 y ILV6 es al menos 1, tal como al menos 1.2, tal como al menos 1.4, tal como al menos 1.6, tal como al menos 1.8 o tal como al menos 2.
8. La cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha cepa de levadura porta una mutación en o una delección de uno o más ILV2 genes y/o dicha cepa de levadura porta una
- 60 mutación de desplazamiento de marco en uno o más ILV2 - genes y/o dicha cepa de levadura porta una mutación que da como resultado una expresión menor o nula de una o más ILV2 genes.
9. La cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha cepa de levadura es capaz de producir una solución de ensayo fermentada tras la incubación 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
- 65 al menos 10° Pla, en donde dicha solución de ensayo fermentada contiene como máximo 60 ppb de diacetilo en el punto de tiempo más temprano cuando el extracto aparente de dicha solución de ensayo no ha disminuido

en más de 0,50° Pla en las 24 horas anteriores, en donde dicha fermentación ocurre a una temperatura de como máximo 18 °C.

5 10. La cepa de levadura según la reivindicación 9, en donde dicha cepa de levadura es capaz de generar al menos 4,0 ml/l de etanol por °Plato, cuando dicha cepa de levadura se incubaba en dicha solución de ensayo.

11. La cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha cepa de levadura es capaz de crecer en medios con melibiosa como única fuente de carbono.

10 12. La cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde dicha solución de ensayo fermentada contiene como máximo 60 ppb de diacetilo, tal como como como máximo 55 ppb de diacetilo, tal como como como máximo 50 ppb de diacetilo, tal como como como máximo 45 ppb de diacetilo, tal como como como máximo 40 ppb de diacetilo.

15 13. La cepa de levadura según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde dicho extracto acuoso fermentado contiene al menos 25 mg/L de propanol, tal como al menos 30 mg/L de propanol y/o en donde dicho extracto acuoso fermentado contiene como máximo 8 mg/L de isobutanol, tal como como como máximo 6 mg/L de isobutanol y/o en donde dicho extracto acuoso fermentado contiene una relación de propanol:isobutanol de al menos 2.0, tal como al menos 2.5, tal como al menos 3.0, tal como al menos 4.0, tal como al menos 5.0, tal como al menos 5.5.

20 14. Un método para producir un extracto acuoso fermentado, comprendiendo dicho método las etapas de:

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

ii) proporcionar una cepa de levadura de la especie *Saccharomyces pastorianus*, en donde dicha cepa de levadura es según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13; y

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

15. Un método para producir una bebida, comprendiendo dicho método las etapas de:

35 i. preparar un extracto acuoso fermentado según la reivindicación 14, y

ii. procesar dicho extracto acuoso fermentado en una bebida,

en donde las etapas de procesamiento comprenden uno o más de los siguientes:

40 i. Filtración,

ii. Carbonatación, carbonatación,

45 iii. Maduración, o

iv. Embotellado.

50 16. Una bebida preparada mediante el método según la reivindicación 15, en donde dicha bebida tiene una relación propanol:isobutanol de al menos 3.0, tal como al menos 4.0, tal como al menos 5.0, tal como al menos 5.5.

17. La bebida según la reivindicación 16, en donde dicha bebida es una cerveza.

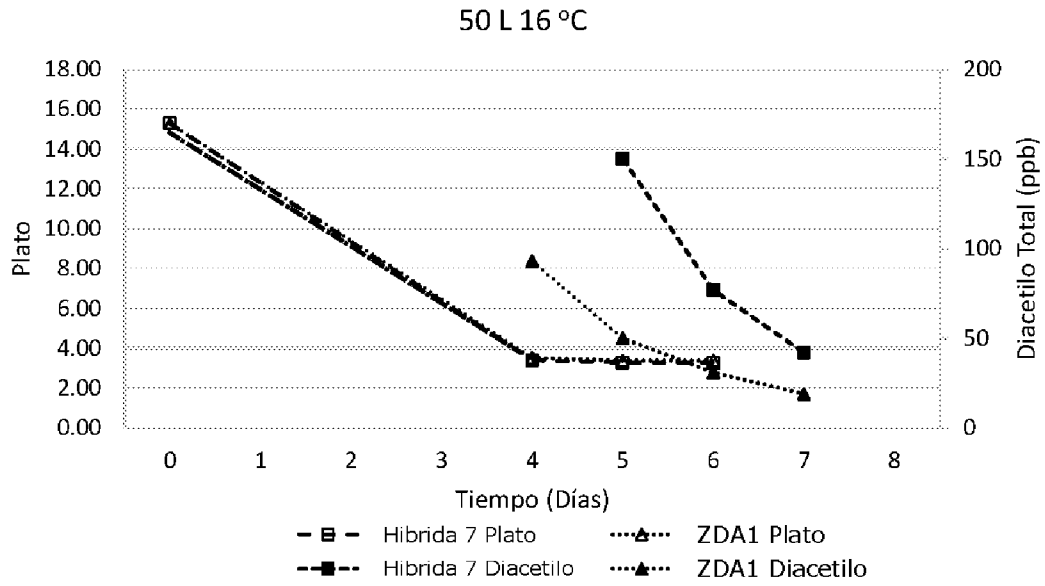
55 18. La bebida según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 17, en donde dicha bebida contiene

al menos 25 mg/L de propanol, tal como al menos 30 mg/L de propanol y/o

como máximo 8 mg/L de isobutanol, tal como como como máximo 6 mg/L de isobutanol.

Figura 1

A)



B)

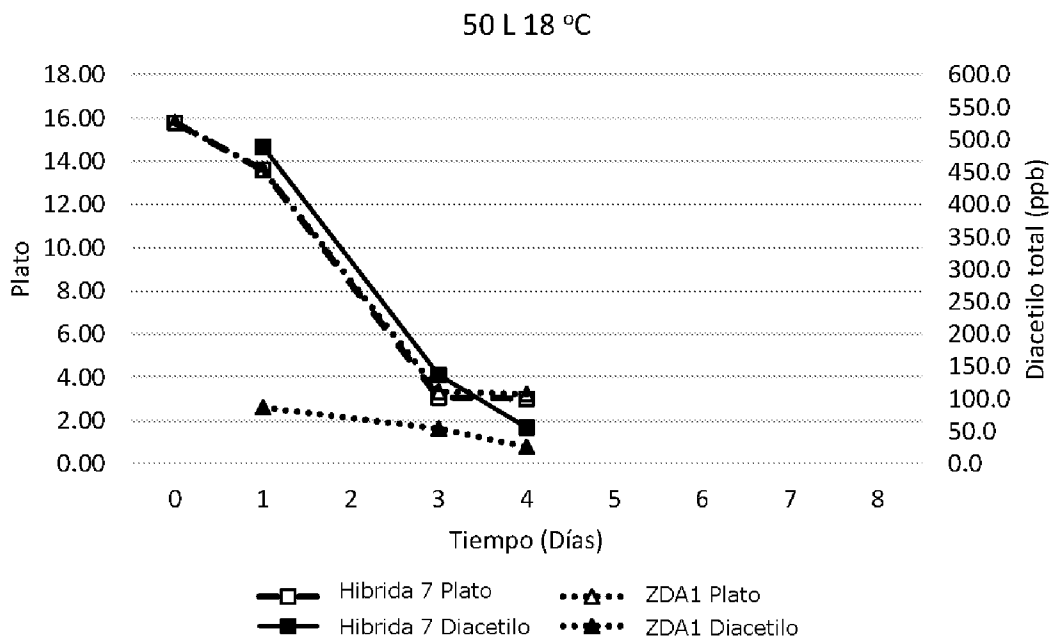


Figura 1

c)

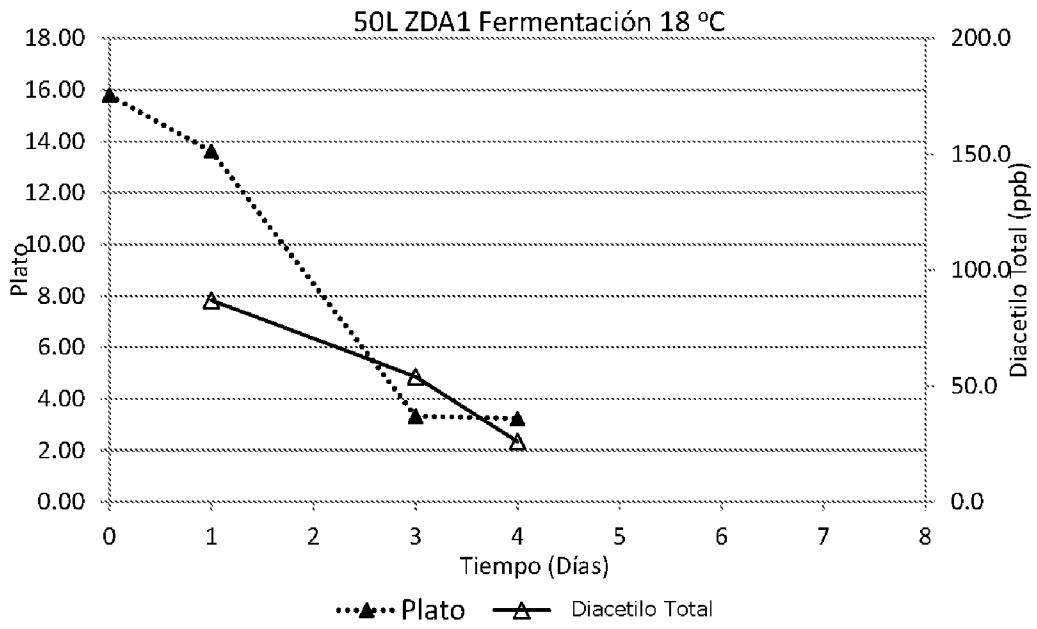
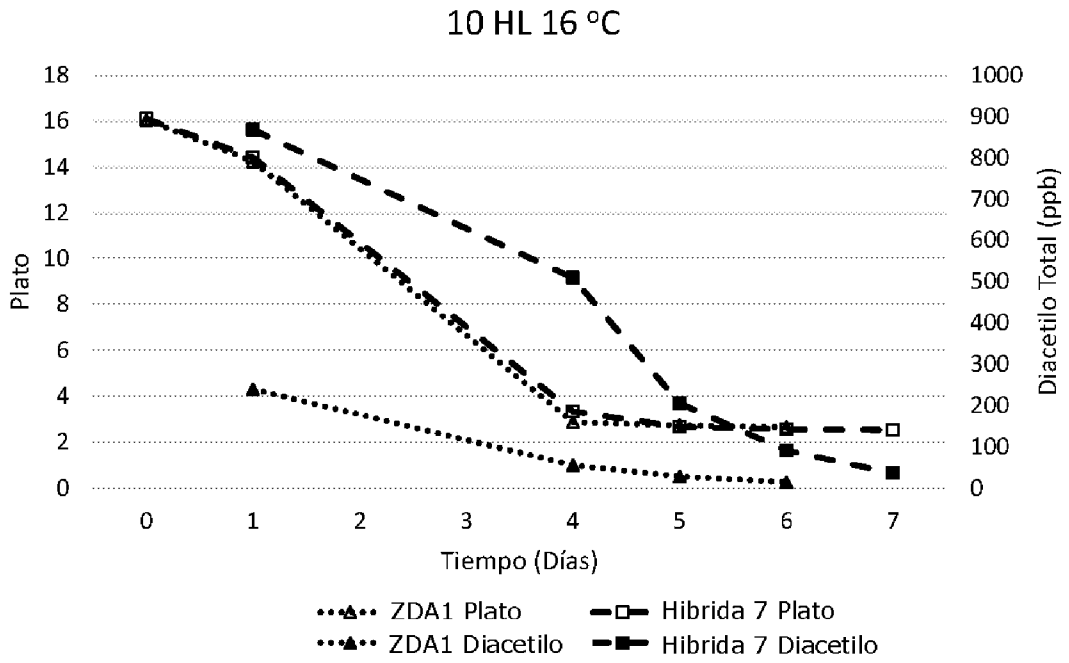


Figura 2

A)



B)

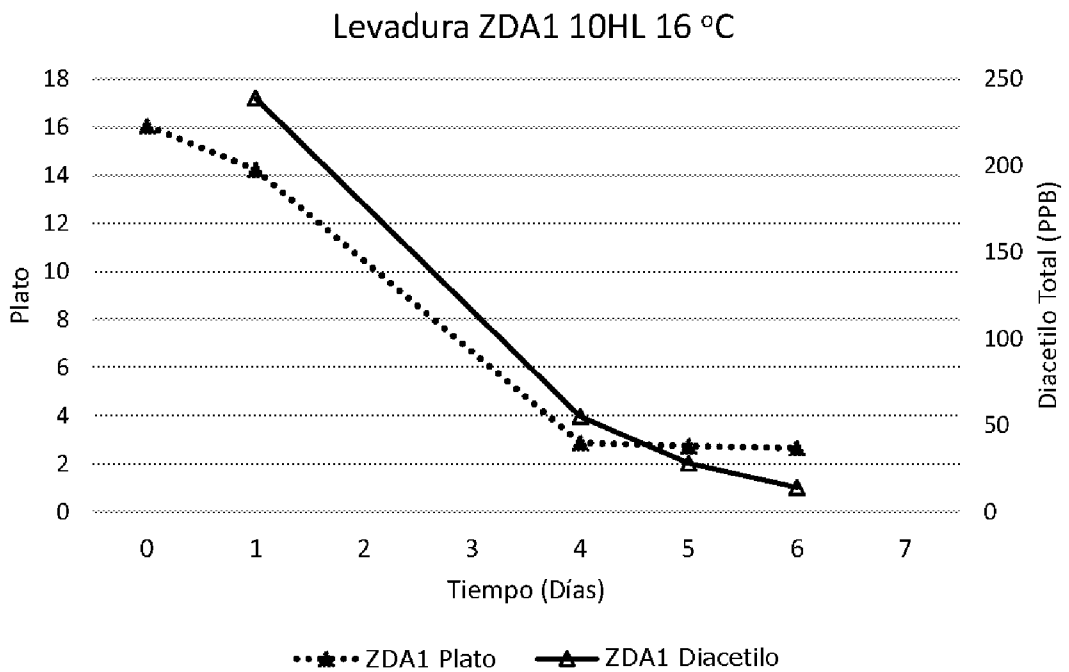
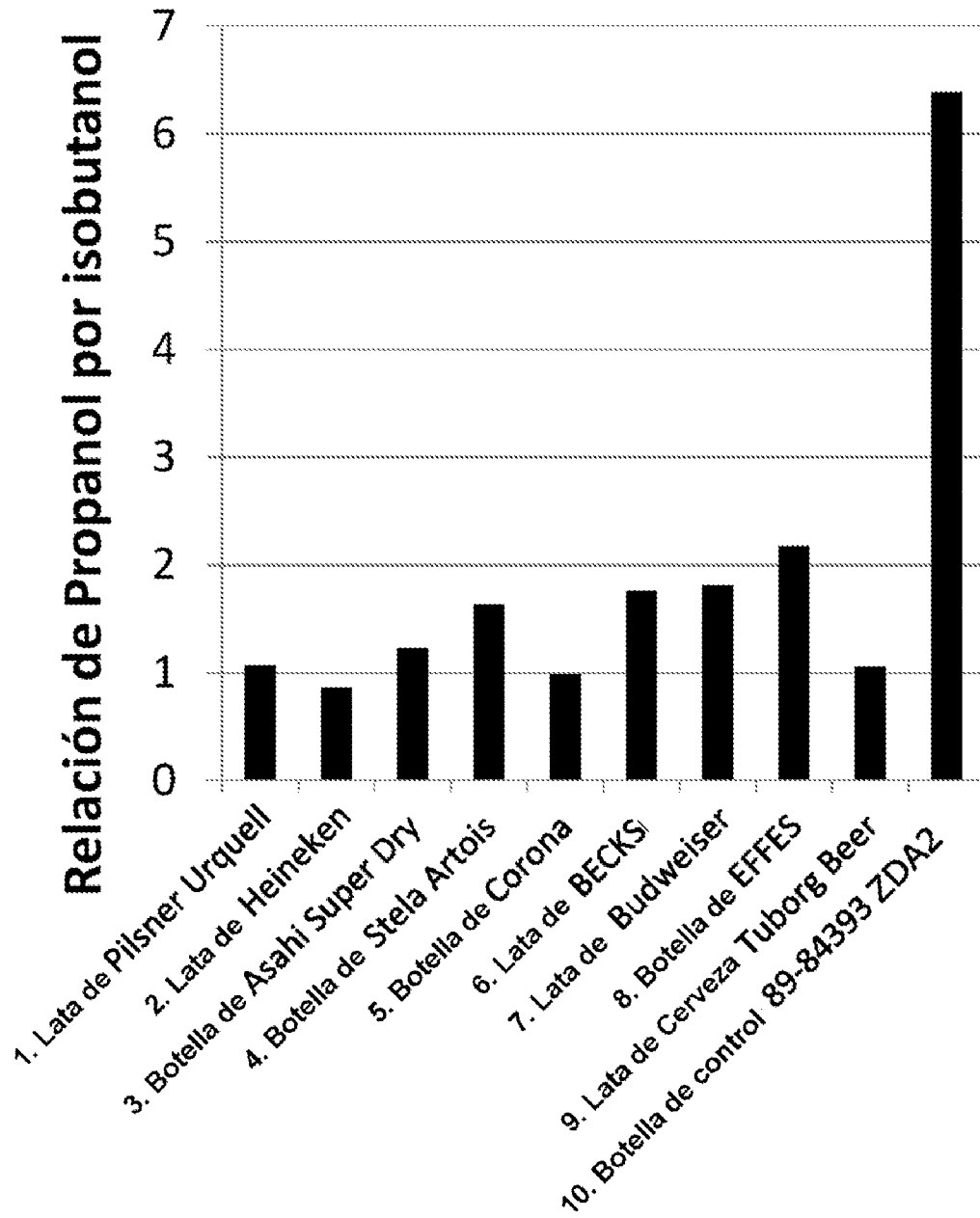


Figura 3





ZDA3_tig00000777_selection	VYDAIHNSDKNFVLPKHEQAGHMAEGYARASGKPGVVLVTSQPGATNVVITPMADAFAD
ZDA1_tig00052670_pilon_selection	VYDAIHNSDKNFVLPKHEQAGHMAEGYARASGKPGVVLVTSQPGATNVVITPMADAFAD
Hybrid7-tig00001282_pilon_select	VYDAIHNSDKNFVLPKHEQAGHMAEGYARASGKPGVVLVTSQPGATNVVITPMADAFAD
WS34-78-tig00000023_pilon_select	VYDAIHNSDKNFVLPKHEQAGHMAEGYARASGKPGVVLVTSQPGATNVVITPMADAFAD
ZDA2-tig00000665_pilon_selection	VYDAIHNSDKNFVLPKHEQAGHMAEGYARASGKPGVVLVTSQPGATNVVITPMADAFAD
ILV2_cer	VYDAIHNSDKNFVLPKHEQAGHMAEGYARASGKPGVVLVTSQPGATNVVITPMADAFAD
ILV2_eub	VYDAIHNSDKNFVLPKHEQAGHMAEGYARASGKPGVVLVTSQPGATNVVITPMADAFAD
WS34-78-tig00000031_pilon_select	VYDAIHNSDKNFVLPKHEQAGHMAEGYARASGKPGVVLVTSQPGATNVVITPMADAFAD
	*****,*****,******,******,******,******,******,******,*
ZDA3_tig00000777_selection	GIPMVVFTGQVFTSAIGTDAFQADVVGISRSCTKNNVMVKSVEELPLRINEAFEIATSG
ZDA1_tig00052670_pilon_selection	GIPMVVFTGQVFTSAIGTDAFQADVVGISRSCTKNNVMVKSVEELPLRINEAFEIATSG
Hybrid7-tig00001282_pilon_select	GIPMVVFTGQVFTSAIGTDAFQADVVGISRSCTKNNVMVKSVEELPLRINEAFEIATSG
WS34-78-tig00000023_pilon_select	GIPMVVFTGQVFTSAIGTDAFQADVVGISRSCTKNNVMVKSVEELPLRINEAFEIATSG
ZDA2-tig00000665_pilon_selection	GIPMVVFTGQVFTSAIGTDAFQADVVGISRSCTKNNVMVKSVEELPLRINEAFEIATSG
ILV2_cer	GIPMVVFTGQVFTSAIGTDAFQADVVGISRSCTKNNVMVKSVEELPLRINEAFEIATSG
ILV2_eub	GIPMVVFTGQVFTSAIGTDAFQADVVGISRSCTKNNVMVKSVEELPLRINEAFEIATSG
WS34-78-tig00000031_pilon_select	GIPMVVFTGQVFTSAIGTDAFQADVVGISRSCTKNNVMVKSVEELPLRINEAFEIATSG
	*****,*****,******,******,******,******,******,******,*

Figura 4B

ZDA3_tig00000777_selection	REGPVLVLPKDVTAAILRNPIFTKTTLPSNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAK
ZDA1_tig00052670_pilon_selection	REGPVLVLPKDVTAAILRNPIFTKTTLPSNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAK
Hybrid7-tig00001282_pilon_select	REGPVLVLPKDVTAAILRNPIFTKTTLPSNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAK
WS34-78-tig00000023_pilon_select	REGPVLVLPKDVTAAILRNPIFTKTTLPSNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAK
ZDA2-tig00000665_pilon_selection	REGPVLVLPKDVTAAILRNPIFTKTTLPSNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAK
ILV2_cer	REGPVLVLPKDVTAAILRNPIFTKTTLPSNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAK
ILV2_eub	REGPVLVLPKDVTAAILRNPIFTKTTLPSNALNQLTSRTQDEFVLQMINRAADLINLAK
WS34-78-tig00000031_pilon_select	REGPVLVLPKDVTAAILRNPIFTKTTLPSNALNQLTSRTQDEFVLQMINRAADLINLAK
	*****;*. **.******
ZDA3_tig00000777_selection	KEVLYVGAGILNHADGPRLLKELSDRAQIPVTTTLQGLGSFDQEDPKSLDMFGMHCATA
ZDA1_tig00052670_pilon_selection	KEVLYVGAGILNHADGPRLLKELSDRAQIPVTTTLQGLGSFDQEDPKSLDMFGMHCATA
Hybrid7-tig00001282_pilon_select	KEVLYVGAGILNHADGPRLLKELSDRAQIPVTTTLQGLGSFDQEDPKSLDMFGMHCATA
WS34-78-tig00000023_pilon_select	KEVLYVGAGILNHADGPRLLKELSDRAQIPVTTTLQGLGSFDQEDPKSLDMFGMHCATA
ZDA2-tig00000665_pilon_selection	KEVLYVGAGILNHADGPRLLKELSDRAQIPVTTTLQGLGSFDQEDPKSLDMFGMHCATA
ILV2_cer	KEVLYVGAGILNHADGPRLLKELSDRAQIPVTTTLQGLGSFDQEDPKSLDMFGMHCATA
ILV2_eub	KEVLYVGAGILNHADGPRLLKELSDRAQIPVTTTLQGLGAEDQDDPKSLDMFGMHCATA
WS34-78-tig00000031_pilon_select	KEVLYVGAGILNHADGPRLLKELSDRAQIPVTTTLQGLGAEDQDDPKSLDMFGMHCATA
	*****;*. **.******

Figura 4C

ZDA3_tig00000777_selection	NLAVQNADLLI IAVGAREFDDRVIGNISKFAPEARRAAAEGRGGI IHFEVSPKNINKVVQTQ
ZDA1-tig00052670_pilon_selection	NLAVQNADLLI IAVGAREFDDRVIGNISKFAPEARRAAAEGRGGI IHFEVSPKNINKVVQTQ
Hybrid7-tig00001282_pilon_select	NLAVQNADLLI IAVGAREFDDRVIGNISKFAPEARRAAAEGRGGI IHFEVSPKNINKVVQTQ
WS34-78-tig00000023_pilon_select	NLAVQNADLLI IAVGAREFDDRVIGNISKFAPEARRAAAEGRGGI IHFEVSPKNINKVVQTQ
ZDA2-tig00000665_pilon_selection	NLAVQNADLLI IAVGAREFDDRVIGNISKFAPEARRAAAEGRGGI IHFEVSPKNINKVVQTQ
ILV2_cer	NLAVQNADLLI IAVGAREFDDRVIGNISKFAPEARRAAAEGRGGI IHFEVSPKNINKVVQTQ
ILV2_emb	NLAVQNADLLI IAVGAREFDDRVILNIAKFAPEARRAAAEGRGGI IHFEVSPKNINKVVETQ
WS34-78-tig00000031_pilon_select	NLAVQNADLLI IAVGAREFDDRVILNIAKFAPEARRAAAEGRGGI IHFEVSPKNINKVVETQ *****;***** **;***** *****;*****;***
ZDA3_tig00000777_selection	IAVEGDATTNLGKMSKIFPVKERSEWFAQINKWKKEYPYAYMEETPGSKIKPQTVIKKL
ZDA1-tig00052670_pilon_selection	IAVEGDATTNLGKMSKIFPVKERSEWFAQINKWKKEYPYAYMEETPGSKIKPQTVIKKL
Hybrid7-tig00001282_pilon_select	IAVEGDATTNLGKMSKIFPVKERSEWFAQINKWKKEYPYAYMEETPGSKIKPQTVIKKL
WS34-78-tig00000023_pilon_select	IAVEGDATTNLGKMSKIFPVKERSEWFAQINKWKKEYPYAYMEETPGSKIKPQTVIKKL
ZDA2-tig00000665_pilon_selection	IAVEGDATTNLGKMSKIFPVKERSEWFAQINKWKKEYPYAYMEETPGSKIKPQTVIKKL
ILV2_cer	IAVEGDATTNLGKMSKIFPVKERSEWFAQINKWKKEYPYAYMEETPGSKIKPQTVIKKL
ILV2_emb	IAVEGDATGNLDRMFKIFPVKERSEWFGQINWKKKYFYAYMETPGSKIKPQTVITKL
WS34-78-tig00000031_pilon_select	IAVEGDATGNLDRMFKIFPVKERSEWFGQINWKKKYFYAYMETPGSKIKPQTVITKL ***** **;***;***** *****;***;****;***** *****;*****;***

Figura 4D



```

ZDA3_tig00000777_selection      LNPDFIKLAEAMGLKGLRVKKQEELDAKIKEFVSTKGPVLEVEVDKVKVFLPMVAGGSSG
ZDA1_tig00052670_pilon_selection  LNPDFIKLAEAMGLKGLRVKKQEELDAKIKEFVSTKGPVLEVEVDKVKVFLPMVAGGSSG
Hybrid7-tig00001282_pilon_select  LNPDFIKLAEAMGLKGLRVKKQEELDAKIKEFVSTKGPVLEVEVDKVKVFLPMVAGGSSG
WS34-78-tig00000023_pilon_select  LNPDFIKLAEAMGLKGLRVKKQEELDAKIKEFVSTKGPVLEVEVDKVKVFLPMVAGGSSG
ZDA2-tig00000665_pilon_selection  LNPDFIKLAEAMGLKGLRVKKQEELDAKIKEFVSTKGPVLEVEVDKVKVFLPMVAGGSSG
ILV2_cer                          LNPDFIKLAEAMGLKGLRVKKQEELDAKIKEFVSTKGPVLEVEVDKVKVFLPMVAGGSSG
ILV2_eub                          LNPDFIKLADAMGLKGLRVKKQEELDAKIKEFVSTKGPVLEVEVDKVKVFLPMVPAGKG
WS34-78-tig00000031_pilon_select  LNPDFIKLADAMGLKGLRVKKQEELDAKIKEFVSTKGPVLEVEVDKVKVFLPMVPAGKG
*****,* *****,* *****,* *****,* *****,* *****,* *****,* *
ZDA3_tig00000777_selection      LDEFINDFEVERQQTLELRHKRTGGKH
ZDA1_tig00052670_pilon_selection  LDEFINDFEVERQQTLELRHKRTGGKH
Hybrid7-tig00001282_pilon_select  LDEFINDFEVERQQTLELRHKRTGGKH
WS34-78-tig00000023_pilon_select  LDEFINDFEVERQQTLELRHKRTGGKH
ZDA2-tig00000665_pilon_selection  LDEFINDFEVERQQTLELRHKRTGGKH
ILV2_cer                          LDEFINDFEVERQQTLELRHKRTGGKH
ILV2_eub                          LDEFIYDFEVERQQNELEHKRTNGKH
WS34-78-tig00000031_pilon_select  LDEFIYDFEVERQQNELEHKRTNGKH
*****,* *****,* *****,* *****,* *****,* *****,* *****,* *

```

Figura 4F

































ZDA2-tig00000115_pilon_selection	CGALTKQVAQWIADIQYGRVNYGNWSKTVADLN-
WS34-78-tig00000075_pilon_select	CGALTKQVAQWIADIQYGRVNYGNWSKTVADLN-
WS34-78-tig00000066_pilon_select	CGALTKQVAQWIADIQYGRVNYGNWSKTVADLN-
HYbrid7-tig00000208_pilon_select	CGALTKQVAQWIADIQYGRVNYGNWSKTVADLN-
ZDA1-tig00000105_pilon_selection	CGALTKQVAQWIADIQYGRVNYGNWSKTVADLN-
ZDA1-tig00000101_pilon_selection	CGALTKQVAQWIADIQYGRVNYGNWSKTVADLN-
BAT1 cer	CGALTKQVAQWIADIQYGRVNYGNWSKTVADLN-
ZDA3_tig00000087_selection	CGALTKQVAQWIADIQYGRVNYGNWSKTVADLN-
ZDA2-tig00015328_pilon_selection	SGALTKQVAQWIADIQYGRTHGNWSRTVADLN-
WS34-78-tig00010636_pilon_select	SGALTKQVAQWIADIQYGRTHGNWSRTVADLN-
ZDA1-tig00052676_pilon_selection	SGALTKQVAQWIADIQYGRTHGNWSRTVADLN-
ZDA3_tig00000516_selection	SGALTKQVAQWIADIQYGRTHGNWSRTVADLN-
BAT1_eub	SGALTKQVAQWIADIQYGRTHGNWSRTVADLN
	.*****:::****,*****

Figura 8E







```

ZDA2-tig00000088_pilon_selection      GETEHGNSRVVTDLN-
WS34-78-tig00000158_pilon_selection   GETEHGNSRVVTDLN-
ZDA1-tig00000090_pilon_selection      GETEHGNSRVVTDLN-
ZDA3_tig00000808_selection            GETEHGNSRVVTDLN-
ZDA1-tig00000102_pilon_selection      GETEHGNSRVVTDLN-
BAT2_cer                               GETEHGNSRVVTDLN-
ZDA3_tig00020557_selection            GETEHGNSRVVTDLN-
ZDA2-tig00000669_pilon_selection      GEVEHGNSRVITDLN-
WS34-78-tig00000035_pilon_selection   GEVEHGNSRVITDLN-
Hybrid7-tig00000128_pilon_selection   GEVEHGNSRVITDLN-
ZDA1-tig00002552_pilon_selection      GEVEHGNSRVITDLN-
ZDA3_tig00000210_selection            GEVEHGNSRVITDLN-
BAT2_eub                               GEVEHGNSRVITDLNX
** . ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

```

Figura 9D

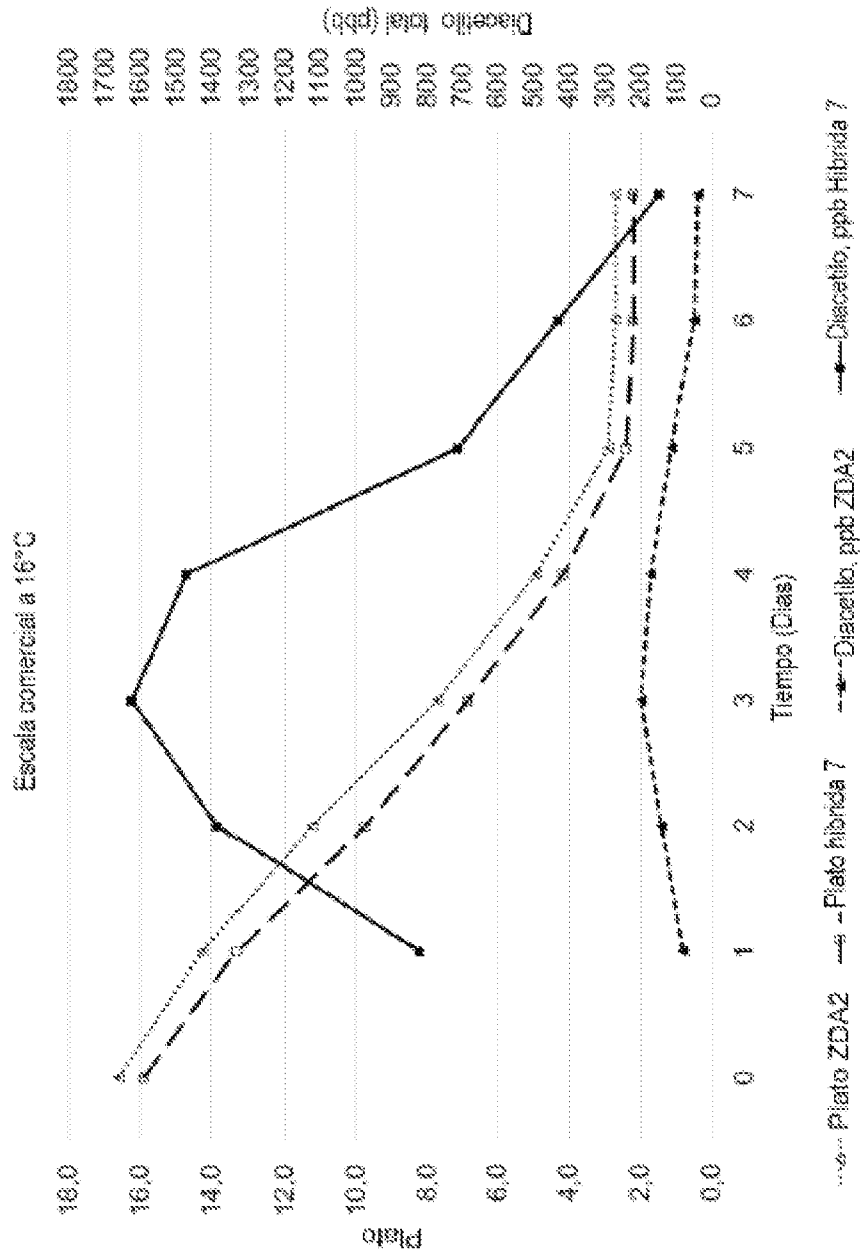


FIGURA 10