

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290462** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.06.30

(51) Int. Cl. *C12C 12/00* (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.08.28

(54) **ДРОЖЖИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НАПИТКОВ БЕЗ ФЕНОЛЬНОГО ПРИВКУСА**

(31) **РА 2019 70543; РА 2019 70542**

(32) **2019.08.30**

(33) **DK**

(86) **PCT/EP2020/074090**

(87) **WO 2021/038048 2021.03.04**

(71) Заявитель:
КАРЛСБЕРГ А/С (DK)

(72) Изобретатель:

**Коломер Марк Серра (ES), Гойкович
Зоран, Ферстер Йохен, Солодовникова
Наталья И., Феннеси Росс (DK)**

(74) Представитель:

**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Прищепный С.В., Гизатуллина Е.М.,
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Пармонова К.В.
(RU)**

(57) Изобретение относится к штаммам дрожжей с полезными характеристиками, включая таковые, не способные обуславливать образование фенольного привкуса и/или не способные использовать мальтозу, или обладающие ограниченной способностью использовать мальтозу. Также представлены способы получения напитков на основе злаков без фенольного привкуса и/или слабоалкогольного или безалкогольного напитка на основе солода и/или злаков, а также напитки, полученные с помощью таких способов.

A1

202290462

202290462

A1

ДРОЖЖИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НАПИТКОВ БЕЗ ФЕНОЛЬНОГО

ПРИВКУСА

ОПИСАНИЕ

Уровень техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к штаммам дрожжей *Dekkera* со сниженной способностью превращать п-кумаровую кислоту в 4-этилфенол и/или сниженной способностью превращать феруловую кислоту в 4-этилгваякол. Термин *Dekkera* в контексте настоящего документа может относиться как к штаммам *Dekkera* на стадии телеоморфы, так и к штаммам *Brettanomyces* на стадии анаморфы. Настоящее изобретение также относится к штаммам дрожжей *Dekkera*, которые не способны использовать мальтозу или которые характеризуются ограниченной способностью к использованию мальтозы. Кроме того, настоящее изобретение относится к таким штаммам дрожжей, которые обладают обоими из вышеупомянутых свойств. Настоящее изобретение также относится к способам получения напитка на основе солода и/или злаков, содержащего низкие уровни 4-этилфенола и/или 4-этилгваякола, а также к напиткам, полученным с помощью таких способов. Также представлены способы получения слабоалкогольного или безалкогольного напитка на основе солода и/или злаков, а также напитки, полученные с помощью такого способа.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Штаммы дрожжей *Dekkera* иногда применяют в получении крафтового пива из-за связанных с ними уникальных вкусовых характеристик. Однако в большинстве стилей пива *Dekkera*, как правило, рассматривается как загрязнитель, поскольку *Dekkera* обычно обуславливает несколько типов привкуса, например, фенольный привкус.

Фенолы представляют собой широкий класс соединений, которые могут быть желательны или совершенно нежелательны в пиве или других напитках, в зависимости от замысла пивовара и целевого стиля. Фенольные вкусы и ароматы в пиве чаще всего описываются как напоминающие гвоздику, пряности, дым, пластырь или лекарства вкусы и ароматы. Таким образом, *Dekkera* в целом считаются дрожжами, вызывающими порчу, которые обуславливают появление привкуса в вине, пиве, сидре или молочных продуктах, что приводит к огромным экономическим потерям. В нескольких стилях пива некоторые из этих вкусов считаются желательными.

Mukai et al., 2010, описывают получение фенольного привкуса у *Saccharomyces cerevisiae* и превращение п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол и феруловой кислоты в 4-этилгваякол. В работе Mukai et al. идентифицирована декарбоксилаза фенольных кислот (PAD1) как обуславливающая превращение п-кумаровой кислоты в 4-винилфенол, который далее превращается в 4-этилфенол у *Saccharomyces cerevisiae*.

Harris et al., 2009, описывают синтез летучих соединений с применением клеточных экстрактов видов *Dekkera* и *Brettanomyces*. Harris et al. описывают неполноценный белок, который на около 50-56% гомологичен белку Pst2 *Candida* и *Saccharomyces*. Функция Pst2 у *Dekkera* не описана. Маловероятно, что Pst2 *Candida* и *Saccharomyces* вовлечен в катаболизм гидроксикоричных кислот. Неполноценный белок характеризуется крайне ограниченной гомологией последовательностей с ферментом PAD *S. cerevisiae*.

Алкобольные напитки зачастую получают путем сбраживания богатой углеводами жидкости с помощью дрожжей. Например, пиво получают путем сбраживания сусла с помощью дрожжей. Сусло содержит ряд соединений, которые обычно используются дрожжами. Например, сусло богато сахарами, в частности мальтозой, а также аминокислотами и малыми пептидами. Обычные дрожжи могут использовать мальтозу, и поэтому обычные дрожжи могут сбраживать мальтозу с образованием этанола.

Безалкогольное пиво и слабоалкогольное пиво представляет собой пиво без спирта или с низким содержанием спирта. Такое пиво с низким содержанием спирта зачастую производят путем получения алкогольного пива полной крепости, а затем удаления спирта посредством физического процесса или просто путем разведения пива полной крепости водой. В качестве альтернативы, виды безалкогольного пива можно получать без сбраживания. Недостатком таких способов зачастую является отсутствие желаемого вкуса и/или наличие привкуса по сравнению с пивом полной крепости.

Применение нетрадиционных видов дрожжей было изучено более тщательно, поскольку выбор дрожжей может сильно повлиять на вкусовые характеристики пива. В контексте ароматизации пива особое внимание было уделено видам *Dekkera*, поскольку их применение обеспечивает свойства, недостижимые с использованием традиционных пивных дрожжей, при получении как алкогольных напитков, так и безалкогольного пива и слабоалкогольного пива.

Биохимические пути, вовлеченные в брожение пива и образование аромата у пивных дрожжей, были тщательно изучены. Однако было проведено очень мало исследований дрожжей *Dekkera* из-за сложности их генома и отсутствия геномных инструментов для выполнения генных делеций и трансформаций.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В настоящее время пиво, полученное путем сбраживания с помощью штамма дрожжей *Dekkera*, имеет фенольный привкус. Таким образом, в настоящее время не существует способов получения напитка на основе солода и/или злаков, имеющего уникальный вкус, обеспечиваемый штаммами дрожжей *Dekkera*, но в то же время не имеющего или имеющего незначительный фенольный привкус. Интересно, что настоящее изобретение относится к штаммам дрожжей *Dekkera*, например, *Dekkera bruxellensis* и *Dekkera anomalus* (также известным как *Brettanomyces bruxellensis* и *Brettanomyces anomalus* на стадии анаморфы), которые являются пригодными для получения напитков на основе солода и/или злаков, содержащих низкие уровни 4-этилфенола и/или низкие уровни 4-этилгваякола.

В частности, предпочтительно, чтобы штаммы дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению не были способны превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол при инкубации в водном растворе, содержащем п-кумаровую кислоту, и/или не были способны превращать более 25% феруловой кислоты в 4-этилгваякол при инкубации в водном растворе, содержащем феруловую кислоту. До сих пор регуляторные пути, вовлеченные в образование фенольного привкуса у *Dekkera*, оставались неясными. В случае пивных дрожжей, регуляторные пути, вовлеченные в образование фенольного привкуса, были картированы, однако геном *Dekkera* существенно отличается от такового у пивных дрожжей.

Таким образом, настоящее изобретение относится к штаммам дрожжей *Dekkera*, которые не способны превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол и/или более 25% феруловой кислоты в 4-этилгваякол, за счет чего обеспечивается получение напитка со сниженными уровнями 4-этилфенола и/или 4-этилгваякола. Штаммы дрожжей *Dekkera*, кроме того, или в качестве альтернативы, могут быть неспособны использовать более 2% мальтозы. Настоящее изобретение также относится к новым способам получения напитка с приятным вкусом с применением штаммов дрожжей *Dekkera*, не способных превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол и/или более 25% феруловой кислоты в 4-этилгваякол.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения представлен способ получения напитка на основе солода и/или злаков, причем указанный способ предусматривает стадии

- i) обеспечения водного экстракта солода и/или зерен злаков
- ii) обеспечения штамма дрожжей *Dekkera*, причем указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол при инкубации в водном растворе, содержащем п-кумаровую кислоту

iii) сбраживания указанного водного экстракта с помощью указанного штамма дрожжей

с получением тем самым указанного напитка на основе солода и/или злаков.

Другой аспект настоящего изобретения относится к штамму дрожжей *Dekkera*, который не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол при инкубации в водном растворе, содержащем п-кумаровую кислоту. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% феруловой кислоты в 4-этилгваякол при инкубации в водном растворе, содержащем феруловую кислоту.

Другой аспект настоящего изобретения относится к напитку на основе солода и/или злаков, содержащему низкие уровни 4-этилфенола, как, например, менее 0,5 мг/л, как, например, менее 0,3 мг/л, как, например, менее 0,1 мг/л 4-этилфенола. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения указанный напиток на основе солода и/или злаков содержит низкие уровни 4-этилгваякола, как, например, менее 1 мг/л 4-этилгваякола, как, например, менее 0,8 мг/л, как, например, менее 0,6 мг/л, как, например, менее 0,5 мг/л 4-этилгваякола.

Другой аспект настоящего изобретения заключается в получении приятного безалкогольного или слабоалкогольного напитка. Таким образом, один аспект настоящего изобретения заключается в получении приятного безалкогольного или слабоалкогольного напитка с низкими уровнями 4-этилфенола и/или 4-этилгваякола.

Настоящее изобретение также относится к штаммам дрожжей *Dekkera*, которые являются пригодными для получения слабоалкогольных или безалкогольных напитков. В частности, штаммы дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению не способны использовать мальтозу или характеризуются ограниченной способностью к использованию мальтозы, и, соответственно, при добавлении к водному экстракту, богатому мальтозой, указанные дрожжи продуцируют лишь ограниченные количества этанола. В частности, это справедливо в случае, когда указанный водный экстракт содержит лишь низкие уровни глюкозы. До сих пор регуляторные пути, вовлеченные в метаболизм мальтозы у *Dekkera*, оставались неясными. В случае пивных дрожжей, регуляторные пути, вовлеченные в использование мальтозы, являются очень сложными, однако геном *Dekkera* существенно отличается от такового у пивных дрожжей.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к штаммам дрожжей *Dekkera*, которые не способны использовать более 2% мальтозы, но которые в то же время обеспечивают получение слабоалкогольного или безалкогольного пива с приятным вкусом и полным сохранением в нем ароматических и вкусовых свойств. Настоящее изобретение

также относится к новым способам получения слабоалкогольных или безалкогольных напитков с приятным вкусом с применением штаммов дрожжей *Dekkera*, которые не способны использовать более 2% мальтозы.

Описание чертежей

Фиг. 1. На панели А) показано содержание (мг/л) п-кумаровой кислоты, феруловой кислоты, 4-EP (4-этилфенол) и 4-EG (4-этилгваякол) в пиве, полученном при сбраживании с помощью CRL-2 и CRL-49 (оба *Dekkera bruxellensis*) и CRL-90 (*Dekkera anomalus*). Сбраживание осуществляли при 25°C в течение 169 часов, и показаны уровни п-кумаровой кислоты, феруловой кислоты, 4-EP и 4-EG в конце сбраживания. Результаты указывают на то, что CRL-90 не способен превращать п-кумаровую кислоту в 4-этилфенол и характеризуется очень сниженной способностью превращать феруловую кислоту в 4-этилгваякол. На панели В) показана структура генома CRL-90, подвергнутого выравниванию с эталонным геномом штамма дрожжей *Dekkera anomalus*, CRL-49. Из структуры генома видно, что первые 1-53715 п. о. скаффолда CRL-90 отсутствуют.

Фиг. 2. На панели А) показана метаболическая активность, определенная по продукции NADH различных штаммов дрожжей *Dekkera* в среде YNB определенного состава, дополненной аминокислотами. Штаммы выращивали в трех повторах, и стандартное отклонение показано затенением цвета. По оси у показан фиолетовый цвет в единицах Omnilog, как измерено с применением системы Omnilog®Biolog. Продукцию NADH измеряют по восстановлению тетразолиевого красителя до фиолетового формазана. Таким образом, количественное определение метаболической активности штамма основывается на добавлении тетразолиевого красителя, который восстанавливается до фиолетового формазана в случае продукции штаммом дрожжей NADH в качестве меры метаболической активности. Рост штамма может коррелировать с метаболической активностью, и, таким образом, его определяют по проявлению фиолетового цвета. По оси х показано время, измеряемое в часах. G: Глюкоза; M: Мальтоза. На фиг. 2 показано, что CRL-90 (*D. anomalus*) и CRL-2 (*D. bruxellensis*) являются единственными тестируемыми штаммами дрожжей, которые были не способны расти в присутствии мальтозы в качестве единственного источника углерода. На панели В) показана структура генома CRL-90, подвергнутого выравниванию с эталонным геномом штамма дрожжей *Dekkera anomalus*, CRL-49. Из структуры генома видно, что первые 1-40470 п. о. скаффолда отсутствуют.

Фиг. 3: На панели А) показана кривая сбраживания в пивном сусле для пяти разных штаммов дрожжей *Dekkera*. По оси у представлено суммарное давление, измеряемое с помощью системы ANKOM, в фунтах/кв. дюйм. По оси х показано время, измеряемое в

часах. На фигуре видно, что CRL-1, CRL-19, CRL-49 и CRL-50 способны использовать большую часть сбраживаемых сахаров, присутствующих в сусле, тогда как CRL-2 способен использовать лишь меньшую часть сбраживаемых сахаров, присутствующих в сусле. На панели В) показана кривая сбраживания в пивном сусле для одного штамма дрожжей *Dekkera bruxellensis*, CRL-2, и одного штамма дрожжей *Dekkera anomalus*, CRL-90. По оси у представлено суммарное давление, измеряемое с помощью системы ANKOM, в фунтах/кв. дюйм. По оси х показано время, измеряемое в часах. Оба штамма дрожжей, CRL-2 и CRL-90, были способны использовать лишь меньшую часть сбраживаемых сахаров.

На **фиг. 4** показаны результаты сравнения белковых последовательностей различных предполагаемых транспортеров мальтозы, обнаруженных в эталонном геноме *D. bruxellensis* (MTRA5, MTRA4, MTRA3, MTRA2, MTRA1). В верхней части таблицы показана идентичность последовательностей в %. В нижней части таблицы показана число аминокислотных изменений между транспортерами.

Фиг. 5: На панели А) показаны результаты нуклеотидного выравнивания последовательностей гена MTRA1 в случае CRL-1 (обнаружено 4 копии), CRL-50 (обнаружено 3 копии), CRL-19 (обнаружена 1 копия), CRL-2 (обнаружена 1 копия с 97,5% гомологией). Результаты выравнивания отображают N-концевую нуклеотидную последовательность транспортера MTRA1. Можно сделать вывод, что копия, обнаруженная у CRL-2, имеет совершенно другую N-концевую нуклеотидную последовательность по сравнению с таковой для CRL-1, CRL-19 и CRL-50. На панели В) показана аминокислотная последовательность всех копий MTRA1, обнаруженных у CRL-1, CRL-2, CRL-19 и CRL-50, причем исходя из этого выравнивания также можно сделать вывод, что N-концевая аминокислотная последовательность MTRA1 у CRL-2 отличается от аминокислотной последовательности MTRA1 у CRL-1, CRL-19 и CRL-50.

Фиг. 6: На панели А) показаны результаты нуклеотидного выравнивания части гена ISOM(2) для CRL-1, CRL-19, CRL-50 и CRL-2. Стрелочкой показана делеция в 1050 п. о. в ISOM(2) CRL-2. На панели В) показаны результаты выравнивания белковых последовательностей ISOM(2) CRL-1 и CRL-2. Можно сделать вывод, что делеция приводит в результате к сдвигу рамки считывания, приводящему в результате к прерыванию трансляции, и, таким образом, у CRL-2 отсутствует 50% белка ISOM(2).

На **фиг. 7** показана 3D-модель структуры белка ISOM(2), полученная с помощью CLCGenomicsWorkbench 11. Часть, отсутствующая у отрицательного по мальтозе *Dekkera*, показана белым цветом.

На **фиг. 8** показаны монотерпеновые спирты, измеряемые в пиве после сбраживания с помощью *Dekkera*, применяемого в качестве первичного (А) или вторичного (В) штамма дрожжей. Суммарное значение общих монотерпеновых спиртов указано в мкг/л под названием штамма. CRL-1, CRL-2, CRL-19 и CRL-50 представляют собой штаммы дрожжей *Dekkera bruxellensis*, а CRL-49 представляет собой штамм дрожжей *Dekkera*.

На **фиг. 9** показана структура генома CRL-90, подвергнутого выравниванию с эталонным геномом штамма дрожжей *Dekkera anomalus*, CRL-49. Из структуры генома видно, что первые 1-40470 п. о. скаффолда, где находятся *ISOM(1)*, *MTRAI* и *MTRA2*, отсутствуют.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения

В контексте настоящего документа форма единственного числа может означать «один или несколько», в зависимости от контекста, в котором она применяется.

Термин «фенольный привкус» или «POF» в контексте настоящего документа относится к группе фенольных соединений, которые могут присутствовать в получаемых при брожении напитках, таких как виды пива. В некоторых типах получаемых при брожении напитков они рассматриваются как привкус и являются нежелательными. Однако некоторые из них могут быть желательными в определенных типах получаемых при брожении напитков. Предпочтительно такие соединения выбраны из группы 4-винилфенола, 4-винилгваякола, 4-этилфенола и 4-этилгваякола.

Термин «пиво» в контексте настоящего документа относится к напитку, полученному путем сбраживания сусла. Предпочтительно указанное сбраживание выполняется дрожжами.

Термин «добавка» в контексте настоящего документа относится к источникам сырья с высоким содержанием углерода, добавляемым в ходе получения напитка на основе солода и/или злаков. Добавка может представлять собой непроросшее злаковое зерно, которое может быть перемолото вместе с пророщенными зёрнами, полученными в соответствии с настоящим изобретением. Добавка также может представлять собой сироп, сахар или другой источник углеводов.

Под термином «сусло» подразумевается жидкий экстракт солода и/или зерен злаков и необязательно дополнительные добавки. Сусло в общем случае получают путем затирания, необязательно с последующим «промыванием дробины», в процессе экстракции остаточных сахаров и других соединений из дробины после затирания с использованием горячей воды. Промывание дробины обычно выполняют в фильтрационном чане, фильтре

для отделения затора или другом устройстве для обеспечения отделения извлеченной воды от дробины. Полученное после затирания сусло, как правило, называют «первым суслом», тогда как полученное после промывания дробины сусло, как правило, называют «вторым суслом». Если не указано, термин «сусло» может означать первое сусло, второе сусло или комбинацию как одного, так и другого. В ходе традиционного получения пива сусло кипятят вместе с хмелем. Сусло без хмеля также может называться «сладким суслом», тогда как сусло, кипяченое вместе с хмелем, может называться «прокипяченным суслом» или просто суслом.

Термин «водный экстракт» в контексте настоящего документа относится к любому водному экстракту солода и/или зерен злаков. Таким образом, неограничивающие примеры могут представлять собой сусло или получаемый при брожении напиток на основе солода и/или злаков, такой как пиво.

Термин «водный раствор» в контексте настоящего документа относится к любым водосодержащим жидкостям или водным растворам. Водный раствор может содержать заданные уровни конкретных соединений. Таким образом, неограничивающие примеры могут представлять собой любую среду, такую как среда, имеющая отношение к росту и/или метаболической активности штамма дрожжей.

Термин «Plato» в контексте настоящего документа относится к плотности, измеряемой по шкале Plato. Шкала Plato представляет собой полученную эмпирическим путем ареометрическую шкалу для измерения плотности пива или сусла в виде процентной доли экстракта по массе. Шкала показывает плотность в виде процентной доли сахара по массе.

Под термином «сбраживание» в контексте настоящего документа подразумевается инкубация водного экстракта или водного раствора с микроорганизмом, таким как определенный штамм дрожжей.

Термин «источник азота» в контексте настоящего документа относится к любой органической азотсодержащей молекуле и/или аммонийсодержащим молекулам. В частности, указанный источник азота может представлять собой органический источник азота, например, пептиды, аминокислоты и/или другие амины. Источником азота также может быть аммоний. Таким образом, например, N_2 не считается «источником азота» в настоящем документе.

Термин «солодование» в контексте настоящего документа относится к контролируемому проращиванию зерен злаков (в частности, зерен ячменя), происходящему в контролируемых условиях окружающей среды. Согласно некоторым вариантам

осуществления «солодование» может также предусматривать стадию сушки указанных пророщенных зерен злаков, например, с помощью печной сушки.

Термин «солод» в контексте настоящего документа относится к зернам злаков, которые были подвергнуты солодованию. Термин «зеленый солод» относится к пророщенным зернам злаков, которые не были подвергнуты стадии печной сушки. Согласно некоторым вариантам осуществления зеленый солод представляет собой молотый зеленый солод. Термин «высушенный в печи солод» в контексте настоящего документа относится к пророщенным зернам злаков, которые были высушены с помощью печной сушки. Согласно некоторым вариантам осуществления высушенный в печи солод представляет собой молотый высушенный в печи солод. В целом указанные зерна злаков были пророщены в контролируемых условиях окружающей среды.

Термин «затирание» в контексте настоящего документа относится к выдерживанию молотого солода (например, зеленого солода или высушенного в печи солода) и/или непроросших зерен злаков в воде. Затирание предпочтительно осуществляют при конкретной(-ых) температура(-х) и в конкретном объеме воды.

Термин «молотый» относится к материалу (например, зернам ячменя или солоду), который был тонко измельчен, например, путем резки, перемалывания, перетирания или дробления. Зерна ячменя можно молотить во влажном состоянии с применением, например, дробилки или мельницы влажного помола. Молотые зерна ячменя или молотый солод являются в достаточной степени тонкоизмельченными с целью придания материалу пригодности для получения водных экстрактов. Молотые зерна ячменя или молотый солод не могут быть регенерированы в интактное растение с помощью большинства биологических способов.

Термин «источник углерода» в контексте настоящего документа относится к любой органической молекуле, которая может обеспечивать дрожжи энергией и обеспечивать углеродом для биосинтеза в клетке. В частности, указанный источник углерода может представлять собой углеводы и, более предпочтительно, источник углерода может представлять собой моносахариды, дисахариды трисахариды и/или тетрасахариды.

Аминокислоты в настоящем документе могут быть названы с применением однобуквенных и трехбуквенных кодов согласно IUPAC.

Термин «функциональный гомолог» в контексте настоящего документа обозначает полипептид, характеризующийся по меньшей мере одной биологической функцией, аналогичной таковой у эталонного полипептида. В целом, указанный функциональный гомолог также характеризуется значимой идентичностью последовательностей с эталонным полипептидом. Предпочтительно функциональный гомолог эталонного

полипептида представляет собой полипептид, который характеризуется такой же биологической функцией, что и эталонный белок, и который характеризуется высоким уровнем идентичности последовательностей с эталонным полипептидом.

Термин «идентичность последовательностей» в контексте настоящего документа относится к % идентичных аминокислот или нуклеотидов между последовательностью-кандидатом и эталонной последовательностью, полученному в результате выравнивания. Таким образом, в случае последовательности-кандидата, характеризующейся 80% аминокислотной идентичностью с эталонной последовательностью, требуется, чтобы в результате выравнивания 80% аминокислот в последовательности-кандидате были идентичны соответствующим аминокислотам в эталонной последовательности. Идентичность в соответствии с настоящим изобретением определяют с помощью компьютерного анализа, такого как, без ограничения, компьютерная программа для выравнивания Clustal Omega для выравнивания полипептидных последовательностей (Sievers et al. 2011; Li et al. 2015; McWilliam et al., 2013), и предложенные в ней параметры по умолчанию. Программное обеспечение Clustal Omega доступно от EMBL-EBI по адресу <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. С применением такой программы с настройками по умолчанию осуществляют выравнивание зрелой (биологически активной) части заданного и эталонного полипептида. Число полностью консервативных остатков подсчитывают и делят на длину эталонного полипептида. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей можно применять алгоритмы MUSCLE или MAFFT. Показатели идентичности последовательностей можно рассчитывать таким же способом, как указано для аминокислотных последовательностей. Таким образом, идентичность последовательностей, как предусмотрено в настоящем документе, рассчитывают по всей длине эталонной последовательности.

Под «кодирующим» или «кодируемым» в контексте указанной нуклеиновой кислоты подразумевается содержание информации для трансляции в конкретный белок. Кодирование белком нуклеиновая кислота или полинуклеотид могут содержать нетранслируемые последовательности, например, интроны, в пределах транслируемых областей нуклеиновой кислоты, или у них могут отсутствовать такие промежуточные нетранслируемые последовательности, как, например, в кДНК. Информация, в которой закодирован белок, определяется применением кодонов.

В контексте настоящего документа «экспрессию» по отношению к нуклеиновым кислотам следует понимать как транскрипцию и образование смысловой мРНК или антисмысловой РНК, происходящей из фрагмента нуклеиновой кислоты. Термин

«экспрессия», применяемый в контексте белков, относится к трансляции мРНК в полипептид.

Термин «ген» означает сегмент ДНК, вовлеченный в образование полипептидной цепи; он включает области, предшествующие кодирующей области, которая кодирует указанную полипептидную цепь, и расположенные за ней (промотор и терминатор). Кроме того, некоторые гены дрожжей также содержат интроны, хотя, например, в геноме *S. cerevisiae* лишь 5% генов содержат интроны. После транскрипции в РНК, интроны удаляются посредством сплайсинга с образованием зрелой матричной РНК (мРНК).

Термин «мутации» в контексте настоящего документа включает вставки, делеции, замены, трансверсии и точечные мутации в кодирующих и некодирующих областях гена. Точечные мутации могут касаться изменений в отношении одной пары оснований и могут приводить в результате к появлению преждевременных стоп-кодонов, мутаций сдвига рамки считывания, мутации сайта сплайсинга или аминокислотным заменам. Предусматривающий мутацию ген может называться «мутантным геном». Если указанный мутантный ген кодирует полипептид с последовательностью, отличающейся от таковой дикого типа, указанный полипептид может называться «мутантным полипептидом» и/или «мутантным белком». Мутантный полипептид может быть описан как несущий мутацию, если он содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от последовательности дикого типа.

Термин «делеции» в контексте настоящего документа может относиться к делеции целого гена или только части гена или части хромосомы.

Термин «сайт сплайсинга» в контексте настоящего документа относится к консенсусным последовательностям, действующим как сплайс-сигналы для процесса сплайсинга. Мутация сайта сплайсинга представляет собой генетическую мутацию, которая обуславливает вставки, делеции или изменения в отношении некоторого числа нуклеотидов в конкретном сайте, в котором происходит сплайсинг в ходе процесса сплайсинга, т. е. процессинга матричной РНК-предшественницы с образованием зрелой матричной РНК (мРНК). Консенсусные последовательности сайта сплайсинга, которые опосредуют распознавание экзонов, обычно расположены на самых концах интронов.

Термин «стоп-кодон» в контексте настоящего документа относится к триплету нуклеотидов в рамках генетического кода, который, находясь в пределах мРНК, приводит в результате к терминации трансляции. Термин «стоп-кодон» в контексте настоящего документа также относится к триплету нуклеотидов в пределах гена, кодирующему стоп-кодон в мРНК. Стоп-кодон в ДНК обычно характеризуется одной из следующих последовательностей: TAG, TAA или TGA.

Термин «рост» в контексте настоящего документа, в отношении дрожжей, относится к процессу, посредством которого дрожжевые клетки размножаются. Таким образом, когда дрожжевые клетки растут, число дрожжевых клеток увеличивается. Число дрожжевых клеток можно определять с помощью любого пригодного способа. Условия, обеспечивающие рост дрожжей, представляют собой условия, обеспечивающие увеличение числа дрожжевых клеток. В общем случае такие условия требуют присутствия адекватных питательных веществ, например, источника углерода и источника азота, а также адекватной температуры, которая, как правило, находится в диапазоне 5-40°C.

Термин «метаболическая активность» в контексте настоящего документа относится к метаболизму штамма дрожжей, который обычно определяют путем определения продукции NADH. Зачастую метаболическая активность коррелирует с ростом дрожжей, и, следовательно, метаболическая активность зачастую может применяться в качестве индикатора роста дрожжей. Отсутствие или незначительное изменение метаболизма может указывать на отсутствие роста. Продукцию NADH можно измерять, например, путем добавления к дрожжевым клеткам тетразолиевого красителя, который затем восстанавливается до фиолетового формазана в случае продукции NADH. Метаболическую активность, таким образом, можно определять по образованию фиолетового формазана. Если у штамма дрожжей не наблюдается или наблюдается крайне ограниченная метаболическая активность, будет иметь место ограниченная продукция NADH и, таким образом, не будет происходить образование фиолетового формазана. Как описано выше, метаболическая активность зачастую может коррелировать с ростом дрожжей, и, если рост штамма дрожжей не происходит, зачастую будет иметь место незначительная продукция NADH, и, таким образом, не будет происходить образование фиолетового формазана. Количество восстановленного красителя, т. е. фиолетового формазана, можно измерять с применением OmniLog®Biolog, который дает единицы OmniLog, соответствующие метаболической активности клетки. Пригодным способом определения метаболической активности (которая, как описано выше, зачастую может коррелировать с ростом дрожжей) является инкубирование штамма дрожжей в течение 80 часов при 25°C в водном растворе, содержащем 10 г/л мальтозы в качестве единственного источника углерода, требуемые для роста дрожжей неуглеводные компоненты и заданный уровень тетразолиевого красителя, и определение образования фиолетового формазана с помощью OmniLog®Biolog. Метаболическая активность дрожжей затем может быть представлена в виде абсолютных единиц Omnilog в конкретный момент времени в ходе инкубации или с помощью кинетического параметра, представленного как единицы OmniLog в единицу времени, например, часы. Считается, что штамм дрожжей обладает незначительной метаболической

активностью, и, следовательно, зачастую считается, что у такого штамма дрожжей не наблюдается рост, если единица OmniLog ниже 50 спустя 80 часов инкубации. Другими словами, если наклон кривой, показывающей проявление фиолетового формазана (единица OmniLog) в динамике (часы), составляет не более 0,2, как, например, не более 0,1, как, например, не более 0,05 единицы OmniLog/час, считается, что штамм дрожжей обладает незначительной метаболической активностью, и, следовательно, также считается, что он не способен к росту. Другой способ определения количества фиолетового формазана заключается в измерении количества фиолетового формазана с помощью спектрофотометра на длине волны 590 нм.

Фраза «штамм дрожжей не способен использовать XX в качестве единственного источника углерода» в контексте настоящего документа относится к штамму дрожжей, который не может расти и/или который обладает незначительной метаболической активностью при инкубации в среде, содержащей XX в качестве единственного источника углерода, причем «XX» может быть любым конкретным источником углерода, например, сахаром. «Источники углерода» могут, в частности, представлять собой углеводы. Таким образом, указанная среда предпочтительно не содержит каких-либо других углеводов помимо XX. Например, штамм дрожжей может быть не способен использовать мальтозу в качестве единственного источника углерод.

Термин «слабоалкогольный напиток» применяется в настоящем документе для описания получаемого при брожении напитка на основе солода и/или злаков с содержанием этанола ниже 3%. Предпочтительно «слабоалкогольный напиток» может характеризоваться содержанием этанола ниже 2%. Слабоалкогольный напиток может представлять собой, например, слабоалкогольное пиво, с содержанием этанола ниже 3%, предпочтительно ниже 2%.

Термины «безалкогольный напиток» или «не содержащий алкоголя напиток» применяются в настоящем документе для описания получаемого при брожении напитка на основе солода и/или злаков с содержанием этанола не более 0,5%. Безалкогольный напиток может представлять собой, например, безалкогольное пиво и не содержащий алкоголя напиток может представлять собой, например, не содержащее алкоголя пиво, с содержанием этанола ниже 0,5%.

Свойства дрожжей

Настоящее изобретение относится к штамму дрожжей *Dekkera*, обладающему по меньшей мере одной из характеристик I, II и III, описанных в настоящем документе ниже. Помимо характеристик I, II и III, указанный штамм дрожжей может обладать одной или несколькими из характеристик, выбранных из группы, состоящей из характеристик IV, V,

VI и VII. Кроме того, указанный штамм дрожжей *Dekkera* может иметь один или несколько из генотипов I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, как описано ниже.

Термин *Dekkera* в контексте настоящего документа может относиться как к штаммам *Dekkera* на стадии телеоморфы, так и к штаммам *Brettanomyces* на стадии анаморфы.

Термин *Dekkera* иногда применяется взаимозаменяемо с термином *Brettanomyces*. Иногда термин «*Brettanomyces*» применяется для обозначения анаморфы или неспорообразующих дрожжей рода *Dekkera*, тогда как термин «*Dekkera*» может применяться для описания телеоморфы или спорообразующей формы дрожжей.

В частности, род *Dekkera* может предусматривать штаммы дрожжей *Dekkera anomala* и *Dekkera bruxellensis* на стадии телеоморфы. *Brettanomyces*, в частности, может предусматривать анаморфные формы *Dekkera*, а именно *Brettanomyces nanus*, *Brettanomyces naardenensis*, *Brettanomyces custerisianus*, *Brettanomyces anomalus* и/или *Brettanomyces bruxellensis*. Предпочтительно штамм дрожжей по настоящему изобретению представляет собой штамм дрожжей видов, выбранных из группы, состоящей из *Dekkera anomalus* и *Dekkera bruxellensis*. Однако, как отмечалось выше, термины *Dekkera* и *Brettanomyces* иногда применяются взаимозаменяемо. Таким образом, *Dekkera anomalus* и *Dekkera bruxellensis* также известны как *Brettanomyces bruxellensis* и *Brettanomyces anomalus* соответственно, где первый термин может обозначать телеоморфную форму, а второй термин может относиться к анаморфной форме. В настоящем документе термин «*Dekkera*» охватывает формы дрожжей как *Dekkera*, так и *Brettanomyces*.

Согласно одному варианту осуществления указанный штамм дрожжей обладает характеристикой I, описанной в настоящем документе ниже. Согласно другому варианту осуществления указанный штамм дрожжей обладает характеристикой II, описанной в настоящем документе ниже.

В частности, предпочтительно, чтобы указанный штамм дрожжей по меньшей мере обладал характеристиками I и II, описанными в настоящем документе ниже.

Согласно другому варианту осуществления указанный штамм дрожжей может также обладать характеристиками I и III, или характеристиками II и III, или характеристиками I, II и III, описанными в настоящем документе ниже.

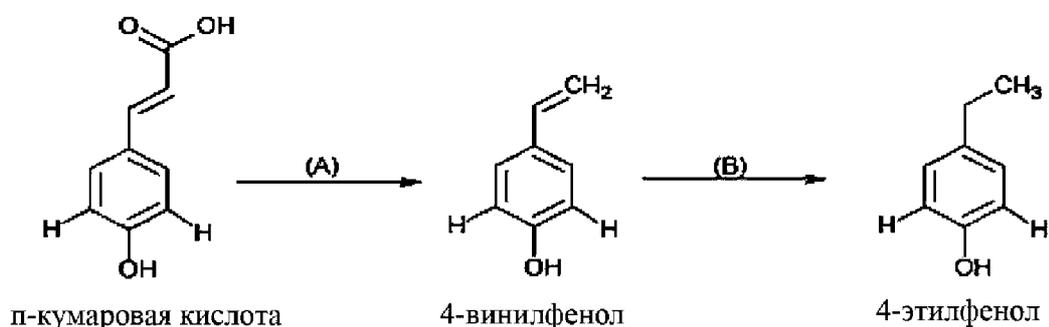
Согласно другому варианту осуществления штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением обладает характеристиками I, II и/или III, описанными в настоящем документе ниже, и, кроме того, обладает одной или несколькими из характеристик IV, V, VI и VII, как описано в настоящем документе ниже.

Характеристика I

Настоящее изобретение относится к штамму дрожжей *Dekkera* со сниженной способностью превращать п-кумаровую кислоту в 4-этилфенол и способам получения напитков с применением указанных дрожжей. Таким образом, штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению может обладать характеристикой I, причем характеристика I представляет собой сниженную способность превращать п-кумаровую кислоту в 4-этилфенол. В частности, характеристика I заключается в том, что указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением обладает характеристикой I, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также имеет генотип I и/или генотип II. Предпочтительно указанный штамм дрожжей имеет генотип I.

Штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению обладает сниженной способностью превращать п-кумаровую кислоту в 4-этилфенол. Не вдаваясь в теорию полагают, что традиционные штаммы дрожжей *Dekkera* могут предусматривать виды ферментативной активности, за счет которых происходит катализ следующих реакций:



Соответственно, штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению, например, может обладать сниженной способностью превращать п-кумаровую кислоту в 4-винилфенол и/или штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению может обладать сниженной способностью превращать 4-винилфенол в 4-этилфенол.

Предпочтительно, чтобы штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению был не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты, присутствующей в водном растворе, в 4-этилфенол при инкубации в указанном водном растворе. Например, штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению может быть не способен превращать более 20%, как, например, более 15%, например, более 10%, как, например, более 5%, например, более 1% п-кумаровой кислоты, присутствующей в водном растворе, в 4-этилфенол при инкубации в указанном водном растворе.

Способен ли указанный штамм дрожжей *Dekkera* превращать п-кумаровую кислоту, присутствующую в водном растворе, в 4-этилфенол, можно определять разными способами. Согласно одному варианту осуществления это определяют с помощью способа, предусматривающего стадии:

- обеспечения водного раствора, содержащего заданный уровень п-кумаровой кислоты
- инкубирование подлежащего тестированию штамма дрожжей *Dekkera* с указанным водным раствором
- определение уровня п-кумаровой кислоты в водном растворе после указанной инкубации

причем снижение уровня п-кумаровой кислоты считается мерой превращения п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол.

Соответственно, предпочтительно, чтобы при инкубации штамма дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением в водном растворе, содержащем заданный уровень п-кумаровой кислоты, уровень п-кумаровой кислоты после указанной инкубации был не более чем на 25%, как, например, не более чем на 20%, как, например, не более чем на 15%, например, не более чем на 10%, как, например, не более чем на 5%, например, не более чем на 1% ниже исходного уровня.

Согласно одному варианту осуществления, способен ли указанный штамм дрожжей *Dekkera* превращать п-кумаровую кислоту, присутствующую в водном растворе, в 4-этилфенол, определяют с помощью способа, предусматривающего стадии:

- обеспечения водного раствора, содержащего п-кумаровую кислоту и заданный уровень 4-этилфенола
- инкубирования подлежащего тестированию штамма дрожжей *Dekkera* с указанным водным раствором
- определения уровня 4-этилфенола в водном растворе после указанной инкубации

причем повышение уровня 4-этилфенола считается мерой превращения п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол.

Соответственно, предпочтительно, чтобы при инкубации штамма дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением в водном растворе, содержащем заданный уровень п-кумаровой кислоты и заданный уровень 4-этилфенола, повышение уровня 4-этилфенола в молях после инкубации составляло не более 25%, как, например, не более 20%, как, например, не более 15%, например, не более 10%, как, например, не более 5%, например, не более 1% от заданного уровня п-кумаровой кислоты в молях.

Независимо от того, включает ли способ определения того, способен ли указанный штамм дрожжей *Dekkera* превращать п-кумаровую кислоту, присутствующую в водном растворе, в 4-этилфенол, определение уровня п-кумаровой кислоты или уровня 4-этилфенола, инкубацию в водном растворе можно осуществлять любым подходящим способом. В целом инкубацию проводят в условиях, обеспечивающих рост и/или метаболическую активность указанного штамма дрожжей *Dekkera*. Таким образом, инкубацию осуществляют при температуре в диапазоне 5-30°C, как, например, в диапазоне 15-25°C. Водный раствор, помимо п-кумаровой кислоты, также должен содержать компоненты, способствующие росту штамма дрожжей, включая источник углерода и источник азота и необязательно буфер и соли. Таким образом, водный раствор может представлять собой, например, синтетическую среду, такую как YPD, дополненная глюкозой и п-кумаровой кислотой. В качестве альтернативы, водный раствор может представлять собой сусло. Инкубацию можно проводить, например, в течение 3-7 суток.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления, способен ли указанный штамм дрожжей *Dekkera* превращать п-кумаровую кислоту, присутствующую в водном растворе, в 4-этилфенол, определяют с помощью способа, описанного в примере 2 ниже.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения указанный штамм дрожжей *Dekkera* также может обладать сниженной способностью превращать п-кумаровую кислоту в 4-винилфенол. Таким образом, штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению может обладать характеристикой I, причем характеристика I также определяется сниженной способностью превращать п-кумаровую кислоту в 4-винилфенол. В частности, характеристика I также охватывает штамм дрожжей, который не способен превращать более 25% как, например, более 20%, как, например, более 15%, как, например, более 10%, как, например, более 5%, как, например, более 1% п-кумаровой кислоты, присутствующей в водном растворе, в 4-винилфенол.

Способен ли указанный штамм дрожжей *Dekkera* превращать п-кумаровую кислоту, присутствующую в водном растворе, в 4-винилфенол, можно определять с помощью способа, предусматривающего стадии:

- обеспечения водного раствора, содержащего п-кумаровую кислоту и заданный уровень 4-винилфенола
- инкубирования подлежащего тестированию штамма дрожжей *Dekkera* с указанным водным раствором
- определения уровня 4-винилфенола в водном растворе после указанной инкубации

причем повышение уровня 4-винилфенола считается мерой превращения п-кумаровой кислоты в 4-винилфенол.

Соответственно, предпочтительно, чтобы при инкубации штамма дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением в водном растворе, содержащем заданный уровень п-кумаровой кислоты и заданный уровень 4-винилфенола, повышение уровня 4-винилфенола в молях после инкубации составляло не более 25%, как, например, не более 20%, как, например, не более 15%, например, не более 10%, как, например, не более 5%, например, не более 1% от заданного уровня п-кумаровой кислоты в молях.

Инкубацию указанного штамма дрожжей *Dekkera* в водном растворе можно осуществлять любым подходящим способом, например, как описано в настоящем документе выше.

Характеристика II

Штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению может обладать характеристикой II, причем характеристика II представляет собой сниженную способность превращать феруловую кислоту в 4-этилгваякол. В частности, штамм дрожжей по настоящему изобретению может обладать характеристикой II, в дополнение к характеристике I (не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол).

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением обладает характеристикой II, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также имеет генотип I и/или генотип II. Предпочтительно указанный штамм дрожжей имеет генотип I.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению, например, может обладать сниженной способностью превращать феруловую кислоту в 4-винилгваякол и/или штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению может обладать сниженной способностью превращать 4-винилгваякол в 4-этилгваякол.

Таким образом, штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению может обладать характеристикой II, причем характеристика II заключается в том, что штамм дрожжей *Dekkera* не способен превращать более 25% феруловой кислоты, присутствующей в водном растворе, в 4-этилгваякол при инкубации в указанном водном растворе. Например, штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению может быть не способен превращать более 20%, как, например, более 15%, например, более 10%, как, например, более 5%, например, более 1% феруловой кислоты, присутствующей в водном растворе, в 4-этилгваякол при инкубации в указанном водном растворе.

Способен ли указанный штамм дрожжей *Dekkera* превращать феруловую кислоту, присутствующую в водном растворе, в 4-этилгваякол, можно определять, по существу, как описано в настоящем документе выше в отношении характеристики I, за исключением того, что определяют уровни феруловой кислоты и/или 4-этилгваякола.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления, способен ли указанный штамм дрожжей *Dekkera* превращать феруловую кислоту, присутствующую в водном растворе, в 4-этилгваякол, определяют с помощью способа, описанного в примере 2 ниже.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения указанный штамм дрожжей *Dekkera* также может обладать сниженной способностью превращать феруловую кислоту в 4-винилгваякол. Таким образом, штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению может обладать характеристикой II, причем характеристика II также определяется сниженной способностью превращать феруловую кислоту в 4-винилгваякол. В частности, характеристика II также охватывает штамм дрожжей, который не способен превращать более 25% как, например, более 20%, как, например, более 15%, как, например, более 10%, как, например, более 5%, как, например, более 1% феруловой кислоты, присутствующей в водном растворе, в 4-винилгваякол.

Способен ли указанный штамм дрожжей *Dekkera* превращать феруловую кислоту, присутствующую в водном растворе, в 4-винилгваякол, можно определять с помощью способа, предусматривающего стадии:

- обеспечения водного раствора, содержащего феруловую кислоту и заданный уровень 4-винилгваякола
- инкубирования подлежащего тестированию штамма дрожжей *Dekkera* с указанным водным раствором
- определения уровня 4-винилгваякола в водном растворе после указанной инкубации

причем повышение уровня 4-винилгваякола считается мерой превращения п-кумаровой кислоты в 4-винилгваякол.

Соответственно, предпочтительно, чтобы при инкубации штамма дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением в водном растворе, содержащем заданный уровень феруловой кислоты и заданный уровень 4-винилгваякола, повышение уровня 4-винилгваякола в молях после инкубации составляло не более 25%, как, например, не более 20%, как, например, не более 15%, например, не более 10%, как, например, не более 5%, например, не более 1% от заданного уровня феруловой кислоты в молях.

Инкубацию указанного штамма дрожжей *Dekkera* в водном растворе можно осуществлять любым подходящим способом, например, как описано в настоящем документе выше.

Характеристика III

Штамм дрожжей *Dekkera* по настоящему изобретению также может обладать характеристикой III, причем характеристика III заключается в том, что штамм дрожжей *Dekkera* не способен использовать более 2% мальтозы. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения штамм дрожжей не способен использовать более 1,5%, как, например, 1%, как, например, 0,1% мальтозы.

Другими словами, настоящее изобретение относится к штамму дрожжей *Dekkera*, который не способен использовать более 20 г/л мальтозы. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения штамм дрожжей не способен использовать более 15 г/л, как, например, 10 г/л, как, например, 1 г/л мальтозы.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением обладает характеристикой III, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также имеет один или несколько из генотипов III, IV и V. Предпочтительно указанный штамм дрожжей имеет все из генотипов III, IV и V.

Способность штамма дрожжей использовать мальтозу можно рассчитывать с применением разных способов. Один из способов состоит в измерении количества мальтозы, присутствующей в водном экстракте или водном растворе, содержащем мальтозу, до инкубации водного экстракта или водного раствора со штаммом дрожжей и после инкубации со штаммом дрожжей, и расчете разницы в количестве мальтозы до и после инкубации со штаммом дрожжей. Инкубация водного экстракта со штаммом дрожжей может происходить, например, при 5-30°C, как, например, при 10-28°C, как, например, при 15-25°C, в течение 1-21 суток, например, в течение 2-10 суток, например, в течение 3-7 суток. Инкубация водного раствора со штаммом дрожжей может происходить, например, при 15-35°C, как, например, при 20-30°C, в течение 1-80 часов, как, например, в течение 60-80 часов. Разницу в количестве мальтозы, например, можно применять для расчета абсолютного количества мальтозы, например, в г/кг или г/л, использованного штаммом дрожжей, или расчета его в виде % (например, масс./масс.) использованной мальтозы.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения указанный штамм дрожжей не способен использовать более 2% мальтозы при инкубации в водном

растворе, содержащем мальтозу и глюкозу. Предпочтительно указанный штамм дрожжей не способен использовать более 1,5%, как, например, 1%, как, например, 0,1% мальтозы при инкубации в водном растворе, содержащем мальтозу и глюкозу. Указанный водный экстракт может представлять собой, в частности, сусло. Инкубация указанного штамма дрожжей в указанном водном экстракте может происходить, например, при 5-30°C, как, например, при 10-28°C, как, например, при 15-25°C, в течение 1-21 суток, например, в течение 3-7 суток. Водный экстракт может содержать, например, более 40 г/кг мальтозы. Согласно одному варианту осуществления водный раствор может содержать мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 40-100 г/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения водный раствор например, может содержать глюкозу в количестве, находящемся в диапазоне 4-50 г/кг.

Предпочтительно штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением не способен использовать более 2%, как, например, более 1% мальтозы при инкубации при 25°C в течение 10 суток в водном растворе, содержащем мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 40-100 г/кг, и глюкозу в количестве, находящемся в диапазоне 8-50 г/кг. Особенно предпочтительно, штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением не способен использовать более 2%, как, например, более 1% мальтозы, при определении путем сбраживания сусла, как описано в настоящем документе ниже в примере 5.

При определении того, способен ли штамм дрожжей использовать мальтозу, в целом предпочтительно применять способ определения концентрации мальтозы, причем способ характеризуется погрешностью измерения, которая значительно меньше 2% по отношению к общей концентрации мальтозы. Например, это может быть достигнуто с применением среднего значения нескольких измерений, например, по меньшей мере 10 независимых измерений.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением не способен использовать мальтозу, присутствующую в водном растворе. Согласно таким вариантам осуществления, например, количество мальтозы, присутствующей в водном растворе после инкубации со штаммом дрожжей, будет не меньше количества мальтозы, присутствующей в водном экстракте до инкубации со штаммом дрожжей.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения штамм дрожжей не способен использовать мальтозу в качестве единственного источника углерода. Таким образом, предпочтительно, чтобы штамм дрожжей не был способен расти и/или обладал незначительной метаболической активностью в водном растворе, содержащем мальтозу в

качестве единственного источника углерода. Такой водный раствор предпочтительно не содержит каких-либо моносахаридов, дисахаридов, трисахаридов и/или тетрасахаридов помимо мальтозы, и более предпочтительно такой водный раствор не содержит каких-либо углеводов помимо мальтозы. Например, считается, что штамм дрожжей обладает незначительной метаболической активностью, если незначительная метаболическая активность определяется, как описано в примере 4 ниже.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению не способен расти и/или обладает незначительным метаболизмом при инкубации в водном растворе, содержащем мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 5-15 г/л, например, мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 8-12 г/л, причем мальтоза является единственным источником углерода. Такой водный раствор предпочтительно не содержит каких-либо углеводов помимо мальтозы в указанной концентрации. Период инкубации может составлять 1-80 часов, как, например, 60-80 часов, например, при 15-35°C, как, например, при 20-30°C. Например, считается, что штамм дрожжей обладает незначительной метаболической активностью, если незначительная метаболическая активность определяется, как описано в примере 4 ниже.

Роста штамма дрожжей можно измерять с применением разных способов. Согласно одному варианту осуществления рост штамма дрожжей определяют с помощью способа, предусматривающего стадии:

- обеспечения водного раствора, содержащего мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 5-15 г/л, в качестве единственного источника углерода,
- инкубирования указанного водного раствора с заданным числом дрожжевых клеток указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением в течение 60-80 часов при 20-30°C
- определения числа дрожжевых клеток в водном растворе

Число дрожжевых клеток можно определять с помощью любого подходящего способа, известного в данной области.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения рост штамма дрожжей коррелирует с метаболической активностью. В таких случаях рост определяют опосредованно путем определения метаболической активности. Метаболическую активность можно определять, например, с помощью способа, предусматривающего стадий:

- обеспечения водного раствора, содержащего мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 5-15 г/л, в качестве единственного источника углерода и заданный уровень определенного соединения (например, тетразолия), которое

соответствует продукции NADH, будучи восстановленным до красителя (например, фиолетового формазана),

- инкубирования указанного водного раствора с указанным штаммом дрожжей в соответствии с настоящим изобретением в течение 60-80 часов при 20-30°C
- определения количества восстановленного красителя (например, фиолетового формазана) в водном растворе.

Предпочтительно тест в отношении роста и/или метаболической активности дрожжевых клеток осуществляют в повторях, как, например, в двух повторях или в трех повторях и т. д. Таким образом, стадии способа предпочтительно можно осуществлять один или несколько раз, как, например, 2 или более раз, как, например, 3 или более раз, как, например, 10 или более раз для каждого тестируемого штамма дрожжей. Среднее значение роста и/или метаболической активности штамма дрожжей можно рассчитывать в виде среднего количества восстановленного красителя в пределах повторов для тестируемого штамма дрожжей.

Для измерения количества восстановленного красителя (например, фиолетового формазана) можно применять несколько способов.

Соответственно, если указанный штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением инкубируют в водном растворе, содержащем мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 5-15 г/л, в качестве единственного источника углерода, требуемые для роста дрожжей неуглеводные компоненты и заданный уровень красителя, соответствующего клеточной продукции NADH, в течение 60-80 часов при 20-30°C, то указанный штамм дрожжей не способен расти и/или считается, что он обладает незначительной метаболической активностью, если количество восстановленного красителя, измеряемого с помощью OmniLog®Biolog, составляет не более 50 единиц OmniLog, как, например, не более 40 единиц OmniLog.

Согласно одному варианту осуществления указанный штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением не способен расти и/или считается, что он обладает незначительной метаболической активностью, при инкубации в течение 80 часов при 25°C в водном растворе, содержащем 10 г/л мальтозы в качестве единственного источника углерода, требуемые для роста дрожжей неуглеводные компоненты и заданный уровень тетразолиевого красителя, причем считается, что указанный штамм дрожжей не способен расти и/или считается, что он обладает незначительной метаболической активностью, если образование фиолетового формазана, измеряемого с помощью OmniLog®Biolog, находится на уровне не более 50 единиц OmniLog спустя 80 часов.

Согласно другому варианту осуществления рост указанного тестируемого штамма дрожжей измеряют по кинетике роста указанного штамма дрожжей в ходе периода инкубации. Таким образом, количество восстановленного красителя можно определять и откладывать на графике в зависимости от времени инкубации, благодаря чему можно рассчитать наклон кривой, демонстрирующий количество восстановленного красителя в динамике.

Соответственно, если указанный штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением инкубируют в водном растворе, содержащем мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 5-15 г/л, в качестве единственного источника углерода, требуемые для роста дрожжей неуглеводные компоненты и заданный уровень красителя, соответствующего клеточной продукции NADH, в течение 60-80 часов при 20-30°C, то указанный штамм дрожжей не способен расти и/или считается, что он обладает незначительной метаболической активностью, если наклон кривой, демонстрирующий количество восстановленного красителя, измеряемого с помощью OmniLog®Biolog в динамике, составляет менее 0,2, как, например, менее 0,1, как, например, менее 0,05 единиц OmniLog/час.

Согласно одному варианту осуществления указанный штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением не способен расти и/или считается, что он обладает незначительной метаболической активностью, при инкубации в течение 80 часов при 25°C в водном растворе, содержащем 10 г/л мальтозы в качестве единственного источника углерода, требуемые для роста дрожжей неуглеводные компоненты и заданный уровень тетразолиевого красителя, причем считается, что указанный штамм дрожжей не способен расти и/или считается, что он обладает незначительной метаболической активностью, если наклон кривой, демонстрирующий фиолетовый формазан, измеряемый с помощью OmniLog®Biolog в динамике, составляет не более 0,2, как, например, не более 0,1, как, например, не более 0,05 единиц OmniLog/час.

Другой неограничивающий способ определения количества восстановленного красителя заключается в измерении количества восстановленного красителя с применением спектрофотометра. Таким образом, одним из примеров в настоящем документе является измерение количества формазана с помощью спектрофотометра на длине волны 590 нм.

Согласно одному варианту осуществления указанный штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением инкубируют в водном растворе, содержащем мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 5-15 г/л, в качестве единственного источника углерода, требуемые для роста дрожжей неуглеводные компоненты и заданный

уровень красителя, соответствующего продукции NADH, в течение 60-80 часов при 20-30°C, причем считается, что указанный штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением не способен расти, и/или считается, что он обладает незначительной метаболической активностью, если количество восстановленного красителя, измеряемого на длине волны 590 нм с помощью спектрофотометра, не увеличивается более чем в 2 раза спустя 80 часов.

Согласно одному варианту осуществления указанный штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением не способен расти и/или считается, что он обладает незначительной метаболической активностью, при инкубации в течение 80 часов при 25°C в водном растворе, содержащем 10 г/л мальтозы в качестве единственного источника углерода, требуемые для роста дрожжей неуглеводные компоненты и заданный уровень тетразолиевого красителя, причем считается, что указанный штамм дрожжей не способен расти и/или считается, что он обладает незначительной метаболической активностью, если образование фиолетового формазана, измеряемого на длине волны 590 нм с помощью спектрофотометра, не увеличивается более чем в 2 раза спустя 80 часов.

Характеристика IV

Штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением также может обладать характеристикой IV, причем характеристика IV заключается в том, что штамм дрожжей *Dekkera* не способен использовать более 5% мальтотриозы. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения штамм дрожжей не способен использовать более 4% мальтотриозы, как, например, 3%, как, например, 2%, как, например, 1%, как, например, 0,1% мальтотриозы.

Таким образом, при инкубации в водном экстракте, содержащем мальтотриозу, указанный штамм дрожжей не способен использовать более 5% указанной мальтотриозы. Предпочтительно указанный штамм дрожжей не способен использовать более 1,5%, как, например, 1%, как, например, 0,1% указанной мальтотриозы, присутствующей в водном экстракте. Указанный водный экстракт может представлять собой, в частности, сусло. Инкубация указанного штамма дрожжей в указанном водном экстракте может происходить, например, при 5-25°C, как, например, при 10-20°C, в течение 1-21 суток, например, в течение 3-7 суток. Количество мальтотриозы в водном экстракте может составлять, например, 1-50 г/кг, как, например, 10-20 г/л.

Способность штамма дрожжей не использовать мальтотриозу можно рассчитывать, как описано выше для мальтозы.

Один из пригодных способов определения того, не способен ли штамм дрожжей использовать мальтотриозу в сусле, описан в примере 5.

Характеристика V

Штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением также может обладать характеристикой V, причем характеристика V заключается в том, что штамм дрожжей *Dekkera* не способен использовать более 5% мальтотетраозы. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения штамм дрожжей не способен использовать более 4% мальтотриозы, как, например, 3%, как, например, 2%, как, например, 1%, как, например, 0,1% мальтотетраозы.

Таким образом, при инкубации в водном экстракте, содержащем мальтотетраозу, указанный штамм дрожжей не способен использовать более 5% указанной мальтотетраозы. Предпочтительно указанный штамм дрожжей не способен использовать более 1,5%, как, например, 1%, как, например, 0,1% указанной мальтотриозы, присутствующей в водном экстракте. Указанный водный экстракт может представлять собой, в частности, сусло. Инкубация указанного штамма дрожжей в указанном водном экстракте может происходить, например, при 5-25°C, как, например, при 16-18°C, в течение 1-21 суток, например, в течение 3-7 суток. Количество мальтотриозы в водном экстракте может составлять, например, 0,5-15 г/кг, как, например, 1-5 г/л.

Способность штамма дрожжей не использовать мальтотетраозу можно рассчитывать, как описано выше для мальтозы.

Один из пригодных способов определения того, не способен ли штамм дрожжей использовать мальтотетраозу в сусле, описан в примере 5.

Характеристики VI

Штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением также может обладать характеристикой VI, причем характеристика VI заключается в том, что штамм дрожжей *Dekkera* не способен использовать глюкозу. Таким образом, при инкубации в водном экстракте, содержащем глюкозу, указанный штамм дрожжей способен использовать часть глюкозы, присутствующей в водном экстракте.

Более предпочтительно штамм дрожжей способен использовать глюкозу в качестве единственного источника углерода. Таким образом, штамм дрожжей способен расти в среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода. Такая среда предпочтительно не содержит каких-либо моносахаридов, дисахаридов, трисахаридов и/или тетрасахаридов помимо глюкозы, и более предпочтительно такая среда не содержит каких-либо углеводов помимо глюкозы. Один из пригодных способов определения того, способен ли штамм дрожжей использовать глюкозу в качестве единственного источника углерода, описан в примере 4.

Специалисту в данной области будет понятно, что описанные в примере 4 способы можно применять для тестирования того, способен ли штамм дрожжей расти в среде, содержащей глюкозу или мальтозу в качестве единственного источника углерода, и что описанный в примере 5 способ можно применять для тестирования того, способен ли штамм дрожжей использовать сбраживаемые сахара, такие как мальтоза, мальтотриоза, мальтотетраоза и глюкоза, присутствующие в водном экстракте, таком как сусло.

Характеристики VII

Штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением также может обладать характеристикой VII, причем характеристика VII заключается в том, что штамм дрожжей *Dekkera* характеризуется низким уровнем продукции этанола. Поскольку количество этанола, продуцируемого данным штаммом дрожжей, сильно зависит от исходного материала, предпочтительно, чтобы штамм дрожжей не был способен к образованию более 1,5 промилле этанола на Plato, как, например, 1,3 промилле этанола на Plato, как, например, 1,1 промилле этанола на Plato. Plato является мерой плотности жидкости, и, таким образом, указывает на уровень сахаров и других сбраживаемых питательных веществ.

Согласно одному варианту осуществления предпочтительно, чтобы штамм дрожжей не был способен к образованию более 1,5 промилле этанола на Plato при добавлении указанного штамма дрожжей в водный экстракт с содержанием сахара не более 10 Plato, как, например, не более 9° Plato. В частности, штамм дрожжей не способен к образованию более 1,5 промилле этанола на° Plato, если указанный штамм дрожжей добавляют в водный экстракт, содержащий глюкозу и мальтозу. Водный экстракт может содержать более 40 г/кг мальтозы. Согласно одному варианту осуществления водный раствор может содержать мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 40-100 г/кг. Согласно одному варианту осуществления водный экстракт может содержать, например, не более 15 г/кг глюкозы, как, например, не более 10 г/кг глюкозы, например, не более 5 г/кг глюкозы.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения штамм дрожжей *Dekkera* не способен продуцировать более 2% этанола. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения штамм дрожжей не способен продуцировать более 1,5% этанола. Таким образом, при инкубации в водном экстракте, содержащем мальтозу и глюкозу, указанный штамм дрожжей не способен продуцировать более 2% этанола, как, например, более 1,5% этанола. Указанный водный экстракт может представлять собой, в частности, сусло. Инкубация указанного штамма дрожжей в указанном водном экстракте может происходить, например, при 5-25°C, как, например, при 10-20°C, в течение 1-21 суток, например, в течение 3-7 суток. Количество мальтозы в водном экстракте может

составлять, например, 5-200 г/кг, как, например, 40-70 г/кг, как, например, 50-60 г/кг. Водный экстракт может содержать не более 15 г/кг глюкозы, как, например, не более 10 г/кг глюкозы. Согласно одному примеру указанный штамм дрожжей может быть не способен продуцировать более 2% этанола при инкубации в водном экстракте, содержащем 50-60 г/кг мальтозы и 9-11 г/кг глюкозы, как описано в настоящем документе ниже в примере 5.

Bud

Штамм дрожжей может представлять собой любой штамм дрожжей *Dekkera*. Если не указано иное, термин «*Dekkera*» в настоящей заявке будет охватывать дрожжи как *Dekkera* (например, телеоморфные формы), так и *Brettanomyces* (например, анаморфные формы).

Согласно предпочтительным вариантам осуществления штамм дрожжей относится к видам *Dekkera anomalus*, *Dekkera bruxellensis*, *Brettanomyces anomalus* или *Brettanomyces bruxellensis*. В частности, штамм дрожжей может относиться к видам *Dekkera bruxellensis* или *Dekkera anomalus*, оба из которых, как было обнаружено, обеспечивают уникальные и благоприятные вкусовые характеристики в ходе сбраживания, по сравнению с другими видами *Dekkera*. Согласно предпочтительному варианту осуществления штамм дрожжей представляет собой *Dekkera anomalus*. *Dekkera anomalus* также известен как *Dekkera claussenii*.

Генетическая среда

Картирование генов

Для штаммов дрожжей *Dekkera* осуществляли полногеномное секвенирование.

CRL-49 (*Dekkera anomalus*) применяли в настоящем документе в качестве эталона для *D. anomalus*. Геном изолята *D. bruxellensis* UMY321 служил в качестве эталона для *D. bruxellensis*. UMY321 имеется в открытом доступе на сайте NCBI.

Были идентифицированы все открытые рамки считывания геномов, и предполагаемая функция каждого гена была основана на сравнении с базами данных UniprotKB и Pfam с применением Blastp и HMMER соответственно. Предполагаемая функция предсказанных генов, отвечающих за ассимиляцию мальтозы, ранее не была подтверждена.

У *Dekkera* идентифицировали два гена, потенциально ответственных за образование POF, один ген декарбоксилазы, обозначаемый в настоящем документе «DPAD», и один ген супероксиддисмутазы, обозначаемый в настоящем документе «DSOD». *Dekkera bruxellensis* имеет два гена PAD, DbPAD1 и DbPAD2. Если не указано иное, термин PAD по отношению к *Dekkera bruxellensis* относится к DbPAD2. Последовательности генов и

полипептидов PAD и SOD *Dekkera* представлены в настоящем документе следующим образом:

- *DaPAD1* (SEQ ID NO:1), кодирующий белок DaPAD1 SEQ ID NO:2
- *DaSOD* (SEQ ID NO:3), кодирующий белок DaSOD SEQ ID NO:4
- *DbPAD1* (SEQ ID NO:23), кодирующий белок DbPAD1 SEQ ID NO:24
- *DbPAD2* (SEQ ID NO:5), кодирующий белок DbPAD2 за пределами рамки считывания SEQ ID NO:6
- *DbSOD* (SEQ ID NO:7), кодирующий белок DbSOD SEQ ID NO:8

У *Dekkera* идентифицировали гены, потенциально ответственные за ассимиляцию мальтозы:

Они включают гены транспортеров мальтозы, обозначаемые в настоящем документе «MTRA», и гены основной изомальтазы, обозначаемые в настоящем документе «ISOM»:

- *DaMTRA1* (SEQ ID NO:9), кодирующий белок DaMTRA1 SEQ ID NO:10
- *DaISOM* (SEQ ID NO:11), кодирующий белок DaISOM SEQ ID NO:12
- *DaMTRA2* (SEQ ID NO:13), кодирующий белок DaMTRA2 SEQ ID NO:14
- *DbMTRA1* (SEQ ID NO:15), кодирующий белок DbMTRA1 SEQ ID NO:16
- *DbISOM(2)* (SEQ ID NO:17), кодирующий белок DbISOM(2) SEQ ID NO:18
- *DbMTRA2* (SEQ ID NO:19), кодирующий белок DbMTRA2 SEQ ID NO:20
- *DbISOM(1)* (SEQ ID NO:21), кодирующий белок DbISOM(1) SEQ ID NO:22
- *DbMTRA3* (SEQ ID NO:25), кодирующий белок DbMTRA3 SEQ ID NO:26
- *DbMTRA4* (SEQ ID NO:27), кодирующий белок DbMTRA4 SEQ ID NO:28
- *DbMTRA5* (SEQ ID NO:29), кодирующий белок DbMTRA5 SEQ ID NO:30
- *DbMTRA6* (SEQ ID NO:31), кодирующий белок DbMTRA6 SEQ ID NO:32
-

Гены, вовлеченные в ассимиляцию мальтозы, распределены по всему геному, при этом основной кластер, содержащий ген фермента ISOM, находится в окружении генов транспортеров мальтозы (MTRA1, MTRA2, MTRA3, MTRA4), присутствующих в скаффолде I, т. е. в настоящем документе называемом локусами MAL.

Генотип – фенотип

Штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением может обладать одной или несколькими из фенотипических характеристик I-III, описанных в настоящем документе выше. В дополнение к фенотипическим характеристикам I-III, или в качестве альтернативы, штамм дрожжей может обладать одной или несколькими характеристиками, выбранными из группы, состоящей из характеристик IV, V, VI и VII.

В дополнение к указанным фенотипическим характеристикам, штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением может иметь один или несколько из генотипов I-X, описанных в настоящем документе ниже. Указанные генотипы могут быть связаны с описанными выше фенотипическими характеристиками I-III, а также описанными выше фенотипическими характеристиками IV-VII.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере имеет генотип I, описанный в настоящем документе ниже. В дополнение к наличию генотипа I, указанные дрожжи могут также иметь один или несколько из генотипов II-V и обладать одной или несколькими из описанных выше фенотипических характеристик.

Таким образом, согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения штамм дрожжей имеет по меньшей мере описанный ниже генотип I и описанный ниже генотип II. В дополнение к наличию генотипов I и II, указанные дрожжи также могут иметь один или несколько из генотипов III-V и обладать одной или несколькими из характеристик I-III.

Согласно другому варианту осуществления штамм дрожжей может иметь дополнительный генотип и фенотип, описанные в настоящем документе ниже.

Генотип I: PAD

Штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением может иметь генотип I, причем в случае генотипа I присутствуют одна или несколько мутаций или делеция гена, кодирующего PAD. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением имеет генотип I, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также обладает характеристикой I и/или II, предпочтительно указанный штамм дрожжей обладает характеристиками как, I так и II.

Ген, кодирующий функциональный PAD, у *Dekkera anomalus* в настоящем документе обозначается как PAD1, тогда как у *Dekkera bruxellensis* он обозначается как PAD2. Соответственно, в случае генотипа I могут присутствовать одна или несколько мутаций или делеция гена, кодирующего PAD2 *Dekkera bruxellensis*, или гена, кодирующего PAD1 *Dekkera anomalus*.

Согласно одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей имеет генотип I, причем генотип I означает, что указанный штамм дрожжей предусматривает мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DaPAD1 SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей имеет генотип I, причем генотип I означает, что указанный штамм дрожжей предусматривает мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbPAD2 SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

PAD может быть ответственен за декарбоксилирование п-кумаровой кислоты с образованием 4-винилфенола, а также декарбоксилирование феруловой кислоты с образованием 4-винилгваякола.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения у штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует ген, кодирующий PAD. Таким образом, штамм дрожжей может предусматривать делецию гена, кодирующего PAD.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, у указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует ген, кодирующий DaPAD1 SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей. Другими словами, штамм дрожжей вида *Dekkera anomalus* может предусматривать делецию гена, кодирующего DaPAD1 SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей. В частности, указанный штамм дрожжей вида *Dekkera anomalus* может предусматривать делецию гена, кодирующего DaPAD1 SEQ ID NO:2.

Согласно еще одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, у указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует ген, кодирующий DbPAD2 SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей. Другими словами, штамм дрожжей вида *Dekkera bruxellensis* может предусматривать делецию гена, кодирующего DbPAD2 SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением предусматривает одну или несколько делеций в гене, кодирующем PAD, так что указанный ген кодирует мутантный полипептид PAD, в котором отсутствуют по меньшей мере некоторые из аминокислот PAD, как, например, отсутствуют по меньшей мере 10% аминокислот PAD, как, например, отсутствуют по меньшей мере

20%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 30%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 40%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 50%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 60%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 70%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 80%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 90% аминокислот PAD.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, у указанного штамма дрожжей отсутствует часть гена, кодирующего DaPAD1, как, например, отсутствуют по меньшей мере 10% аминокислот DaPAD1, как, например, отсутствуют по меньшей мере 20%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 30%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 40%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 50%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 60%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 70%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 80%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 90% аминокислот DaPAD1 SEQ ID NO:2 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, у указанного штамма дрожжей отсутствует часть гена, кодирующего DbPAD2, как, например, отсутствуют по меньшей мере 10% аминокислот DbPAD2, как, например, отсутствуют по меньшей мере 20%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 30%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 40%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 50%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 60%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 70%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 80%, как, например, отсутствуют по меньшей мере 90% аминокислот DbPAD2 SEQ ID NO:6 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *PAD*, кодирующего мутантный PAD1. Например, штамм дрожжей может нести мутацию в гене *PAD*, приводящую к потере функции PAD, и, в частности, к полной потере функции PAD.

Штамм дрожжей, несущий одну или несколько мутаций в гене *PAD*, приводящих к потере функции PAD, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *PAD*, кодирующего мутантный белок PAD, предусматривающий одну или несколько аминокислотных замен, как, например, 5 или более, как, например, 10 или более, как, например, 15 или более, как, например, 20 или более аминокислотных замен. Указанные аминокислотные замены могут представлять собой любые аминокислотные замены, причем аминокислота замещена другой аминокислотой.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотные замены расположены в N-концевой области PAD. Согласно одному варианту осуществления аминокислотные замены расположены в C-концевой области PAD.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением несет мутацию в гене *PAD*, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *PAD*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *PAD*;
- мутация в промоторной области гена *PAD*; и/или
- мутация в интроне гена *PAD*

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalous*, указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DaPAD1* SEQ ID NO:1, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DaPAD1*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *DaPAD1*;
- мутация в промоторной области гена *DaPAD1*; и/или
- мутация в интроне гена *DaPAD1*.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DbPAD2* SEQ ID NO:5, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DbPAD2*;

- мутация в сайте сплайсинга гена *DbPAD2*;
- мутация в промоторной области гена *DbPAD2*; и/или
- мутация в интроне гена *DbPAD2*.

Мутация в сайте сплайсинга, промоторной области и/или интроне гена *PAD* может приводить к aberrантному сплайсингу мРНК *PAD*, и/или aberrантной транскрипции мРНК *PAD*, и/или aberrантной трансляции белка *PAD*. Такой штамм дрожжей может, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК *PAD*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже, и/или сниженными уровнями белка *PAD*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже.

Потерю функции *PAD* можно определять с помощью любого способа, известного специалисту в данной области. Один из способов определения функции *PAD* может заключаться в определении уровня экспрессии *PAD* либо на уровне мРНК, либо на уровне белка.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции *PAD*, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК или мРНК дикого типа *PAD* по сравнению с уровнем мРНК *PAD* у штамма дрожжей, содержащего ген *PAD* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции *PAD*, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК *PAD* или мРНК *PAD* дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *PAD* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный *PAD* относится к мРНК, кодируемой мутантным геном *PAD*, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанная мРНК *PAD* представляет собой мРНК *DaPAD1*, кодирующую полипептид SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, а ген *DaPAD1* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:2. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции *DaPAD1* может не содержать мутантной мРНК *DaPAD1* или мРНК *DaPAD1* дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR. Согласно другому варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является

штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанная мРНК PAD представляет собой мРНК DbPAD2, кодирующую полипептид SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, а ген *DbPAD2* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:6. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DbPAD2 может не содержать мутантной мРНК DbPAD2 или мРНК DbPAD2 дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции PAD, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантного белка PAD или белка PAD дикого типа по сравнению с уровнем белка PAD у штамма дрожжей, содержащего ген *PAD* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции PAD, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка PAD или белка PAD дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *PAD* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок PAD представляет собой полипептид, кодируемый мутантным геном *DPAD*, несущим мутацию в кодирующей области. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный белок PAD представляет собой полипептид DaPAD1 SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, а ген *DaPAD1* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:2. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DaPAD1 может не содержать мутантный белок DaPAD1 или белок DaPAD1 дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга. Согласно другому варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный белок PAD представляет собой полипептид DbPAD2 SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, а ген *DbPAD2* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%

идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:6. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DbPAD2 может не содержать мутантный белок DbPAD2 или белок DbPAD2 дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга.

Штамм дрожжей может, например, иметь генотип I, описанный в настоящем документе выше в вариантах осуществления настоящего изобретения, где штамм дрожжей не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% феруловой кислоты в 4-этилгваякол.

Генотип II: SOD1

Штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением может иметь генотип II, причем в случае генотипа II присутствуют одна или несколько мутаций или делеция гена, кодирующего SOD.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением имеет генотип II, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также обладает характеристикой I и/или II, предпочтительно указанный штамм дрожжей обладает характеристиками как, I так и II.

Согласно одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей имеет генотип II, причем генотип II предусматривает мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DaSOD SEQ ID NO:4 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей имеет генотип II, причем генотип II предусматривает мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbSOD SEQ ID NO:8 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

SOD может быть ответственен за вторую стадию восстановления 4-винилфенола с образованием 4-этилфенола, а также восстановления 4-винилгваякола с образованием 4-этилгваякола.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения у штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует ген, кодирующий SOD. Таким образом, штамм дрожжей может предусматривать делецию гена, кодирующего SOD.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, у указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует ген, кодирующий DaSOD SEQ ID NO:4 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей. Другими словами, штамм дрожжей вида *Dekkera anomalus* может предусматривать делецию гена, кодирующего DaSOD SEQ ID NO:4 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

Согласно еще одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, у указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует ген, кодирующий DbSOD SEQ ID NO:8 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей. Другими словами, штамм дрожжей вида *Dekkera bruxellensis* может предусматривать делецию гена, кодирующего DbSOD SEQ ID NO:8 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления, штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением предусматривает одну или несколько делеций в гене, кодирующем SOD, так что указанный ген кодирует мутантный SOD, в котором отсутствует по меньшей мере некоторая часть SOD, как, например, отсутствует по меньшей мере 10% SOD, как, например, отсутствует по меньшей мере 20%, как, например, отсутствует по меньшей мере 30%, как, например, отсутствует по меньшей мере 40%, как, например, отсутствует по меньшей мере 50%, как, например, отсутствует по меньшей мере 60%, как, например, отсутствует по меньшей мере 70%, как, например, отсутствует по меньшей мере 80%, как, например, отсутствует по меньшей мере 90% SOD.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, у указанного штамма дрожжей отсутствует часть гена, кодирующего DaSOD, как, например, отсутствует по меньшей мере 10% DaSOD, как, например, отсутствует по меньшей мере 20%, как, например, отсутствует по меньшей мере 30%, как, например, отсутствует по меньшей мере 40%, как, например, отсутствует по меньшей мере 50%, как, например, отсутствует по меньшей мере 60%, как, например, отсутствует по меньшей мере 70%, как, например, отсутствует по меньшей мере 80%, как, например, отсутствует по меньшей мере 90% DaSOD SEQ ID NO:4 или его

функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, у указанного штамма дрожжей отсутствует часть гена, кодирующего DbSOD, как, например, отсутствует по меньшей мере 10% DbSOD, как, например, отсутствует по меньшей мере 20%, как, например, отсутствует по меньшей мере 30%, как, например, отсутствует по меньшей мере 40%, как, например, отсутствует по меньшей мере 50%, как, например, отсутствует по меньшей мере 60%, как, например, отсутствует по меньшей мере 70%, как, например, отсутствует по меньшей мере 80%, как, например, отсутствует по меньшей мере 90% DbSOD SEQ ID NO:8 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или более мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *SOD*, кодирующего мутантный SOD. Например, штамм дрожжей несет мутацию в гене *SOD*, приводящую к потере функции *SOD*, и, в частности, к полной потере функции *SOD*.

Штамм дрожжей, несущий одну или несколько мутаций в гене *SOD*, приводящих к потере функции *SOD*, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *SOD*, кодирующего мутантный белок *SOD*, предусматривающий одну или несколько аминокислотных замен, как, например, 5 или более, как, например, 10 или более, как, например, 15 или более, как, например, 20 или более аминокислотных замен. Указанные аминокислотные замены могут представлять собой любые аминокислотные замены, причем аминокислота замещена другой аминокислотой.

Согласно одному варианту осуществления аминокислотные замены расположены в N-концевой области *SOD*. Согласно одному варианту осуществления аминокислотные замены расположены в C-концевой области *SOD*.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением несет мутацию в гене *SOD*, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *SOD*;

- мутация в сайте сплайсинга гена *SOD*;
- мутация в промоторной области гена *SOD*; и/или
- мутация в интроне гена *SOD*.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DaSOD* SEQ ID NO:3, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DaSOD*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *DaSOD*;
- мутация в промоторной области гена *DaSOD*; и/или
- мутация в интроне гена *DaSOD*.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DbSOD* SEQ ID NO:7, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DbSOD*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *DbSOD*;
- мутация в промоторной области гена *DbSOD*; и/или
- мутация в интроне гена *DbSOD*.

Мутация в сайте сплайсинга, промоторной области и/или интроне гена *SOD* может приводить к aberrantному сплайсингу мРНК *SOD*, и/или aberrантной транскрипции мРНК *SOD*, и/или aberrантной трансляции белка *SOD*. Такой штамм дрожжей может, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК *SOD*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже, и/или сниженными уровнями белка *SOD*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже.

Потерю функции *SOD* можно определять с помощью любого способа, известного специалисту в данной области. Один из способов определения функции *SOD* может заключаться в определении уровня экспрессии *SOD* либо на уровне мРНК, либо на уровне белка.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции *SOD*, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК

или мРНК дикого типа *SOD* по сравнению с уровнем мРНК *SOD* у штамма дрожжей, содержащего ген *SOD* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции *SOD*, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК *SOD* или мРНК *SOD* дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *SOD* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный *SOD* относится к мРНК, кодируемой мутантным геном *SOD*, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalous*, указанная мРНК DaSOD представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:4 или его функциональный гомолог, а ген *DaSOD* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:4 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:4. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DaSOD может не содержать мутантной мРНК DaSOD или мРНК DaSOD дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR. Согласно другому варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанная мРНК DbSOD представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:8 или его функциональный гомолог, а ген *DbSOD* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:8 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:8. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DbSOD может не содержать мутантной мРНК DbSOD или мРНК DbSOD дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции *SOD*, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантного белка *SOD* или белка *SOD* дикого типа по сравнению с уровнем белка *SOD* у штамма дрожжей, содержащего ген *SOD* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции *SOD*, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка *SOD* или белка *SOD* дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *SOD* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок *SOD* представляет

собой полипептид, кодируемый мутантным геном *SOD*, несущим мутацию в кодирующей области. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный белок DaSOD представляет собой полипептид SEQ ID NO:4 или его функциональный гомолог, а ген *DaSOD* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:4 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:4. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DaSOD может не содержать мутантный белок DaSOD или белок DaSOD дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга. Согласно другому варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный белок DbSOD представляет собой полипептид SEQ ID NO:8 или его функциональный гомолог, а ген *DbSOD* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:8 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:8. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DbSOD может не содержать мутантный белок DbSOD или белок DbSOD дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга.

Штамм дрожжей может, например, иметь генотип II, описанный в настоящем документе выше в вариантах осуществления настоящего изобретения, где штамм дрожжей не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% феруловой кислоты в 4-этилгваякол.

Генотип III: MTR1

Штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением может иметь дополнительный генотип, генотип III, причем в случае генотипа III присутствуют одна или несколько мутаций или делеция гена, кодирующего MTR1.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением имеет генотип III, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также обладает характеристикой III.

Согласно прогнозу предполагаемая функция MTR1 заключается в том, что он является высокоаффинным транспортером мальтозы.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения у штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует ген, кодирующий MTRA1. Таким образом, штамм дрожжей может предусматривать делецию гена, кодирующего MTRA1.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, у указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует ген, кодирующий DaMTRA1 SEQ ID NO:10 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98 % идентичностью последовательностей. Другими словами, дрожжи могут предусматривать делецию гена, кодирующего DaMTRA1 SEQ ID NO:10 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно еще одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, у указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует ген, кодирующий DbMTRA1 SEQ ID NO:16 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей. Другими словами, дрожжи могут предусматривать делецию гена, кодирующего DbMTRA1 SEQ ID NO:16 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением предусматривает одну или несколько делеций в гене, кодирующем MTRA1, так что указанный ген кодирует мутантный MTRA1, в котором отсутствует по меньшей мере некоторая часть MTRA1, как, например, отсутствует по меньшей мере 10% MTRA1, как, например, отсутствует по меньшей мере 20%, как, например, отсутствует по меньшей мере 30%, как, например, отсутствует по меньшей мере 40%, как, например, отсутствует по меньшей мере 50%, как, например, отсутствует по меньшей мере 60%, как, например, отсутствует по меньшей мере 70%, как, например, отсутствует по меньшей мере 80%, как, например, отсутствует по меньшей мере 90% MTRA1.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей предусматривает делецию в гене, кодирующем DaMTRA1, так что указанный ген кодирует мутантный DaMTRA1, в котором отсутствует по меньшей мере некоторая часть DaMTRA1, как, например, отсутствует по меньшей мере 10% DaMTRA1, как, например, отсутствует по меньшей мере 20%, как, например, отсутствует по меньшей мере 30%, как, например, отсутствует по меньшей мере 40%, как, например, отсутствует по меньшей мере 50%, как, например,

отсутствует по меньшей мере 60%, как, например, отсутствует по меньшей мере 70%, как, например, отсутствует по меньшей мере 80%, как, например, отсутствует по меньшей мере 90% DaMTRA1 SEQ ID NO:10 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98 % идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей предусматривает делецию в гене, кодирующем DbMTRA1, так что указанный ген кодирует мутантный DbMTRA1, в котором отсутствует по меньшей мере некоторая часть DbMTRA1, как, например, отсутствует по меньшей мере 10% DbMTRA1, как, например, отсутствует по меньшей мере 20%, как, например, отсутствует по меньшей мере 30%, как, например, отсутствует по меньшей мере 40%, как, например, отсутствует по меньшей мере 50%, как, например, отсутствует по меньшей мере 60%, как, например, отсутствует по меньшей мере 70%, как, например, отсутствует по меньшей мере 80%, как, например, отсутствует по меньшей мере 90% DbMTRA1 SEQ ID NO:16 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *MTRA1*, кодирующего мутантный *MTRA1*. Например, штамм дрожжей может нести мутацию в гене *MTRA1*, приводящую к потере функции *MTRA1*, и, в частности, к полной потере функции *MTRA1*.

Штамм дрожжей, несущий одну или несколько мутаций в гене *MTRA1*, приводящих к потере функции *MTRA1*, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *MTRA1*, кодирующего мутантный белок *MTRA1*, предусматривающий одну или несколько аминокислотных замен, как, например, 4 или больше, как, например, 8 или больше, как, например, 12 или больше, как, например, 14 или больше аминокислотных замен. Указанные аминокислотные замены могут представлять собой любые аминокислотные замены, причем аминокислота замещена другой аминокислотой.

Предпочтительно аминокислотные замены расположены в N-концевой области *MTRA1*.

Таким образом, согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *MTRA1*, кодирующего мутантный белок *MTRA1*, предусматривающий одну или несколько

аминокислотных замен, как, например, 4 или больше, как, например, 8 или больше, как, например, 12 или больше, как, например, 14 или больше аминокислотных замен в N-концевой области, состоящей из аминокислот 1-65 MTRA1.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *DaMTRA1*, кодирующего мутантный белок DaMTRA1, предусматривающий одну или несколько аминокислотных замен, как, например, 4 или больше, как, например, 8 или больше, как, например, 12 или больше, как, например, 14 или больше аминокислотных замен в N-концевой области, состоящей из аминокислот 1-65 DaMTRA1 SEQ ID NO: 10 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA1*, кодирующего мутантный белок DbMTRA1, предусматривающий одну или несколько аминокислотных замен, как, например, 4 или больше, как, например, 8 или больше, как, например, 12 или больше, как, например, 14 или больше аминокислотных замен в N-концевой области, состоящей из аминокислот 1-65 DbMTRA1 SEQ ID NO:16 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *MTRA1*, кодирующего мутантный белок MTRA1, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 4 аминокислоты, как, например, отсутствуют по меньшей мере 8, как, например, отсутствуют по меньшей мере 12, как, например, отсутствуют по меньшей мере 14 аминокислот. В частности, в указанном мутантном белке MTRA1 могут отсутствовать одна или несколько из аминокислот 1-65, как, например, отсутствуют по меньшей мере 4 аминокислоты, как, например, отсутствуют по меньшей мере 8, как, например, отсутствуют по меньшей мере 12, как, например, отсутствуют по меньшей мере 14 аминокислот из аминокислот в N-концевой области, состоящей из аминокислот 1-65 MTRA1.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DaMTRA1*, кодирующего

мутантный белок DaMTRA1, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 4 аминокислоты, как, например, отсутствуют по меньшей мере 8, как, например, отсутствуют по меньшей мере 12, как, например, отсутствуют по меньшей мере 14 аминокислот SEQ ID NO:10 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей. В частности, в указанном мутантном белке DaMTRA1 могут отсутствовать одна или несколько из аминокислот 1-65 SEQ ID NO:10, как, например, отсутствуют по меньшей мере 4 аминокислоты, как, например, отсутствуют по меньшей мере 8, как, например, отсутствуют по меньшей мере 12, как, например, отсутствуют по меньшей мере 14 аминокислот из аминокислот 1-65 SEQ ID NO:10 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 89% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA1*, кодирующего мутантный белок DbMTRA1, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 4 аминокислоты, как, например, отсутствуют по меньшей мере 8, как, например, отсутствуют по меньшей мере 12, как, например, отсутствуют по меньшей мере 14 аминокислот SEQ ID NO:16 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей. В частности, в указанном мутантном белке DbMTRA1 могут отсутствовать одна или несколько из аминокислот 1-65 SEQ ID NO:16, как, например, отсутствуют по меньшей мере 4 аминокислоты, как, например, отсутствуют по меньшей мере 8, как, например, отсутствуют по меньшей мере 12, как, например, отсутствуют по меньшей мере 14 аминокислот из аминокислот 1-65 SEQ ID NO:16 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 89% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *MTRA1*, кодирующего мутантный белок MTRA1, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к N-концу аминокислот MTRA1.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *DaMTRA1*, кодирующего мутантный белок DaMTRA1, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к N-концу аминокислот SEQ ID NO:10 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей. Например, штамм дрожжей может содержать мутантный ген *DaMTRA1*, кодирующий мутантный белок DaMTRA1, в котором отсутствуют по меньшей мере 64 наиболее близких к N-концу аминокислоты SEQ ID NO:10 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA1*, кодирующего мутантный белок DbMTRA1, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к N-концу аминокислот SEQ ID NO:16 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей. Например, штамм дрожжей может содержать мутантный ген *DbMTRA1*, кодирующий мутантный белок DbMTRA1, в котором отсутствуют по меньшей мере 64 наиболее близких к N-концу аминокислоты SEQ ID NO:16 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DaMTRA1*, кодирующего усеченный белок DaMTRA1, содержащий C-концевой фрагмент DaMTRA1, содержащий не более 579 C-концевых аминокислот SEQ ID NO:10 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей, например, не более 569 C-концевых аминокислот SEQ ID NO:10, как, например, не более 559 C-концевых аминокислот SEQ ID NO:10, как,

например, не более 529 С-концевых аминокислот SEQ ID NO:10, предпочтительно не более 524 С-концевых аминокислот SEQ ID NO:10.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA1*, кодирующего усеченный белок DbMTRA1, содержащий С-концевой фрагмент DbMTRA1, содержащий не более 579 С-концевых аминокислот SEQ ID NO:16 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей, например, не более 569 С-концевых аминокислот SEQ ID NO:16, как, например, не более 559 С-концевых аминокислот SEQ ID NO:16, как, например, не более 529 С-концевых аминокислот SEQ ID NO:16, предпочтительно не более 524 С-концевых аминокислот SEQ ID NO:16.

Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalous*, считается, что указанный штамм дрожжей характеризуется потерей функции DaMTRA1, если указанные дрожжи несут мутацию, приводящую в результате к образованию гена *DaMTRA1*, кодирующего мутантный белок DaMTRA1, в котором отсутствуют одна или несколько из следующих областей:

- W72-L155 SEQ ID NO:10
- F156-G382 SEQ ID NO:10
- A383-F532 SEQ ID NO:10

Согласно другому варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, считается, что указанный штамм дрожжей характеризуется потерей функции DbMTRA1, если указанные дрожжи несут мутацию, приводящую в результате к образованию гена *DbMTRA1*, кодирующего мутантный белок DbMTRA1, в котором отсутствуют одна или несколько из следующих областей:

- W72-M155 SEQ ID NO:16
- F156-V382 SEQ ID NO:16
- C383-F533 SEQ ID NO:16

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением несет мутацию в гене *MTRA1*, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;

- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *MTRAI*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *MTRAI*;
- мутация в промоторной области гена *MTRAI*;
- мутация в интроне гена *MTRAI*.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DaMTRAI* SEQ ID NO:10, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DaMTRAI*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *DaMTRAI*;
- мутация в промоторной области гена *DaMTRAI*; и/или
- мутация в интроне гена *DaMTRAI*.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DaMTRAI* SEQ ID NO:16, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DbMTRAI*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *DbMTRAI*;
- мутация в промоторной области гена *DbMTRAI*; и/или
- мутация в интроне гена *DbMTRAI*.

Мутация в сайте сплайсинга, мутация сдвига рамки считывания или мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона, обычно приводят к образованию мутантного гена, кодирующего усеченную форму MTRAI. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный усеченный DaMTRAI может содержать N-концевой фрагмент DaMTRAI, содержащий не более 500 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:10, например, не более 400 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:10, как, например, не более 300 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:10, как, например, не более 200 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:10, предпочтительно не более 100 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:10 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере

98% идентичностью последовательностей. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный усеченный DbMTRA1 может содержать N-концевой фрагмент DbMTRA1, содержащий не более 500 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:16, например, не более 400 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:16, как, например, не более 300 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:16, как, например, не более 200 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:16, предпочтительно не более 100 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:16 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Мутация в сайте сплайсинга, промоторной области и/или интроне гена *MTRA1* может приводить к aberrантному сплайсингу мРНК *MTRA1*, и/или aberrантной транскрипции мРНК *MTRA1* и/или aberrантной трансляции белка *MTRA1*. Такой штамм дрожжей может, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК *MTRA1*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже, и/или сниженными уровнями белка *MTRA1*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже.

Потерю функции *MTRA1* можно определять с помощью любого способа, известного специалисту в данной области. Один из способов определения функции *MTRA1* может заключаться в определении уровня экспрессии *MTRA1* либо на уровне мРНК, либо на уровне белка.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции *MTRA1*, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК или мРНК дикого типа *MTRA1* по сравнению с уровнем мРНК *MTRA1* у штамма дрожжей, содержащего ген *MTRA1* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции *MTRA1*, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК *MTRA1* или мРНК *MTRA1* дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA1* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный *MTRA1* представляет собой мРНК, кодируемую мутированным геном *MTRA1*, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанная мРНК DaMTRA1 представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:10 или его функциональный гомолог, а ген *DaMTRA1* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:10 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98%

идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:10. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции MTRA1 может не содержать мутантной мРНК MTRA1 или мРНК MTRA1 дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR. Согласно другому варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанная мРНК DbMTRA1 представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:16 или его функциональный гомолог, а ген *DbMTRA1* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:16 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:16. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции MTRA1 может не содержать мутантной мРНК MTRA1 или мРНК MTRA1 дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции MTRA1, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантного белка MTRA1 или белка MTRA1 дикого типа по сравнению с уровнем белка MTRA1 у штамма дрожжей, содержащего ген *MTRA1* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции MTRA1, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка MTRA1 или белка MTRA1 дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA1* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок MTRA1 представляет собой полипептид, кодируемый мутированным геном *MTRA1*, несущим мутацию в кодирующей области. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный белок DaMTRA1 представляет собой полипептид SEQ ID NO:10 или его функциональный гомолог, а ген *DaMTRA1* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:10 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:10. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DaMTRA1 может не содержать мутантный белок DaMTRA1 или белок DaMTRA1 дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга. Согласно другому варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный белок DbMTRA1 представляет собой полипептид SEQ ID NO:16 или

его функциональный гомолог, а ген *DbMTRA1* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:16 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:16. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции *DbMTRA1* может не содержать мутантный белок *DbMTRA1* или белок *DbMTRA1* дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга.

Штамм дрожжей может, например, иметь генотип III в вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей, помимо того, что он не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол и/или не способен превращать более 25% феруловой кислоты в 4-этилгваякол, не способен использовать более 2% мальтозы.

Генотип IV – ISOM и ISOM(2)

Штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением может иметь генотип IV, причем в случае генотипа IV присутствуют одна или несколько мутаций или делеция одного или нескольких из генов, кодирующих ISOM.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением имеет генотип IV, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также обладает характеристикой III.

Эта основная изомальтаза, ISOM, является потенциальным ферментом с альфа-глюкозидазной активностью, способным расщеплять связанные альфа-связями дисахариды, такие как мальтоза. В результате расщепления мальтозы образуются две моносахаридные молекулы глюкозы, которые затем могут сбраживаться дрожжами. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, штамм дрожжей несет одну копию гена *BaISOM* и, следовательно, один белок *BaISOM*. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, штамм дрожжей несет две копии потенциальных изомальтаз в геноме, в настоящем документе обозначаемых «ISOM(2)» и «ISOM(1)». Две копии имеют разные нуклеотидные последовательности и аминокислотные последовательности.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения у штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует по меньшей мере один ген, кодирующий белок ISOM. Таким образом, штамм дрожжей может предусматривать одну или несколько делеций гена(генов), кодирующего(кодирующих) ISOM.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, у указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует весь ген *DaISOM*, кодирующий DaISOM SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей. Другими словами, дрожжи могут предусматривать делецию гена, кодирующего ISOM SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, у указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует весь ген *DbISOM(2)*, кодирующий DbISOM(2) SEQ ID NO:18 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей. Другими словами, дрожжи могут предусматривать делецию гена, кодирующего DbISOM(2) SEQ ID NO:18 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением предусматривает делецию в одном или нескольких из генов, кодирующих ISOM, так что указанный несущий делецию ген кодирует мутантный ISOM, в котором отсутствует по меньшей мере 10% ISOM, как, например, отсутствует по меньшей мере 20%, как, например, отсутствует по меньшей мере 30%, как, например, отсутствует по меньшей мере 40%, как, например, отсутствует по меньшей мере 50%, как, например, отсутствует по меньшей мере 60%, как, например, отсутствует по меньшей мере 70%, как, например, отсутствует по меньшей мере 80%, как, например, отсутствует по меньшей мере 90% ISOM.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей предусматривает делецию в гене, кодирующем DaISOM, так что указанный ген кодирует мутантный DaISOM, в котором отсутствует по меньшей мере 10% DaISOM, как, например, отсутствует по меньшей мере 20%, как, например, отсутствует по меньшей мере 30%, как, например, отсутствует по меньшей мере 40%, как, например, отсутствует по меньшей мере 50%, как, например, отсутствует по меньшей мере 60%, как, например, отсутствует по меньшей мере 70%, как, например, отсутствует по меньшей мере 80%, как, например, отсутствует по меньшей мере 90% DaISOM SEQ ID NO:12 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей предусматривает делецию в гене, кодирующем DbISOM(2) и/или DbISOM(1), так что указанный ген кодирует мутантный DbISOM(2) и/или DbISOM(1), в котором отсутствует по меньшей мере 10% DbISOM(2) и/или DbISOM(1), как, например, отсутствует по меньшей мере 20%, как, например, отсутствует по меньшей мере 30%, как, например, отсутствует по меньшей мере 40%, как, например, отсутствует по меньшей мере 50%, как, например, отсутствует по меньшей мере 60%, как, например, отсутствует по меньшей мере 70%, как, например, отсутствует по меньшей мере 80%, как, например, отсутствует по меньшей мере 90% DbISOM(2) SEQ ID NO:18 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей, и/или DbISOM(1) SEQ ID NO:22 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию одного или нескольких мутантных генов *ISOM*, кодирующих один или несколько мутантных *ISOM*.

Согласно одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, предпочтительно, чтобы штамм дрожжей нес мутацию в гене *ISOM(2)*, приводящую к потере функции *ISOM(2)*, и, в частности, к полной потере функции *ISOM(2)*.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalous*, предпочтительно, чтобы штамм дрожжей нес мутацию в гене *ISOM*, приводящую к потере функции *ISOM*, и, в частности, к полной потере функции *ISOM*.

Штамм дрожжей, несущий одну или несколько мутаций в одном или нескольких генах *ISOM*, приводящих к потере функции одного или нескольких *ISOM*, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию сдвига рамки считывания, и/или мутацию, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона, и/или мутацию сайта сплайсинга в одном или нескольких генах *ISOM*, приводящие в результате к усечению одного или нескольких из белков *ISOM*.

Согласно одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей несет мутацию сдвига рамки считывания, и/или мутацию, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона, и/или мутацию сайта сплайсинга, приводящие в результате к образованию мутантного гена *DaISOM*, кодирующего мутантный белок DaISOM, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 50 аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 100, как, например, отсутствуют по меньшей мере 150, как, например, отсутствуют по меньшей мере 200 аминокислот SEQ ID NO:12 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей несет мутацию сдвига рамки считывания, и/или мутацию, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона, и/или мутацию сайта сплайсинга, приводящие в результате к образованию мутантного гена *DbISOM(2)*, кодирующего мутантный белок DbISOM(2), в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 50 аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 100, как, например, отсутствуют по меньшей мере 150, как, например, отсутствуют по меньшей мере 200 аминокислот SEQ ID NO:18 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию сдвига рамки считывания, и/или мутацию, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона, и/или мутацию сайта сплайсинга, приводящие в результате к образованию мутантного гена *DaISOM*, кодирующего мутантный белок DaISOM, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 наиболее близких к С-концу аминокислот, например, в котором отсутствуют по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 200 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:12. Например, штамм дрожжей может содержать мутантный ген *DaISOM*, кодирующий мутантный белок DaISOM, в котором отсутствуют по меньшей мере 237 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:12 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию сдвига рамки считывания, и/или мутацию, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона, и/или мутацию сайта сплайсинга, приводящие в результате к образованию мутантного гена *DbISOM(2)*, кодирующего мутантный белок *DbISOM(2)*, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 наиболее близких к С-концу аминокислот, например, в котором отсутствуют по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 200 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:18. Например, штамм дрожжей может содержать мутантный ген *DbISOM(2)*, кодирующий мутантный белок *DbISOM*, в котором отсутствуют по меньшей мере 237 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:18 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию сдвига рамки считывания, и/или мутацию, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона, и/или мутацию сайта сплайсинга, приводящие в результате к образованию мутантного гена *DaISOM*, кодирующего усеченный белок *DaISOM*, содержащий N-концевой фрагмент *DaISOM*, содержащий не более 500 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:12, например, не более 450 N-концевых аминокислот, как, например, не более 400 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:12, предпочтительно не более 350 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:12 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию сдвига рамки считывания, и/или мутацию, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона, и/или мутацию сайта сплайсинга, приводящие в результате к образованию мутантного гена *DbISOM(2)*, кодирующего усеченный белок *DbISOM(2)*, содержащий N-концевой фрагмент *DbISOM(2)*, содержащий не более 500 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:18, например, не более 450 N-концевых аминокислот, как, например, не более 400 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:18, предпочтительно не более 350 N-концевых аминокислот SEQ ID NO:18 или его

функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *ISOM*, кодирующего мутантные белки *ISOM*, причем мутантный *ISOM* предусматривает по меньшей мере 50 аминокислотных замен, как, например, по меньшей мере 100, как, например, по меньшей мере 150, как, например, по меньшей мере 200 аминокислотных замен по сравнению с *ISOM* у штамма дрожжей, содержащего ген *ISOM* дикого типа. Указанные аминокислотные замены могут представлять собой любые аминокислотные замены, причем аминокислота замещена другой аминокислотой.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DaISOM*, кодирующего мутантный белок *DaISOM*, причем мутантный *DaISOM* предусматривает по меньшей мере 50 аминокислотных замен, как, например, по меньшей мере 100, как, например, по меньшей мере 150, как, например, по меньшей мере 200 аминокислотных замен по сравнению с *DaISOM* у штамма дрожжей, содержащего ген *DaISOM* дикого типа. Указанные аминокислотные замены могут представлять собой любые аминокислотные замены, причем аминокислота замещена другой аминокислотой.

Согласно еще одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DabISOM(2)*, кодирующего мутантный белок *DbISOM(2)*, причем мутантный *DbISOM(2)* предусматривает по меньшей мере 50 аминокислотных замен, как, например, по меньшей мере 100, как, например, по меньшей мере 150, как, например, по меньшей мере 200 аминокислотных замен по сравнению с *DbISOM(2)* у штамма дрожжей, содержащего ген *DbISOM(2)* дикого типа. Указанные аминокислотные замены могут представлять собой любые аминокислотные замены, причем аминокислота замещена другой аминокислотой.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением несет мутацию в одном или нескольких из генов *ISOM*, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к одной или нескольким аминокислотным заменам в одном или нескольких *ISOM*;

- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в одном или нескольких генах *ISOM*;
- мутация в сайте сплайсинга в одном или нескольких генах *ISOM*;
- мутация в промоторной области одного или нескольких генов *ISOM*; и/или
- мутация в интроне одного или нескольких генов *ISOM*.

Согласно одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением несет мутацию в гене *DaISOM*, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к одной или нескольким аминокислотным заменам *DaISOM*;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DaISOM*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *DaISOM*;
- мутация в промоторной области гена *DaISOM*; и/или
- мутация в интроне гена *DaISOM*.

Согласно одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением несет мутацию в гене *DbISOM(2)*, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к одной или нескольким аминокислотным заменам *DbISOM(2)*;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DbISOM(2)*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *DbISOM(2)*;
- мутация в промоторной области гена *DaISOM(2)*; и/или
- мутация в интроне гена *DbISOM(2)*.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, мутация представляет собой мутацию, приводящую в результате к мутации сдвига рамки считывания.

Мутация в сайте сплайсинга, промоторной области и/или интроне одного или нескольких генов *ISOM* может приводить к aberrантному сплайсингу мРНК *ISOM*, и/или aberrантной транскрипции мРНК *ISOM*, и/или aberrантной трансляции белка *ISOM*. Такой штамм дрожжей может, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК *ISOM*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже, и/или сниженными уровнями белка *ISOM*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже.

Потерю функции *ISOM* можно определять с помощью любого способа, известного специалисту в данной области. Один из способов определения функции *ISOM* может заключаться в определении уровня экспрессии *ISOM* либо на уровне мРНК, либо на уровне белка.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции *ISOM*, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК *ISOM* или мРНК *ISOM* дикого типа по сравнению с уровнем мРНК *ISOM* у штамма дрожжей, содержащего ген *ISOM* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции *ISOM*, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК *ISOM* или мРНК *ISOM* дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *ISOM* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный *ISOM* относится к мРНК, кодируемой мутантным геном *ISOM*, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанная мРНК *DaISOM* представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:12 или его функционального гомолог, а ген *DaISOM* дикого типа представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:12. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции *DaISOM* может не содержать мутантной мРНК *DaISOM* или мРНК *DaISOM* дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанная мРНК *DbISOM(2)* или мРНК *DbISOM(1)* представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:18 или его функциональный гомолог, или кодирующую полипептид SEQ ID NO:22 или его функциональный гомолог, а ген *DbISOM(2)* или ген *DbISOM(1)* дикого типа представляет собой ген, кодирующий белок

SEQ ID NO:18 или его функциональный гомолог, или белок SEQ ID NO:22 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:22. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DbISOM(2) или DbISOM(1) может не содержать мутантной мРНК DbISOM(2) или мРНК DbISOM(1) или мРНК DbISOM(2) или мРНК DbISOM(1) дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции ISOM, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантного белка ISOM или белка ISOM дикого типа по сравнению с уровнем белка ISOM у штамма дрожжей, содержащего ген *ISOM* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции ISOM, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка ISOM или белка ISOM дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *ISOM* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок ISOM представляет собой полипептид, кодируемый мутантным геном *ISOM*, несущим мутацию в кодирующей области. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный белок DaISOM(2) представляет собой полипептид SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог, а ген *DaISOM(2)* дикого типа представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:12. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DaISOM может не содержать мутантный белок DaISOM или белок DaISOM дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга. Согласно другому варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанная мРНК DbISOM(2) или мРНК DbISOM(1) представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:18 или его функциональный гомолог, или кодирующую полипептид SEQ ID NO:22 или его функциональный гомолог, а ген *DbISOM(2)* или ген *DbISOM(1)* дикого типа представляет собой ген, кодирующий белок SEQ ID NO:18 или его функциональный гомолог, или белок SEQ ID NO:22 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере

98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:18 или SEQ ID NO:22. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DbISOM(2) или DbISOM(1) может не содержать мутантных мРНК DbISOM(2) или белка DbISOM(1) или мРНК DbISOM(2) или белка DbISOM(1) дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Штамм дрожжей может, например, иметь генотип IV в вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей, помимо того, что он не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол и/или не способен превращать более 25% феруловой кислоты в 4-этилгваякол, не способен использовать более 2% мальтозы.

Генотип V – MTRA2

Штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением может иметь генотип V, причем в случае генотипа V присутствуют одна или несколько мутаций или делеция гена, кодирующего MTRA2.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением имеет генотип V, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также обладает характеристикой III.

Согласно прогнозу предполагаемая функция MTRA2 заключается в том, что он является высокоаффинным транспортером мальтозы.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения у штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует ген, кодирующий MTRA1. Таким образом, штамм дрожжей может предусматривать делецию гена, кодирующего MTRA1.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalous*, у указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует весь ген *DaMTRA2*, кодирующий DaMTRA2 SEQ ID NO:14 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей. Другими словами, штамм дрожжей вида *Dekkera anomalous* может предусматривать делецию гена, кодирующего DaMTRA2 SEQ ID NO:14 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, у указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует весь ген *DbMTRA2*, кодирующий DbMTRA2 SEQ ID NO:20 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98%

идентичностью последовательностей. Другими словами, штамм дрожжей вида *Dekkera bruxellensis* может предусматривать делецию гена, кодирующего DbMTRA2 SEQ ID NO:20 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением предусматривает одну или несколько делеций в гене, кодирующем MTRA2, так что указанный ген кодирует мутантный MTRA2, в котором отсутствует по меньшей мере некоторая часть MTRA2, как, например, отсутствует по меньшей мере 10% MTRA2, как, например, отсутствует по меньшей мере 20%, как, например, отсутствует по меньшей мере 30%, как, например, отсутствует по меньшей мере 40%, как, например, отсутствует по меньшей мере 50%, как, например, отсутствует по меньшей мере 60%, как, например, отсутствует по меньшей мере 70%, как, например, отсутствует по меньшей мере 80%, как, например, отсутствует по меньшей мере 90% MTRA2.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalous*, у указанного штамма дрожжей отсутствует часть гена DaMTRA2, кодирующего, в результате этого, лишь часть DaMTRA2, как, например, не более 90% DaMTRA2, как, например, не более 80%, как, например, не более 70%, как, например, не более 60%, как, например, не более 50%, как, например, не более 40%, как, например, не более 30%, как, например, не более 30%, как, например, не более 20% DaMTRA2 SEQ ID NO:14 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно еще одному варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, у указанного штамма дрожжей отсутствует часть гена DbMTRA2, кодирующего, в результате этого, лишь часть DbMTRA2, как, например, не более 90% DbMTRA2, как, например, не более 80%, как, например, не более 70%, как, например, не более 60%, как, например, не более 50%, как, например, не более 40%, как, например, не более 30%, как, например, не более 30%, как, например, не более 20% DbMTRA2 SEQ ID NO:20 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена MTRA2, кодирующего мутантный MTRA2. Например, штамм дрожжей может нести мутацию в гене MTRA2, приводящую к потере функции MTRA2, и, в частности, к полной потере функции MTRA2.

Штамм дрожжей, несущий одну или несколько мутаций в гене *MTRA2*, приводящих к потере функции *MTRA2*, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *MTRA2*, кодирующего мутантный белок *MTRA2*, предусматривающий одну или несколько аминокислотных замен, как, например, 5 или больше, как, например, 10 или больше, как, например, 15 или больше, как, например, 20 или больше аминокислотных замен. Указанные аминокислотные замены могут представлять собой любые аминокислотные замены, причем аминокислота замещена другой аминокислотой.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DaMTRA2*, кодирующего мутантный белок *DaMTRA2*, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 5 аминокислоты, как, например, отсутствуют по меньшей мере 10, как, например, отсутствуют по меньшей мере 15, как, например, отсутствуют по меньшей мере 20 аминокислот SEQ ID NO:14 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA2*, кодирующего мутантный белок *DbMTRA2*, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 5 аминокислоты, как, например, отсутствуют по меньшей мере 10, как, например, отсутствуют по меньшей мере 15, как, например, отсутствуют по меньшей мере 20 аминокислот SEQ ID NO:20 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *MTRA2*, кодирующего мутантный белок *MTRA2*, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к N-концу

аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к N-концу аминокислот.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DaMTRA2*, кодирующего мутантный белок DaMTRA2, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к N-концу аминокислот SEQ ID NO:14 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA2*, кодирующего мутантный белок DbMTRA2, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к N-концу аминокислот SEQ ID NO:20 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *MTRA2*, кодирующего мутантный белок MTRA2, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к C-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к C-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к C-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к C-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к C-концу аминокислот.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DaMTRA2*, кодирующего мутантный белок DaMTRA2, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к C-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее

близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к С-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:14 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA2*, кодирующего мутантный белок DbMTRA2, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к С-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к С-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:20 или его функционального гомолога, характеризующегося с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к мутации сдвига рамки считывания гена *MTRA2*.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *MTRA2*.

Согласно другому варианту осуществления мутация представляет собой мутацию в сайте сплайсинга гена *MTRA2*. Указанная мутация может приводить к aberrantному сплайсингу мРНК *MTRA2*.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей несет мутацию в промоторной области гена *MTRA2* или в интроне гена *MTRA2*, приводящую к aberrantной транскрипции мРНК *MTRA2* и/или aberrantной трансляции белка *MTRA2*. Такой штамм дрожжей может, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК *MTRA2*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже, и/или сниженными уровнями белка *MTRA2*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже.

Потерю функции *MTRA2* можно определять с помощью любого способа, известного специалисту в данной области. Один из способов определения функции *MTRA2* может заключаться в определении уровня экспрессии *MTRA2* либо на уровне мРНК, либо на уровне белка.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции MTRA2, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК или мРНК дикого типа MTRA2 по сравнению с уровнем мРНК MTRA2 у штамма дрожжей, содержащего ген *MTRA2* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции MTRA2, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК MTRA2 или мРНК MTRA2 дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA1* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный MTRA2 представляет собой мРНК, кодируемую мутированным геном MTRA2, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанная мРНК DaMTRA2 представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:14 или его функциональный гомолог, а ген *DaMTRA2* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:14 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:14. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DaMTRA2 может не содержать мутантной мРНК DaMTRA2 или мРНК DaMTRA2 дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR. Согласно другому варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанная мРНК DbMTRA2 представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:20 или его функциональный гомолог, а ген *DaMTRA2* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:20 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:20. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DbMTRA2 может не содержать мутантной мРНК DbMTRA2 или мРНК DbMTRA2 дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции MTRA2, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантного белка MTRA2 или белка MTRA2 дикого типа по сравнению с уровнем белка MTRA2 у штамма дрожжей, содержащего ген *MTRA2* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции MTRA2, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка MTRA2 или белка MTRA2 дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA2* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок MTRA2 представляет собой полипептид, кодируемый мутированным геном *MTRA2*, несущим мутацию в кодирующей области. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, указанный белок DaMTRA2 представляет собой полипептид SEQ ID NO:14 или его функциональный гомолог, а ген *DaMTRA2* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:14 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:14. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DaMTRA2 может не содержать мутантный белок DaMTRA2 или белок DaMTRA2 дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга. Согласно другому варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, указанный белок DbMTRA2 представляет собой полипептид SEQ ID NO:20 или его функциональный гомолог, а ген *DbMTRA2* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:20 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:20. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DbMTRA2 может не содержать мутантный белок DbMTRA2 или белок DbMTRA2 дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга.

Штамм дрожжей может, например, иметь генотип V в вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей, помимо того, что он не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол и/или не способен превращать более 25% феруловой кислоты в 4-этилгваякол, не способен использовать более 2% мальтозы.

Генотип VI – MTRA3

Штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением может иметь генотип VI, причем в случае генотипа VI присутствуют одна или несколько мутаций или делеция гена, кодирующего MTRA3.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением имеет генотип VI, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также обладает характеристикой III.

Согласно прогнозу предполагаемая функция MTRA3 заключается в том, что он является транспортером мальтозы.

Согласно одному варианту осуществления у штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует полный ген *DbMTRA3*, кодирующий DbMTRA3 SEQ ID NO:26 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления у штамма дрожжей отсутствует часть гена *DbMTRA3*, кодирующего, в результате этого, лишь часть DbMTRA3, как, например, не более 90% DbMTRA3, как, например, не более 80%, как, например, не более 70%, как, например, не более 60%, как, например, не более 50%, как, например, не более 40%, как, например, не более 30%, как, например, не более 30%, как, например, не более 20% DbMTRA3 SEQ ID NO:26.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *MTRA3*, кодирующего мутантный MTRA3. Предпочтительно, чтобы штамм дрожжей нес мутацию в гене *MTRA3*, приводящую к потере функции MTRA3, и, в частности, к полной потере функции MTRA3.

Штамм дрожжей, несущий мутацию в гене *MTRA3*, приводящую к потере функции MTRA3, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *MTRA3*, кодирующего мутантный белок MTRA3, предусматривающий одну или несколько аминокислотных замен, как, например, 5 или больше, как, например, 10 или больше, как, например, 15 или больше, как, например, 20 или больше аминокислотных замен. Указанные аминокислотные замены могут представлять собой любые аминокислотные замены, причем аминокислота замещена другой аминокислотой.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA3*, кодирующего мутантный белок DbMTRA3, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 5 аминокислот, как, например, отсутствуют по

меньшей мере 10, как, например, отсутствуют по меньшей мере 15, как, например, отсутствуют по меньшей мере 20 аминокислот SEQ ID NO:26.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA3*, кодирующего мутантный белок DbMTRA3, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к N-концу аминокислот SEQ ID NO:26.

Согласно другому варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA3*, кодирующего мутантный белок DbMTRA3, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к C-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к C-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к C-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к C-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к C-концу аминокислот SEQ ID NO:26.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к мутации сдвига рамки считывания гена *MTRA3*.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *MTRA3*.

Согласно другому варианту осуществления мутация представляет собой мутацию в сайте сплайсинга гена *MTRA3*. Указанная мутация может приводить к aberrantному сплайсингу мРНК *MTRA3*.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей несет мутацию в промоторной области гена *MTRA3* или в интроне гена *MTRA3*, приводящую к aberrантной транскрипции мРНК *MTRA3* и/или aberrантной трансляции белка *MTRA3*. Такой штамм дрожжей может, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК *MTRA3*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже, и/или сниженными уровнями белка *MTRA3*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже.

Потерю функции *MTRA3* можно определять с помощью любого способа, известного специалисту в данной области. Один из способов определения функции *MTRA3* может

заключаться в определении уровня экспрессии MTRA3 либо на уровне мРНК, либо на уровне белка.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции MTRA3, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК MTRA3 или мРНК MTRA3 дикого типа по сравнению с уровнем мРНК MTRA3 у штамма дрожжей, содержащего ген *MTRA3* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции MTRA3, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК MTRA3 или мРНК MTRA3 дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA3* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный MTRA3 представляет собой мРНК, кодируемую мутированным геном *MTRA3*, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, мРНК DbMTRA3 представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:26 или его функциональный гомолог, а ген *DbMTRA3* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:26 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:26. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DbMTRA3 может не содержать мутантной мРНК DbMTRA3 или мРНК DbMTRA3 дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции MTRA3, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантного белка MTRA3 или белка MTRA3 дикого типа по сравнению с уровнем белка MTRA3 у штамма дрожжей, содержащего ген *MTRA3* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции MTRA3, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка MTRA3 или белка MTRA3 дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA3* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок MTRA3 представляет собой полипептид, кодируемый мутированным геном *MTRA3*, несущим мутацию в кодирующей области. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, белок DbMTRA3 представляет собой полипептид SEQ ID NO:26 или его функциональный

гомолог, а ген *DbMTRA3* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:26 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:26. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции *DbMTRA3* может не содержать мутантный белок *DbMTRA3* или белок *DbMTRA3* дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга.

Штамм дрожжей может, например, иметь генотип VI в вариантах осуществления настоящего изобретения, где штамм дрожжей не способен использовать более 2% мальтозы.

Генотип VII – MTRA4

Штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением может иметь генотип VII, причем в случае генотипа VII присутствуют одна или несколько мутаций или делеция гена, кодирующего MTRA4.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением имеет генотип VII, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также обладает характеристикой III.

Согласно прогнозу предполагаемая функция MTRA4 заключается в том, что он является транспортером мальтозы.

Согласно одному варианту осуществления у штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует полный ген *DbMTRA4*, кодирующий *DbMTRA4* SEQ ID NO:28 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления у штамма дрожжей отсутствует часть гена *DbMTRA4*, кодирующего, в результате этого, лишь часть *DbMTRA4*, как, например, не более 90% *DbMTRA4*, как, например, не более 80%, как, например, не более 70%, как, например, не более 60%, как, например, не более 50%, как, например, не более 40%, как, например, не более 30%, как, например, не более 30%, как, например, не более 20% *DbMTRA4* SEQ ID NO:28.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *MTRA4*, кодирующего мутантный MTRA4. Предпочтительно, чтобы штамм дрожжей нес мутацию в гене *MTRA4*, приводящую к потере функции MTRA4, и, в частности, к полной потере функции MTRA4.

Штамм дрожжей, несущий мутацию в гене *MTRA4*, приводящую к потере функции *MTRA4*, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *MTRA4*, кодирующего мутантный белок *MTRA4*, предусматривающий одну или несколько аминокислотных замен, как, например, 5 или больше, как, например, 10 или больше, как, например, 15 или больше, как, например, 20 или больше аминокислотных замен. Указанные аминокислотные замены могут представлять собой любые аминокислотные замены, причем аминокислота замещена другой аминокислотой.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA4*, кодирующего мутантный белок *DbMTRA4*, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 5 аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 10, как, например, отсутствуют по меньшей мере 15, как, например, отсутствуют по меньшей мере 20 аминокислот SEQ ID NO:28.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA4*, кодирующего мутантный белок *DbMTRA4*, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к N-концу аминокислот SEQ ID NO:28.

Согласно другому варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA4*, кодирующего мутантный белок *DbMTRA4*, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к C-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к C-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к C-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к C-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к C-концу аминокислот SEQ ID NO:28.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к мутации сдвига рамки считывания гена *MTRA4*.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *MTRA4*.

Согласно другому варианту осуществления мутация представляет собой мутацию в сайте сплайсинга гена *MTRA4*. Указанная мутация может приводить к aberrантному сплайсингу мРНК *MTRA4*.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей несет мутацию в промоторной области гена *MTRA4* или в интроне гена *MTRA4*, приводящую к aberrантной транскрипции мРНК *MTRA4* и/или aberrантной трансляции белка *MTRA4*. Такой штамм дрожжей может, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК *MTRA4*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже, и/или сниженными уровнями белка *MTRA4*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже.

Потерю функции *MTRA4* можно определять с помощью любого способа, известного специалисту в данной области. Один из способов определения функции *MTRA4* может заключаться в определении уровня экспрессии *MTRA4* либо на уровне мРНК, либо на уровне белка.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции *MTRA4*, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК *MTRA4* или мРНК *MTRA4* дикого типа по сравнению с уровнем мРНК *MTRA4* у штамма дрожжей, содержащего ген *MTRA4* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции *MTRA4*, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК *MTRA4* или мРНК *MTRA4* дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA4* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный *MTRA4* представляет собой мРНК, кодируемую мутированным геном *MTRA4*, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, мРНК *DbMTRA4* представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:28 или его функциональный гомолог, а ген *DbMTRA4* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:28 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:28. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции *DbMTRA4* может не содержать

мутантной мРНК DbMTRA4 или мРНК DbMTRA4 дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции MTRA4, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантного белка MTRA4 или белка MTRA4 дикого типа по сравнению с уровнем белка MTRA4 у штамма дрожжей, содержащего ген *MTRA4* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции MTRA4, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка MTRA4 или белка MTRA4 дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA4* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок MTRA4 представляет собой полипептид, кодируемый мутированным геном *MTRA4*, несущим мутацию в кодирующей области. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, белок DbMTRA4 представляет собой полипептид SEQ ID NO:28 или его функциональный гомолог, а ген *DbMTRA4* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:28 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:28. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DbMTRA4 может не содержать мутантный белок DbMTRA4 или белок DbMTRA4 дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга.

Штамм дрожжей может, например, иметь генотип VII в вариантах осуществления настоящего изобретения, где штамм дрожжей не способен использовать более 2% мальтозы.

Генотип VIII – MTRA5

Штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением может иметь генотип VIII, причем в случае генотипа VIII присутствуют одна или несколько мутаций или делеция гена, кодирующего MTRA5.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением имеет генотип VIII, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также обладает характеристикой III.

Согласно прогнозу предполагаемая функция MTRA5 заключается в том, что он является высокоаффинным транспортером мальтозы.

Согласно одному варианту осуществления у штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует полный ген *DbMTRA5*, кодирующий DbMTRA5 SEQ ID NO:30 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления у штамма дрожжей отсутствует часть гена *DbMTRA5*, кодирующего, в результате этого, лишь часть DbMTRA5, как, например, не более 90% DbMTRA5, как, например, не более 80%, как, например, не более 70%, как, например, не более 60%, как, например, не более 50%, как, например, не более 40%, как, например, не более 30%, как, например, не более 30%, как, например, не более 20% DbMTRA5 SEQ ID NO:30.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *MTRA5*, кодирующего мутантный MTRA5. Предпочтительно, чтобы штамм дрожжей нес мутацию в гене *MTRA5*, приводящую к потере функции MTRA5, и, в частности, к полной потере функции MTRA5.

Штамм дрожжей, несущий мутацию в гене *MTRA5*, приводящую к потере функции MTRA5, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *MTRA5*, кодирующего мутантный белок MTRA5, предусматривающий одну или несколько аминокислотных замен, как, например, 5 или больше, как, например, 10 или больше, как, например, 15 или больше, как, например, 20 или больше аминокислотных замен. Указанные аминокислотные замены могут представлять собой любые аминокислотные замены, причем аминокислота замещена другой аминокислотой.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA5*, кодирующего мутантный белок DbMTRA5, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 5 аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 10, как, например, отсутствуют по меньшей мере 15, как, например, отсутствуют по меньшей мере 20 аминокислот SEQ ID NO:30.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA5*, кодирующего мутантный белок DbMTRA5, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее

близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к N-концу аминокислот SEQ ID NO:30.

Согласно другому варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA5*, кодирующего мутантный белок DbMTRA5, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к C-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к C-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к C-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к C-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к C-концу аминокислот SEQ ID NO:30.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к мутации сдвига рамки считывания гена *MTRA5*.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *MTRA5*.

Согласно другому варианту осуществления мутация представляет собой мутацию в сайте сплайсинга гена *MTRA5*. Указанная мутация может приводить к aberrantному сплайсингу мРНК *MTRA5*.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей несет мутацию в промоторной области гена *MTRA5* или в интроне гена *MTRA5*, приводящую к aberrantной транскрипции мРНК *MTRA5* и/или aberrantной трансляции белка *MTRA5*. Такой штамм дрожжей может, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК *MTRA5*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже, и/или сниженными уровнями белка *MTRA5*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже.

Потерю функции *MTRA5* можно определять с помощью любого способа, известного специалисту в данной области. Один из способов определения функции *MTRA5* может заключаться в определении уровня экспрессии *MTRA5* либо на уровне мРНК, либо на уровне белка.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции *MTRA5*, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК *MTRA5* или мРНК *MTRA5* дикого типа по сравнению с уровнем мРНК *MTRA5* у штамма

дрожжей, содержащего ген *MTRA5* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции *MTRA5*, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК *MTRA5* или мРНК *MTRA5* дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA5* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный *MTRA5* представляет собой мРНК, кодируемую мутированным геном *MTRA5*, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, мРНК Db*MTRA5* представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:30 или его функциональный гомолог, а ген *DbMTRA5* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:30 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:30. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции *DbMTRA5* может не содержать мутантной мРНК *DbMTRA5* или мРНК *DbMTRA5* дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции *MTRA5*, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантного белка *MTRA5* или белка *MTRA5* дикого типа по сравнению с уровнем белка *MTRA5* у штамма дрожжей, содержащего ген *MTRA5* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции *MTRA5*, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка *MTRA5* или белка *MTRA5* дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA5* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок *MTRA5* представляет собой полипептид, кодируемый мутированным геном *MTRA5*, несущим мутацию в кодирующей области. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, белок *DbMTRA5* представляет собой полипептид SEQ ID NO:30 или его функциональный гомолог, а ген *DbMTRA5* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:30 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:30. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции *DbMTRA5* может не содержать мутантный белок

DbMTRA5 или белок DbMTRA5 дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга.

Штамм дрожжей может, например, иметь генотип VIII в вариантах осуществления настоящего изобретения, где штамм дрожжей не способен использовать более 2% мальтозы.

Генотип IX – MTRA6

Штамм дрожжей в соответствии с настоящим изобретением может иметь генотип VII, причем в случае генотипа VII присутствуют одна или несколько мутаций или делеция гена, кодирующего MTRA6.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением имеет генотип IX, указанный штамм дрожжей *Dekkera* обычно также обладает характеристикой III.

Согласно прогнозу предполагаемая функция MTRA6 заключается в том, что он является высокоаффинным транспортером мальтозы.

Согласно одному варианту осуществления у штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением отсутствует полный ген *DbMTRA6*, кодирующий DbMTRA6 SEQ ID NO:32 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

Согласно другому варианту осуществления у штамма дрожжей отсутствует часть гена *DbMTRA6*, кодирующего, в результате этого, лишь часть DbMTRA6, как, например, не более 90% DbMTRA6, как, например, не более 80%, как, например, не более 70%, как, например, не более 60%, как, например, не более 50%, как, например, не более 40%, как, например, не более 30%, как, например, не более 30%, как, например, не более 20% DbMTRA6 SEQ ID NO:32.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *MTRA6*, кодирующего мутантный MTRA6. Предпочтительно, чтобы штамм дрожжей нес мутацию в гене *MTRA6*, приводящую к потере функции MTRA6, и, в частности, к полной потере функции MTRA6.

Штамм дрожжей, несущий мутацию в гене *MTRA6*, приводящую к потере функции MTRA6, может нести разные типы мутаций, например, любую из описанных в этом разделе настоящего документа мутаций.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *MTRA6*, кодирующего мутантный белок MTRA6, предусматривающий одну или несколько

аминокислотных замен, как, например, 5 или больше, как, например, 10 или больше, как, например, 15 или больше, как, например, 20 или больше аминокислотных замен. Указанные аминокислотные замены могут представлять собой любые аминокислотные замены, причем аминокислота замещена другой аминокислотой.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA6*, кодирующего мутантный белок DbMTRA6, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 5 аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 10, как, например, отсутствуют по меньшей мере 15, как, например, отсутствуют по меньшей мере 20 аминокислот SEQ ID NO:32.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA6*, кодирующего мутантный белок DbMTRA6, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к N-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к N-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к N-концу аминокислот SEQ ID NO:32.

Согласно другому варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA6*, кодирующего мутантный белок DbMTRA6, в котором отсутствуют по меньшей мере 10 наиболее близких к C-концу аминокислот, например, по меньшей мере 20 наиболее близких к C-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 30 наиболее близких к C-концу аминокислот, например, по меньшей мере 60 наиболее близких к C-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к C-концу аминокислот SEQ ID NO:32.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к мутации сдвига рамки считывания гена *MTRA6*.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей по настоящему изобретению несет мутацию, приводящую в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *MTRA6*.

Согласно другому варианту осуществления мутация представляет собой мутацию в сайте сплайсинга гена *MTRA6*. Указанная мутация может приводить к aberrantному сплайсингу мРНК *MTRA6*.

Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей несет мутацию в промоторной области гена *MTRA6* или в интроне гена *MTRA6*, приводящую к aberrантной транскрипции мРНК *MTRA6* и/или aberrантной трансляции белка *MTRA6*. Такой штамм дрожжей может, в частности, характеризоваться сниженными уровнями мРНК *MTRA6*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже, и/или сниженными уровнями белка *MTRA6*, как описано в этом разделе настоящего документа ниже.

Потерю функции *MTRA6* можно определять с помощью любого способа, известного специалисту в данной области. Один из способов определения функции *MTRA6* может заключаться в определении уровня экспрессии *MTRA6* либо на уровне мРНК, либо на уровне белка.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции *MTRA6*, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантной мРНК *MTRA6* или мРНК *MTRA6* дикого типа по сравнению с уровнем мРНК *MTRA6* у штамма дрожжей, содержащего ген *MTRA6* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции *MTRA6*, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантной мРНК *MTRA6* или мРНК *MTRA6* дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA6* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный *MTRA6* представляет собой мРНК, кодируемую мутированным геном *MTRA6*, несущим мутацию в области, кодирующей мРНК. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, мРНК *DbMTRA6* представляет собой РНК, кодирующую полипептид SEQ ID NO:32 или его функциональный гомолог, а ген *DbMTRA6* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:32 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:32. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции *DbMTRA6* может не содержать мутантной мРНК *DbMTRA6* или мРНК *DbMTRA6* дикого типа в выявляемых количествах при определении с помощью стандартной количественной RT-PCR.

Согласно одному варианту осуществления, считается, что штамм дрожжей характеризуется потерей функции *MTRA6*, если штамм дрожжей содержит менее 50%, предпочтительно менее 25% и даже более предпочтительно менее 10% мутантного белка *MTRA6* или белка *MTRA6* дикого типа по сравнению с уровнем белка *MTRA6* у штамма дрожжей, содержащего ген *MTRA6* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

Может считаться, что штамм дрожжей характеризуется полной потерей функции MTRA6, если штамм дрожжей содержит менее 5%, предпочтительно менее 1% мутантного белка MTRA6 или белка MTRA6 дикого типа по сравнению со штаммом дрожжей, содержащим ген *MTRA6* дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. Указанный мутантный белок MTRA6 представляет собой полипептид, кодируемый мутированным геном *MTRA6*, несущим мутацию в кодирующей области. Согласно одному варианту осуществления, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, белок DbMTRA6 представляет собой полипептид SEQ ID NO:32 или его функциональный гомолог, а ген *DbMTRA6* дикого типа представляет собой ген, кодирующий полипептид SEQ ID NO:32 или его функциональный гомолог. Указанный функциональный гомолог предпочтительно характеризуется по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO:32. Согласно одному варианту осуществления штамм дрожжей с полной потерей функции DbMTRA6 может не содержать мутантный белок DbMTRA6 или белок DbMTRA6 дикого типа в выявляемых количествах при выявлении с помощью стандартного вестерн-блоттинга.

Штамм дрожжей может, например, иметь генотип IX в вариантах осуществления настоящего изобретения, где штамм дрожжей не способен использовать более 2% мальтозы.

Напиток на основе солода и/или злаков и способы его получения

Настоящее изобретение относится к описанному в настоящем документе выше штамму дрожжей *Dekkera*, а также способам получения напитков на основе солода и/или злаков с применением указанного штамма дрожжей.

Одним из аспектов настоящего изобретения является обеспечение способов получения напитка на основе солода и/или злаков, причем указанный способ предусматривает стадии:

- i) обеспечения водного экстракта солода и/или зерен злаков
- ii) обеспечения штамма дрожжей *Dekkera*, причем указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол при инкубации в водном растворе, содержащем п-кумаровую кислоту
- iii) сбраживания указанного водного экстракта с помощью указанных дрожжей, с получением тем самым указанного напитка на основе солода и/или злаков.

Дополнительным аспектом настоящего изобретения является обеспечение напитка на основе солода и/или злаков, содержащего менее 3% этанола, причем указанный способ предусматривает стадии:

- i) обеспечения водного экстракта солода и/или зерен злаков
- ii) обеспечения штамма дрожжей *Dekkera*, причем указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол при инкубации в водном растворе, содержащем п-кумаровую кислоту, причем указанный штамм дрожжей, кроме того, не способен использовать более 2% мальтозы
- iii) сбраживания указанного водного экстракта с помощью указанных дрожжей, с получением тем самым указанного напитка на основе солода и/или злаков.

Водный экстракт может представлять собой любой водный экстракт солода и/или зерен злаков. Таким образом, неограничивающими примерами являются сусло и получаемые при брожении напитки на основе солода и/или злаков, такие как пиво. Например, водный экстракт можно получать путем получения экстракта солода путем затирания и необязательно промывания дробины, как описано в этом разделе настоящего документа ниже.

Солод представляет собой зерна, которые были подвергнуты солодованию, такие как зерна ячменя. Под термином «солодование» подразумевается проращивания замоченных зерен в рамках процесса, происходящего в контролируемых условиях окружающей среды, с последующей стадией сушки. Указанная стадия сушки предпочтительно может представлять собой печную сушку пророщенных зерен при повышенных температурах.

Такая вышеупомянутая последовательность событий солодования важна для синтеза многочисленных ферментов, которые обуславливают модификацию зерна, процессов, которые главным образом обеспечивают деполимеризацию клеточных стенок мертвого эндосперма для мобилизации питательных веществ зерна и активации других деполимераз. В ходе последующего процесса сушки вкус и цвет образуются благодаря химическим реакциям потемнения.

Замачивание можно осуществлять с помощью любого известного специалисту в данной области стандартного способа. Один из неограничивающих примеров включает замачивание при температуре в диапазоне 10-25°C с чередованием сухих и влажных условий. Проращивание можно осуществлять с помощью любого известного специалисту в данной области стандартного способа. Один из неограничивающих примеров включает проращивание при температуре в диапазоне 10-25°C, необязательно с изменением температуры с интервалом в диапазоне 1-4 ч.

Печную сушку можно осуществлять при стандартных температурах, как, например, по меньшей мере 75°C, например, в диапазоне 80-90°C, как, например, в диапазоне 80-85°C. Таким образом, солод, например, можно получать с помощью любого из способов,

описанных Briggs et al. (1981) и Hough et al. (1982). Однако для целей настоящего изобретения можно также применять любой другой подходящий способ получения солода, как, например, способы получения специального солода, включая без ограничения способы обжаривания солода.

Солод также можно дополнительно обрабатывать, например, путем перемалывания. Предпочтительно перемалывание осуществляют в сухом состоянии, т. е. солод перемалывают в сухом виде.

Солод, например молотый солод, можно затирать с получением водного экстракта указанного солода. Исходной жидкостью для получения напитка может быть водный экстракт солода, например, водный экстракт солода, полученный путем затирания.

Таким образом, способ получения напитка на основе солода и/или злаков в соответствии с настоящим изобретением может предусматривать стадию получения водного экстракта, такого как сусло, путем затирания солода и необязательно дополнительных добавок. Указанная стадия затирания может также необязательно предусматривать промывание дробины, и, соответственно, указанная стадия затирания может представлять собой стадию затирания, включающую стадию промывания дробины, или стадию затирания, не включающую стадию промывания дробины.

В целом получение водного экстракта начинается с перемалывания солода и/или зерен. Если добавляются дополнительные добавки, их также можно молоть, в зависимости от их природы. Если добавка представляет собой злак, его можно, например, молоть, тогда как сиропы, сахара и т. д. обычно не мелют. Перемалывание будет способствовать доступу воды к частицам зерна в фазе затирания. В ходе затирания может продолжаться ферментативная деполимеризация субстратов, начавшаяся в ходе солодования.

В целом водный экстракт получают путем объединения и выдерживания молотого солода и воды, т. е. в процессе затирания. В ходе затирания солод/жидкая композиция могут быть дополнены дополнительными обогащенными углеводами композициями добавок, например, добавками в виде молотого ячменя, маиса или риса. Несоложенные злаковые добавки обычно содержат мало активных ферментов или вовсе их не содержат, поэтому важно добавлять солод или экзогенные ферменты для обеспечения ферментов, необходимых для деполимеризации полисахаридов и т. д.

В ходе затирания молотый солод и/или молотые зерна – и необязательно дополнительные добавки выдерживают с жидкой фракцией, такой как вода. Температуру выдерживания обычно либо поддерживают постоянной (изотермическое затирание), либо постепенно увеличивают, например последовательно увеличивают. В любом случае растворимые вещества в солоде/зерне/добавках высвобождаются в указанную жидкую

фракцию. Последующая фильтрация обеспечивает разделение водного экстракта и остаточных твердых частиц, причем последние также называют «дробиной». Полученный таким образом водный экстракт также может называться «первым суслом». В ходе процесса, также называемого промыванием дробины, в дробину можно добавлять дополнительную жидкость, такую как вода. После промывания дробины и фильтрации может быть получено «второе сусло». Дополнительные фракции сусла можно получать путем повторения процедуры. Неограничивающие примеры подходящих процедур получения сусла описаны Briggs et al. (выше) и Hough et al. (выше).

Как упоминалось выше, водный экстракт можно также получать путем затирания несоложенных зерен. В несоложенных зернах не содержатся или содержится лишь ограниченное количество ферментов, благоприятных для получения сусла, таких как ферменты, способные разрушать клеточные стенки, или ферменты, способные деполимеризовать крахмал с образованием сахаров. Таким образом, согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, в которых для затирания применяют несоложенные зерна, такие как зерна ячменя, предпочтительно добавлять к затору один или несколько подходящих дополнительных ферментов для пивоварения. Подходящими ферментами могут быть липазы, разрушающие крахмал ферменты (например, амилазы), глюканызы [предпочтительно (1-4)- и/или (1-3, 1-4)-β-глюканаза], и/или ксиланазы (такие как арабиноксиланаза), и/или протеазы, или смеси ферментов, содержащие один или несколько из вышеупомянутых ферментов, например, Cereflo, Ultraflo или Ondea Pro (Novozymes).

Водный экстракт также можно получать с применением смеси соложенных и несоложенных зерен, причем в таком случае в ходе получения можно добавлять один или несколько подходящих ферментов. Более конкретно, зерна можно применять вместе с солодом в любой комбинации для затирания – с дополнительными ферментами для пивоварения или без них, – например, без ограничения, в пропорциях зерно:солод = примерно 100:0, или примерно 75:25, или примерно 50:50, или примерно 25:75.

Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения, предпочтительно, чтобы до или в ходе затирания дополнительные ферменты, в частности, дополнительная протеаза, и/или дополнительная целлюлаза, и/или дополнительная α-амилаза, и/или дополнительная β-амилаза, и/или дополнительная мальтогенная α-амилаза не добавлялись.

Полученный после затирания водный экстракт также может называться «сладким суслом». В традиционных способах сладкое сусло кипятят с хмелем или без него, после чего он может называться прокипяченным суслом.

Термин «примерно» в контексте настоящего документа означает $\pm 10\%$, предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 2\%$.

Водный экстракт можно нагревать или кипятить до того, как его подвергнут сбраживанию с использованием дрожжей по настоящему изобретению. Согласно одному аспекту настоящего изобретения второе и дополнительное сусло можно объединять, а затем подвергать нагреванию или кипячению. Водный экстракт можно нагревать или кипятить в течение любого подходящего промежутка времени, например, в диапазоне от 60 мин до 120 мин.

Конечные показатели получаемых при брожении напитков на основе солода и/или злаков сильно зависят от количества и типа ароматических предшественников, таких как различные фенольные соединения, такие как п-кумаровая кислота и феруловая кислота, а также от характеристик применяемого в ходе сбраживания штамма дрожжей. Конечные показатели получаемых при брожении напитков на основе солода и/или злаков также сильно зависят от сбраживаемых сахаров, присутствующих в водном экстракте солода и/или зерен злаков.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения, применяемый в способе по настоящему изобретению водный экстракт может содержать п-кумаровую кислоту, как, например, п-кумаровую кислоту в количестве, находящемся в диапазоне 0,1-100 мг/л, как, например, 0,2 мг/л-50 мг/л, как, например, 0,5-20 мг/л, как, например, 1-5 мг/л п-кумаровой кислоты.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения водный экстракт содержит феруловую кислоту, как, например, феруловую кислоту в количестве, находящемся в диапазоне 0,1-100 мг/л, как, например, от 0,2 мг/л до 50 мг/л, как, например, 0,5-20 мг/л, как, например, 1-5 мг/л феруловой кислоты.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения, применяемый в способе по настоящему изобретению водный экстракт может характеризоваться содержанием сахара в диапазоне 7-11°Plato, как, например, в диапазоне 8-10°Plato, примерно 9°Plato.

Применяемый в настоящем изобретении водный экстракт может содержать более 40 г/кг мальтозы. Согласно одному варианту осуществления водный экстракт содержит 40-100 г/кг мальтозы.

Применяемый в настоящем изобретении водный экстракт также может содержать 8-20 г/кг мальтотриозы, как, например, 10-18 г/кг мальтотриозы.

Применяемый в настоящем изобретении водный экстракт также может содержать 1-5 г/кг мальтотетраозы, как, например, 2-4 г/кг мальтотетраозы.

Применяемый в способе по настоящему изобретению водный экстракт может содержать не более 25 г/кг глюкозы, как, например, не более 20 г/кг, как, например, не более 15 г/кг, как, например, не более 10 г/кг и, например, не более 5 г/л глюкозы.

Согласно одному варианту осуществления водный раствор содержит глюкозу в количестве, находящемся в диапазоне 8-50 г/кг, предпочтительно глюкозу в количестве, находящемся в диапазоне 1-30 г/кг, как, например, глюкозу в количестве, находящемся в диапазоне 1-10 г/кг.

Предпочтительно, чтобы применяемый для получения слабоалкогольного и/или безалкогольного напитка водный экстракт содержал не более 10 г/л глюкозы.

Таким образом, водный экстракта получают, как описано выше. Напиток на основе солода и/или злаков можно получать путем сбраживания указанного водного экстракта с помощью указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления напитком на основе солода и/или злаков может быть пиво. Согласно некоторым вариантам осуществления получаемый при брожении напиток на основе солода и/или злаков может представлять собой слабоалкогольный напиток на основе солода и/или злаков или безалкогольный напиток на основе солода и/или злаков, такой как слабоалкогольное пиво или безалкогольное пиво.

Согласно одному варианту осуществления напитком является пиво, например, пиво может представлять собой лагер, сезонное пиво, бельгийский эль, Индийский пейл-эль, пшеничное пиво, Дункель, Портер, ламбик или пиво типа крик, с низким процентным содержанием спирта.

В целом алкогольные напитки, – такие как пиво, – могут быть изготовлены из соложенных и/или несоложенных зерен. Солод, помимо хмеля и дрожжей, придает вкус и цвет напитку, такому как пиво. Кроме того, солод является источником сбраживаемого сахара и ферментов. Неограниченные описания примеров подходящих способов солодования и пивоварения можно найти, например, в публикациях под авторством Briggs et al. (1981) и Hough et al. (1982). Многочисленные регулярно обновляемые методы анализа зерна, солода и пивных продуктов предлагают, например, без ограничения Американская ассоциация химиков по переработке зерновых продуктов (1995), Американское общество химиков пивоваренной промышленности (1992), Европейская пивоваренная конвенция (1998) и Институт пивоварения (1997). Признано, что для конкретного пивоваренного завода используется множество специфических процедур, причем наиболее значимые различия касаются предпочтений местного потребителя. В отношении настоящего изобретения можно применять любой такой способ получения пива.

Первая стадия получения пива из суслу предпочтительно включает нагревание указанного суслу, как описано в настоящем документе выше, с последующей фазой охлаждения суслу и необязательно вихревой паузой.

Способы по настоящему изобретению предусматривают стадию сбраживания водного экстракта солода и/или зерен злаков с помощью штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением. Указанное сбраживание может представлять собой сбраживание неферментированного водного экстракта или ферментированного водного экстракта. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления указанное сбраживание можно осуществлять, по существу, непосредственно после завершения затирания или после нагревания суслу. Сбраживание неферментированного водного экстракта в настоящем документе может также называться «первичным сбраживанием». Однако, согласно другим вариантам осуществления водный экстракт представляет собой ферментированный водный экстракт, который сперва подвергался стадии сбраживания с помощью другого микроорганизма. Такое сбраживание в настоящем документе может также называться «вторичным сбраживанием». В настоящем изобретении также предусматривается, что указанную стадию сбраживания водного экстракта осуществляют в присутствии множества разных микроорганизмов, причем по меньшей мере одним из них является штамм дрожжей *Dekkera* в соответствии с настоящим изобретением.

Сбраживание, например, первичное и/или вторичное сбраживание можно осуществлять в бродильных чанах, содержащих дрожжи в соответствии с настоящим изобретением, т. е. дрожжи, обладающие одной или несколькими из описанных выше характеристик. Суслу будет подвергаться сбраживанию в течение любого подходящего периода времени, обычно в течение периода времени в диапазоне 1-100 суток, как, например, в диапазоне 1-21 суток, как, например, 2-10 суток, как, например, 3-7 суток. Сбраживание осуществляют при любой пригодной температуре, например, при температуре в диапазоне 5-30°C, как, например, 10-28°C, как, например, 15-25°C.

Таким образом, сбраживание на описанной выше стадии iii) осуществляют путем сбраживания водного экстракта с помощью штамма дрожжей *Dekkera*, как описано выше.

Согласно одному варианту осуществления водным экстрактом является суслу, таким образом, сбраживание можно рассматривать как первичное сбраживание.

Согласно другому варианту осуществления водным экстрактом является получаемый при брожении напитков на основе солода и/или злаков, такой как пиво, таким образом, сбраживание можно рассматривать как вторичное сбраживание.

В процессе многодневного брожения образуются вкусовые вещества. Если штамм дрожжей не способен превращать конкретные соединения, они все еще будут присутствовать после стадии сбраживания iii).

В дополнение к вкусовому веществу, образующемуся в ходе процесса сбраживания, сбраживаемый(сбраживаемые) сахар(сахара), который(которые) может(могут) использоваться штаммом дрожжей, превращается(превращаются) в этанол и CO_2 одновременно с образованием вкусовых веществ. Если штамм дрожжей не способен сбраживать конкретные сбраживаемые сахара, они все еще будут присутствовать после стадии сбраживания iii), и будет образовываться малое количество этанола, или он вообще не будет образовываться.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения напиток на основе солода и/или злаков, полученный с помощью способа по настоящему изобретению, может содержать низкие уровни 4-этилфенола. Согласно одному варианту осуществления указанный напиток на основе солода и/или злаков содержит менее 0,5 мг/л 4-этилфенола, как, например, менее 0,3 мг/л, как, например, менее 0,1 мг/л 4-этилфенола.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения напиток на основе солода и/или злаков, полученный с помощью способа по настоящему изобретению, может содержать низкие уровни 4-этилгваякола. Согласно одному варианту осуществления указанный напиток на основе солода и/или злаков содержит менее 1 мг/л 4-этилгваякола, как, например, менее 0,8 мг/л, как, например, менее 0,6 мг/л, как, например, менее 0,5 мг/л 4-этилгваякола.

Согласно другому варианту осуществления напиток на основе солода и/или злаков, полученный в соответствии со способом по настоящему изобретению, содержит менее 3% этанола, как, например, менее 2% этанола, как, например, менее 1,5% этанола, как, например, менее 1,0% этанола, как, например, менее 0,5% этанола, как, например, менее 0,3% этанола, как, например, менее 0,1% этанола.

После этого напиток на основе солода и/или злаков может быть подвергнут дальнейшей обработке. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения напиток на основе солода и/или злаков разбавляют жидкостью, такой как вода.

Необязательно воду можно применять для разбавления напитка на основе солода и/или злаков и, следовательно, регулирования, например, содержания этанола. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения пропорции вода:напиток на основе солода и/или злаков могут находиться в диапазоне 0,1-5 частей воды на 1 часть напитка на основе солода и/или злаков.

Согласно одному варианту осуществления напитков на основе солода и/или злаков разбавляют водой, так что конечная концентрация этанола в напитке на основе солода и/или злаков составляет менее 1,9% этанола, как, например, менее 1,5% этанола, как, например, менее 1,0% этанола, как, например, менее 0,5% этанола, как, например, менее 0,3% этанола, как, например, менее 0,1% этанола.

Дополнительный процесс может, например, также включать охлаждение и/или фильтрацию напитка на основе солода и/или злаков. Также можно добавлять добавки. Кроме того, можно добавлять CO₂. Наконец, напиток на основе солода и/или злаков, такой как пиво, может быть подвергнут пастеризации и/или фильтрации перед его упаковкой (например, в бутылки или банки).

Напиток на основе солода и/или злаков, полученный при сбраживании с помощью дрожжей в соответствии с настоящим изобретением, в целом выгодно отличается приятным вкусом и низким содержанием этанола. Вкус может быть проанализирован, например, дегустационной комиссией по оценке качества пива. Предпочтительно указанная комиссия обучена дегустации и описанию вкусов пива, уделяя особое внимание альдегидам, бумажному вкусу, несвежему вкусу, сложным эфирам, высшим спиртам, жирным кислотам и серосодержащим компонентам.

В целом комиссия по оценке качества пива будет состоять из 3-30 членов, например, 5-15 членов, предпочтительно 8-12 членов. Комиссия по оценке качества пива может оценивать наличие различных вкусов, таких как «бумажный», «окисленный», вкус «просроченных продуктов» и хлебный привкус, а также вкус сложных эфиров, высших спиртов, серосодержащих компонентов и вкусовая гамма пива.

Настоящее изобретение также относится к напиткам на основе солода и/или злаков, полученным с помощью описанных выше способов.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения напиток на основе солода и/или злаков, полученный при сбраживании водного экстракта с помощью указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется приятным вкусом со сниженными уровнями фенольного привкуса.

Согласно одному варианту осуществления напитков на основе солода и/или злаков, полученный в соответствии со способом по настоящему изобретению, содержит менее 3% этанола, как, например, менее 2% этанола, как, например, менее 1,5% этанола, как, например, менее 1,0% этанола, как, например, менее 0,5% этанола, как, например, менее 0,3% этанола, как, например, менее 0,1% этанола.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения напитков на основе солода и/или злаков, полученный при сбраживании водного экстракта с помощью указанного штамма дрожжей в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется приятным вкусом.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения напитков на основе солода и/или злаков характеризуется концентрацией β -цитронеллола менее 25 мкг/л, как, например, менее 20 мкг/л.

Согласно другому варианту осуществления напитка на основе солода и/или злаков характеризуются концентрацией гераниола по меньшей мере 18 мкг/л, как, например, по меньшей мере 20 мкг/л.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:1	Нуклеотидная последовательность DaPAD1 у <i>Dekkera anomalus</i>
SEQ ID NO:2	Аминокислотная последовательность DaPAD1 у <i>Dekkera anomalus</i>
SEQ ID NO:3	Нуклеотидная последовательность DaSOD у <i>Dekkera anomalus</i>
SEQ ID NO:4	Аминокислотная последовательность DaSOD у <i>Dekkera anomalus</i>
SEQ ID NO:5	Нуклеотидная последовательность DbPAD2 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:6	Аминокислотная последовательность DbPAD2 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:7	Нуклеотидная последовательность DbSOD у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:8	Аминокислотная последовательность DbSOD у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:9	Нуклеотидная последовательность DaMTRA1 у <i>Dekkera anomalus</i>
SEQ ID NO:10	Аминокислотная последовательность DaMTRA1 у <i>Dekkera anomalus</i>
SEQ ID NO:11	Нуклеотидная последовательность DaISOM у <i>Dekkera anomalus</i>
SEQ ID NO:12	Аминокислотная последовательность DaISOM у <i>Dekkera anomalus</i>
SEQ ID NO:13	Нуклеотидная последовательность DaMTRA2 у <i>Dekkera anomalus</i>
SEQ ID NO:14	Аминокислотная последовательность DaMTRA2 у <i>Dekkera anomalus</i>
SEQ ID NO:15	Нуклеотидная последовательность DbMTRA1 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:16	Аминокислотная последовательность DbMTRA1 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:17	Нуклеотидная последовательность DbISOM(2) у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:18	Аминокислотная последовательность DbISOM(2) у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:19	Нуклеотидная последовательность DbMTRA2 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:20	Аминокислотная последовательность DbMTRA2 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:21	Нуклеотидная последовательность DbISOM(1) у <i>Dekkera bruxellensis</i>

SEQ ID NO:22	Аминокислотная последовательность DbISOM(1) у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:23	Нуклеотидная последовательность DbPAD1 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:24	Аминокислотная последовательность DbPAD1 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:25	Нуклеотидная последовательность DbMTRA3 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:26	Аминокислотная последовательность DbMTRA3 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:27	Нуклеотидная последовательность DbMTRA4 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:28	Аминокислотная последовательность DbMTRA4 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:29	Нуклеотидная последовательность DbMTRA5 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:30	Аминокислотная последовательность DbMTRA5 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:31	Нуклеотидная последовательность DbMTRA6 у <i>Dekkera bruxellensis</i>
SEQ ID NO:32	Аминокислотная последовательность DbMTRA7 у <i>Dekkera bruxellensis</i>

Список литературы

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

Daenen L et al. 2008: Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *J Appl Microbiol* 2008, 104:478–488.

Harris et al. "Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. Vol. 81, no. 6. A January 2009.

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

Li et al. (2015 April 06) *Nucleic Acids Research* 43 (W1) :W580-4 PMID: 25845596;
McWilliam et al., (2013 May 13) *Nucleic Acids Research* 41 (Web Server issue) :W597-600
PMID: 23671338

Mukai et al. PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol 109, no. 6, 1 June 2010.

Pinu FR, Villas-Boas SG: Rapid quantification of major volatile metabolites in fermented food and beverages using gas chromatography-mass spectrometry. *Metabolites* 2017, 7.

Sievers et al. (2011 October 11) *Molecular Systems Biology* 7 :539, PMID: 21988835

Признаки

Настоящее изобретение, кроме того, может быть определено любым из следующих признаков:

1. Способ получения напитка на основе солода и/или злаков с низкими уровнями 4-этилфенола, причем указанный способ предусматривает стадии:

- i) обеспечения водного экстракта солода и/или зерен злаков
- ii) обеспечения штамма дрожжей *Dekkera*, причем указанные дрожжи несут мутацию в одном из следующих генов, или его делецию:

a. *PAD*

b. *SOD*

- iii) сбраживания указанного водного экстракта с помощью указанных дрожжей, с получением тем самым указанного напитка на основе солода и/или злаков.

2. Способ получения напитка на основе солода и/или злаков, причем указанный способ предусматривает стадии:

- i) обеспечения водного экстракта солода и/или зерен злаков
- ii) обеспечения штамма дрожжей *Dekkera*, причем указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол при инкубации в водном растворе, содержащем п-кумаровую кислоту
- iii) сбраживания указанного водного экстракта с помощью указанных дрожжей, с получением тем самым указанного напитка на основе солода и/или злаков.

3. Способ в соответствии с пунктом 2, в котором указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% как, например, более 20%, как, например, более 15%, как, например, более 10%, как, например, более 5%, как, например, более 1% п-кумаровой кислоты, присутствующей в водном растворе, в 4-винилфенол.

4. Способ получения напитка на основе солода и/или злаков, причем указанный способ предусматривает стадии:

- i) обеспечения водного экстракта солода и/или зерен злаков
- ii) обеспечения штамма дрожжей *Dekkera*, причем указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% феруловой кислоты в 4-этилгваякол при инкубации в водном растворе, содержащем феруловую кислоту
- iii) сбраживания указанного водного экстракта с помощью указанных дрожжей, с получением тем самым указанного напитка на основе солода и/или злаков.

5. Способ в соответствии с пунктом 4, в котором указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% как, например, более 20%, как, например, более 15%, как, например, более 10%, как, например, более 5%, как, например, более 1% феруловой кислоты, присутствующей в водном растворе, в 4-винилгваякол.

6. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей имеет генотип I и/или генотип II:

I: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего PAD

II: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего SOD.

7. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, причем указанный штамм дрожжей имеет генотип I:

I: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего *DaPAD1* SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

8. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, причем указанный штамм дрожжей имеет генотип I:

I: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего *DaPAD1* SEQ ID NO:2.

9. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, причем указанный штамм дрожжей имеет генотип I:

I: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbPAD2 SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

10. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, причем указанный штамм дрожжей имеет генотип I:

I: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbPAD2 SEQ ID NO:6.

11. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, причем указанный штамм дрожжей имеет генотип II:

II: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DaSOD SEQ ID NO:4 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

12. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, причем указанный штамм дрожжей имеет генотип II:

II: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbSOD SEQ ID NO:8 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

13. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором водный экстракт содержит п-кумаровую кислоту, как, например, п-кумаровую кислоту в количестве, находящемся в диапазоне 0,1-100 мг/л, как, например, п-кумаровую кислоту в количестве, находящемся в диапазоне от 0,2 мг/л до 50 мг/л, как, например, в диапазоне 0,5-20 мг/л, как, например, п-кумаровую кислоту в количестве, находящемся в диапазоне 1-5 мг/л.

14. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей не способен превращать более 20%, как, например, более 15%, как, например, более 10%, как, например, более 5%, как, например, более 1% п-кумаровой кислоты, присутствующей в водном экстракте, в 4-этилфенол.

15. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей при инкубации в водном растворе, содержащем заданный уровень п-кумаровой кислоты, не способен снижать уровень п-кумаровой кислоты более чем на 25%, например, более чем на 20%, как, например, более чем на 15%, как, например, более чем на 10%, как, например, более чем на 5%, как, например, более чем на 1%.

16. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей при инкубации в водном растворе, содержащем заданный уровень п-кумаровой кислоты и заданный уровень 4-этилфенола, не способен повышать уровень 4-этилфенола в молях более чем на 25%, как, например, более чем на 20%, как, например, более чем на 15%, например, более чем на 10%, как, например, более чем на 5%, например, более чем на 1% от заданного уровня п-кумаровой кислоты в молях.

17. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный напиток на основе солода и/или злаков содержит низкие уровни 4-этилфенола.

18. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный напиток на основе солода и/или злаков содержит менее 0,5 мг/л 4-этилфенола, как, например, менее 0,3 мг/л, как, например, менее 0,1 мг/л 4-этилфенола.

19. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором водный экстракт содержит феруловую кислоту, как, например, феруловую кислоту в количестве, находящемся в диапазоне 0,1-100 мг/л, как, например, от 0,2 мг/л до 50 мг/л, как, например, 0,5-20 мг/л, как, например, 1-5 мг/л феруловой кислоты.

20. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% феруловой кислоты, присутствующей в водном экстракте, в 4-этилгваякол.

21. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей не способен превращать более 20%, как, например, более 15%, как, например, более 10%, как, например, более 5%, как, например, более 1% феруловой кислоты, присутствующей в водном экстракте, в 4-этилгваякол.

22. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей при инкубации в водном растворе, содержащем заданный уровень феруловой кислоты, не способен снижать уровень феруловой кислоты более чем на 25%, например, более чем на 20%, как, например, более чем на 15%, как, например, более чем на 10%, как, например, более чем на 5%, как, например, более чем на 1%.

23. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей при инкубации в водном растворе, содержащем заданный уровень феруловой кислоты и заданный уровень 4-этилгваякола, не способен повышать уровень 4-этилгваякола в молях более чем на 25%, как, например, более чем на 20%, как, например, более чем на 15%, например, более чем на 10%, как, например, более чем на 5%, например, более чем на 1% от заданного уровня п-кумаровой кислоты в молях.

24. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный напиток на основе солода и/или злаков содержит низкие уровни 4-этилгваякола.

25. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный напиток на основе солода и/или злаков содержит менее 1 мг/л 4-этилгваякола, как, например, менее 0,8 мг/л, как, например, менее 0,6 мг/л, как, например, менее 0,5 мг/л 4-этилгваякола.

26. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором дрожжи представляют собой *Dekkera anomalus*.

27. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera anomalus*, и при этом указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DaPAD1*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DaPAD1*, кодирующего мутантный белок DaPAD1, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот SEQ ID NO:2.

28. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera anomalus*, и при этом указанный штамм дрожжей несет одну или несколько из следующих мутаций:

- i. мутация, вводящая преждевременный стоп-кодон в гене *DaPAD1*
- ii. мутация в сайте сплайсинга гена *DaPAD1*
- iii. мутация в гене *DaPAD1*, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания
- iv. мутация, приводящая в результате к делеции части гена *DaPAD1*, причем ген *DaPAD1* дикого типа кодирует полипептид SEQ ID NO:2.

29. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera anomalus*, и при этом указанный штамм дрожжей содержит мутантный ген *DaPAD1*, кодирующий мутантный белок DaPAD1, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 аминокислот, как, например, по меньшей мере 70 аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 аминокислот SEQ ID NO: 2.

30. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera anomalus*, и при этом указанный штамм дрожжей содержит мутантный ген *DaPAD1*, кодирующий мутантный белок DaPAD1, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO: 2.

31. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera bruxellensis*, и при этом указанный штамм дрожжей несет одну или несколько из следующих мутаций:

- i. мутация, вводящая преждевременный стоп-кодон в гене *DbPAD2*
- ii. мутация в сайте сплайсинга гена *DbPAD2*
- iii. мутация в гене *DbPAD2*, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания
- iv. мутация, приводящая в результате к делеции части гена *DbPAD2*, причем ген *DbPAD2* дикого типа кодирует полипептид SEQ ID NO:6.

32. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera bruxellensis*, и при этом указанный штамм дрожжей содержит мутантный ген *DbPAD2*, кодирующий мутантный белок *DbPAD2*, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 аминокислот, как, например, по меньшей мере 70 аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 аминокислот SEQ ID NO:6.

33. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera bruxellensis*, и при этом указанный штамм дрожжей содержит мутантный ген *DbPAD2*, кодирующий мутантный белок *DbPAD2*, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:6.

34. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей несет мутантный ген *PAD*, содержащий мутантный промотор *PAD*.

35. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей несет мутацию в гене *PAD*, приводящую к потере функции *PAD*.

36. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей несет мутацию в гене *SOD*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *SOD*, кодирующего мутантный белок *SOD*, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот.

37. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera anomalous*, и при этом указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DaSOD*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DaSOD*, кодирующего мутантный белок *DaSOD*, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот SEQ ID NO:4.

38. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera anomalous*, и при этом указанный штамм дрожжей несет одну или несколько из следующих мутаций:

- i. мутация, вводящая преждевременный стоп-кодон в ген *DaSOD*

- ii. мутация в сайте сплайсинга гена *DaSOD*
- iii. мутация в гене *DaSOD*, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания
- iv. мутация, приводящая в результате к делеции части гена *DaSOD*, причем ген *DaSOD* дикого типа кодирует полипептид SEQ ID NO:4.

39. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera anomalus*, и при этом указанный штамм дрожжей содержит мутантный ген *DaSOD*, кодирующий мутантный белок DaSOD, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 аминокислот, как, например, по меньшей мере 70 аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 аминокислот SEQ ID NO: 4.

40. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera anomalus*, и при этом указанный штамм дрожжей содержит мутантный ген *DaSOD*, кодирующий мутантный белок DaSOD, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO: 4.

41. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera bruxellensis*, и при этом указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DbSOD*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbSOD*, кодирующего мутантный белок DbSOD, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот SEQ ID NO:8.

42. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera bruxellensis*, и при этом указанный штамм дрожжей несет одну или несколько из следующих мутаций:

- i. мутация, вводящая преждевременный стоп-кодон в ген *DbSOD*
- ii. мутация в сайте сплайсинга гена *DbSOD*
- iii. мутация в гене *DbSOD*, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания
- iv. мутация, приводящая в результате к делеции части гена *DbSOD*, причем ген *DbSOD* дикого типа кодирует полипептид SEQ ID NO:8.

43. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera bruxellensis*, и при этом указанный штамм дрожжей содержит мутантный ген *DbSOD*, кодирующий мутантный белок DbSOD, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 аминокислот, как, например, по меньшей мере 70 аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 аминокислот SEQ ID NO: 8.

44. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera bruxellensis*, и при этом указанный штамм дрожжей содержит мутантный ген *DbSOD*, кодирующий мутантный белок DbSOD, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO: 8.

45. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей несет ген *SOD*, содержащий мутантный промотор *SOD*.

46. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей несет мутацию в гене *SOD*, приводящую к потере функции *SOD*.

47. Способ получения напитка на основе солода и/или злаков, содержащего менее 3% этанола, причем указанный способ предусматривает стадии:

- i) обеспечения водного экстракта солода и/или зерен злаков
- ii) обеспечения штамма дрожжей *Dekkera*, причем указанный штамм дрожжей не способен использовать более 2% мальтозы
- iii) сбраживания указанного водного экстракта с помощью указанных дрожжей, с получением тем самым указанного напитка на основе солода и/или злаков.

48. Способ получения напитка на основе солода и/или злаков, содержащего менее 3% этанола, причем указанный способ предусматривает стадии:

- i) обеспечения водного экстракта солода и/или зерен злаков
- ii) обеспечения штамма дрожжей *Dekkera*, причем указанный штамм дрожжей не способен использовать более 2% мальтозы при инкубации при 25°C в течение 10 суток в

водном растворе, содержащем мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 40-100 г/кг, и глюкозу в количестве, находящемся в диапазоне 8-50 г/кг,

- iii) сбраживания указанного водного экстракта с помощью указанных дрожжей, с получением тем самым указанного напитка на основе солода и/или злаков.

49. Способ получения напитка на основе солода и/или злаков, содержащего менее 3% этанола, причем указанный способ предусматривает стадии:

- i) обеспечения водного экстракта солода и/или зерен злаков
- ii) обеспечения штамма дрожжей *Dekkera*, причем указанный штамм дрожжей не способен расти в водном растворе, содержащем мальтозу в качестве единственного источника углерода
- iii) сбраживания указанного водного экстракта с помощью указанных дрожжей, с получением тем самым указанного напитка на основе солода и/или злаков.

50. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей выбран из группы, состоящей из *Dekkera* и *Brettanomyces*.

51. Способ в соответствии с любым из пунктов 1-4 и 47-49, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Brettanomyces*.

52. Способ в соответствии с любым из пунктов 1-4 и 47-49, в котором штамм дрожжей выбран из группы, состоящей из *Brettanomyces nanus*, *Brettanomyces naardenensis*, *Brettanomyces custerisianus*, *Brettanomyces anomalus* и *Brettanomyces bruxellensis*.

53. Способ в соответствии с любым из пунктов 1-4 и 47-49, в котором штаммом дрожжей является *Dekkera bruxellensis* и/или *Dekkera anomalus*.

54. Способ в соответствии с любым из пунктов 1-4 и 47-49, в котором штаммом дрожжей является *Dekkera bruxellensis*.

55. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором сбраживание водного экстракта осуществляют при температуре в диапазоне 5-30°C, как, например, 10-25°C, как, например, 15-20°C.

56. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором сбраживание водного экстракта происходит в течение периода в диапазоне 1-45 суток, как, например, 1-21 суток, как, например, 2-10 суток, как, например, 3-7 суток.

57. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором водным экстрактом является сусло.

58. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором водным экстрактом является получаемый при брожении напиток на основе солода и/или злаков.

59. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором водным экстрактом является пиво.

60. Способ в соответствии с любым из пунктов 1-58, в котором напиток на основе солода и/или злаков представляет собой слабоалкогольный напиток на основе солода и/или злаков.

61. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором напиток на основе солода и/или злаков представляет собой безалкогольный напиток на основе солода и/или злаков.

62. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором напиток на основе солода и/или злаков представляет собой пиво, такое как слабоалкогольное пиво или безалкогольное пиво.

63. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором напиток на основе солода и/или злаков содержит менее 2% этанола, как, например, менее 1,5% этанола, как, например, менее 1,0% этанола, как, например, менее 0,5% этанола, как, например, менее 0,3% этанола, как, например, менее 0,1% этанола.

64. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором напиток на основе солода и/или злаков характеризуется концентрацией β -цитронеллола менее 25 мкг/л, как, например, менее 20 мкг/л.

65. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором напиток на основе солода и/или злаков характеризуется концентрацией гераниола по меньшей мере 18 мкг/л, как, например, по меньшей мере 20 мкг/л.

66. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором водный экстракт содержит более 40 г/кг мальтозы, как, например, 40-100 г/кг мальтозы.

67. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором водный экстракт содержит не более 15 г/кг глюкозы, как, например, не более 10 г/кг глюкозы, например, не более 5 г/кг глюкозы.

68. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором водный раствор содержит 8-50 г/кг глюкозы.

69. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором способ также предусматривает стадию(стадии) обработки указанного водного экстракта с получением напитка.

70. Способ в соответствии с пунктом 69, в котором стадии переработки предусматривают одно или несколько из следующего:

iv. фильтрация

v. необязательно выдержка в лагерном подвале

vi. карбонизация

vii. розлив в бутылки

71. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором напиток представляет собой пиво.

72. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором напиток представляет собой слабоалкогольное пиво.

73. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором напиток представляет собой не содержащее алкоголя пиво.

74. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей не способен использовать более 2% мальтозы, присутствующей в водном экстракте, как, например, более 1,5% мальтозы, как, например, более 1% мальтозы.

75. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей не способен использовать более 1% мальтозы.

76. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей не способен использовать мальтозу.

77. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей не способен использовать более 2%, как, например, более 1,5%, например, более 1% мальтозы в водном экстракте при инкубации в указанном водном экстракте при 5-25°C в течение 3-7 суток, причем указанный водный экстракт содержит глюкозу и мальтозу.

78. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей не способен использовать более 2% мальтозы при инкубации при 25°C в течение 10 суток в водном растворе, содержащем мальтозу в количестве, находящемся в диапазоне 40-100 г/кг, и глюкозу в количестве, находящемся в диапазоне 8-50 г/кг,

79. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей не способен использовать мальтозу в качестве единственного источника углерода.

80. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей не способен использовать мальтозу в качестве единственного источника углерода.

81. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанные дрожжи несут мутацию в одном или нескольких из следующих генов, или их делецию:

c. *MTRA1*, причем ген *MTRA1*, например, кодирует белок MTRA1 SEQ ID NO:10 или 16 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

d. *MTRA2*, причем ген *MTRA2*, например, кодирует белок MTRA2 SEQ ID NO:14 или 20 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

e. *ISOM(1)*, причем ген *ISOM(1)*, например, кодирует белок ISOM(1) SEQ ID NO:22 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

f. *ISOM*, причем ген *ISOM*, например, кодирует белок ISOM SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

g. *ISOM(2)*, причем ген *ISOM(2)*, например, кодирует белок ISOM(2) SEQ ID NO:18 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

h. *MTRA3*, причем ген *MTRA3*, например, кодирует белок MTRA3 SEQ ID NO:26 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

i. *MTRA4*, причем ген *MTRA4*, например, кодирует белок MTRA4 SEQ ID NO:28 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

j. *MTRA5*, причем ген *MTRA5*, например, кодирует белок ISOM SEQ ID NO:30 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

k. *MTRA6*, причем ген *MTRA6*, например, кодирует белок MTRA6 SEQ ID NO:32 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

82. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом у указанного штамма отсутствует ген, кодирующий DbMTRA1 SEQ ID NO:16 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

83. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, при этом у указанного штамма отсутствует ген, кодирующий DaMTRA1 SEQ ID NO:10 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

84. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей несет мутацию в гене *MTRA1*, приводящую к потере функции MTRA1.

85. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, причем указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DbMTRA1*, приводящую к потере функции DbMTRA1.

86. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, при этом указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DaMTRA1*, приводящую к потере функции DaMTRA1.

87. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанный штамм дрожжей несет одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA1*, кодирующего мутантный белок DbMTRA1, предусматривающий одну или несколько аминокислотных замен, как, например, 4 или больше, как, например, 8 или больше, как, например, 12 или больше, как, например, 14 или больше аминокислотных замен в N-концевой области, состоящей из аминокислот 1-65 DbMTRA1 SEQ ID NO: 16.

88. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, при этом указанные дрожжи несут одну или несколько мутаций, приводящих в результате к образованию мутантного гена *DaMTRA1*, кодирующего мутантный белок DaMTRA1, предусматривающий одну или несколько аминокислотных замен, как, например, 4 или больше, как, например, 8 или больше, как, например, 12 или больше, как, например, 14 или больше аминокислотных замен в N-концевой области, состоящей из аминокислот 1-65 DaMTRA1 SEQ ID NO: 10.

89. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbMTRA1*, кодирующего мутантный белок DbMTRA1, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 4 аминокислоты, как, например, отсутствуют по меньшей мере 8, как, например, отсутствуют по меньшей мере 12, как, например, отсутствуют по меньшей мере 14 аминокислот SEQ ID NO:16.

90. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, при этом указанный штамм дрожжей

несет мутацию, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DaMTRA1*, кодирующего мутантный белок DaMTRA1, в котором отсутствуют одна или несколько аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 4 аминокислоты, как, например, отсутствуют по меньшей мере 8, как, например, отсутствуют по меньшей мере 12, как, например, отсутствуют по меньшей мере 14 аминокислот SEQ ID NO:10.

91. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором дрожжи несут мутацию в гене *MTRA1*, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *MTRA1*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *MTRA1*;
- мутация в промоторной области гена *MTRA1*; и/или
- мутация в интроне гена *MTRA1*.

92. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором дрожжи представляют собой штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DbMTRA1* SEQ ID NO:15, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DbMTRA1*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *DbMTRA1*;
- мутация в промоторной области гена *DbMTRA1*; и/или
- мутация в интроне гена *DbMTRA1*.

93. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором дрожжи представляют собой штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, при этом указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DaMTRA1* SEQ ID NO:9, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DaMTRA1*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *DaMTRA1*;

- мутация в промоторной области гена *DaMTRAI*; и/или
- мутация в интроне гена *DaMTRAI*.

94. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанный штамм дрожжей предусматривает мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbISOM(2) SEQ ID NO:18 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

95. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, при этом указанный штамм дрожжей предусматривает мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DaISOM SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

96. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей несет одну или несколько мутаций в одном или нескольких из генов *ISOM*, приводящих к потере функции одного или нескольких из *ISOM*.

97. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанный штамм дрожжей несет одну или несколько мутаций в гене *DbISOM(2)*, приводящих к потере функции DbISOM(2).

98. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, при этом указанный штамм дрожжей несет одну или несколько мутаций в гене *DaISOM(2)*, приводящих к потере функции DaISOM(2).

99. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей несет мутацию сдвига рамки считывания в одном или нескольких из генов *ISOM*, приводящую в результате к усечению одного или нескольких из белков *ISOM*.

100. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанный штамм

дрожжей несет мутацию сдвига рамки считывания в гене *DbISOM(2)*, приводящую в результате к усечению белка *DbISOM(2)*.

101. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, при этом указанный штамм дрожжей несет мутацию сдвига рамки считывания в гене *DaISOM*, приводящую в результате к усечению белка *DaISOM*.

102. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором дрожжи несут мутацию в одном или нескольких из генов *ISOM*, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к одной или нескольким аминокислотным заменам в одном или нескольких *ISOM*;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в одном или нескольких генах *ISOM*;
- мутация в сайте сплайсинга в одном или нескольких генах *ISOM*;
- мутация в промоторной области одного или нескольких генов *ISOM*; и/или
- мутация в интроне одного или нескольких генов *ISOM*.

103. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором указанным штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DbISOM(2)* SEQ ID NO:17, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к одной или нескольким аминокислотным заменам *DbISOM(2)*;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DbISOM(2)*;
- мутация в сайте сплайсинга гена *DbISOM(2)*;
- мутация в промоторной области гена *DbISOM(2)*; и/или
- мутация в интроне гена *DbISOM(2)*.

104. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором дрожжи представляют собой штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, при этом указанный штамм

дрожжей несет мутацию в гене *DaISOM* SEQ ID NO: 11, причем мутация является следующей:

- мутация, приводящая в результате к мутации сдвига рамки считывания;
- мутация, приводящая в результате к одной или нескольким аминокислотным заменам *DaISOM*;
- мутация, приводящая в результате к образованию преждевременного стоп-кодона в гене *DaISOM*;
- мутация в сайте сплайсинга в гене *DaISOM*;
- мутация в промоторной области гена *DaISOM*; и/или
- мутация в интроне гена *DaISOM*.

105. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанный штамм дрожжей несет мутацию сдвига рамки считывания, мутацию, приводящую в результате к образованию преждевременного стоп-кодона, или мутацию сайта сплайсинга, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbSOM(2)*, кодирующего мутантный белок *DbISOM(2)*, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, отсутствуют по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 200 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO:18.

106. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанные дрожжи предусматривают мутацию в гене или делецию гена, кодирующего *DbMTRA2* SEQ ID NO:20 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

107. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalous*, при этом указанный штамм дрожжей предусматривает мутацию в гене или делецию гена, кодирующего *DsMTRA2* SEQ ID NO:14 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

108. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанный штамм дрожжей предусматривает мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbMTRA3 SEQ ID NO:26 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

109. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанные дрожжи предусматривают мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbMTRA4 SEQ ID NO:28 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

110. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанный штамм дрожжей предусматривает мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbMTRA5 SEQ ID NO:30 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

111. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанный штамм дрожжей предусматривает мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbMTRA6 SEQ ID NO:32 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

112. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, при этом указанные дрожжи предусматривают мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbISOM(1) SEQ ID NO:22 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 98% идентичностью последовательностей.

113. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей также не способен использовать более 5% мальтотриозы.

114. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей также не способен использовать более 5% мальтотетраозы.

115. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей способен использовать глюкозу.

116. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей не способен к образованию более 1,5 промилле этанола на^oPlato, как, например, 1,4 промилле этанола на Plato, как, например, 1,1 промилле этанола на Plato.

117. Штамм дрожжей *Dekkera*, где указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол при инкубации в водном растворе, содержащем п-кумаровую кислоту.

118. Штамм дрожжей *Dekkera*, несущий мутацию в одном или нескольких из следующих генов, или их делецию:

a. *PAD*;

b. *SOD*.

119. Штамм дрожжей в соответствии с любым из пунктов 117-118, где штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, несущий мутацию в одном или нескольких из следующих генов, или их делецию:

i. ген *DaPAD1*, кодирующий DaPAD1 SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

ii. ген *DaSOD*, кодирующий DaSOD SEQ ID NO:4 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

120. Штамм дрожжей в соответствии с любым из пунктов 117-119, где штамм дрожжей также несет мутацию в одном или нескольких из следующих генов, или их делецию:

i. *MTRAI*, причем ген *MTRAI* кодирует белок MTRA1 SEQ ID NO:10 или 16 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

ii. *MTRA2*, причем ген *MTRA2* кодирует белок MTRA2 SEQ ID NO:14 или 20 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

iii. *ISOM*, причем ген *ISOM* кодирует белок ISOM SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

121. Штамм дрожжей в соответствии с любым из пунктов 117-118, где штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, несущий мутацию в одном или нескольких из следующих генов, или их делецию:

i. ген *DbPAD2*, кодирующий DbPAD2 SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

ii. ген *DbSOD*, кодирующий DbSOD SEQ ID NO:8 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

122. Штамм дрожжей в соответствии с любым из пунктов 117-121, где штамм дрожжей определен в любом из 1-46.

123. Штамм дрожжей *Dekkera*, несущий одну или несколько из мутаций и/или делеций, определенных в любом из пунктов 81-112.

124. Напиток, полученный с помощью способа в соответствии с любым из пунктов 1-116.

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые, однако, не должны толковаться как ограничивающие настоящее изобретение.

Пример 1

Поглощение феруловой кислоты – в среде YPD, дополненной феруловой кислотой

Образование фенольного привкуса исследовали среди штаммов дрожжей, выбранных из *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardensis*, *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomalus*, с применением метода абсорбционной спектроскопии на основе поглощения феруловой кислоты.

Перед инокуляцией культуры штамма дрожжей разводили 1:100 в воде в трех повторах в YPD, дополненной феруловой кислотой в концентрации 0,1 мг/мл. Штаммы дрожжей выращивали до поздней экспоненциальной фазы. Спустя 1 неделю культивирования при 25°C с перемешиванием планшеты центрифугировали (4000 об/мин, 5 мин, 4°C), собирали 100 мкл супернатанта и измеряли абсорбцию при 325 нм на планшет-ридере Spark®Multimode (TECAN).

Из результатов видно, что как вид *B. custersianus*, так и вид *B. naardensis* не способны превращать феруловую кислоту во вторичные метаболиты. Только один штамм *B. Naardensis*, по-видимому, до некоторой степени превращает феруловую кислоту. Большинство штаммов *D. anomalus* и *D. bruxellensis* были способны превращать феруловую кислоту. Неожиданно, один штамм, принадлежащий к виду *D. anomalus* (CRL-90), был не способен превращать феруловую кислоту.

Пример 2

Превращение феруловой кислоты в 4-этилгваякол и п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол в сусле

Штаммы размножали в сусле для производства пива пильзнер в качалочных колбах Эрленмейера на 50 мл. Норму засева, составляющую 100000 клеток/мл, определяли с применением Cellometer X2 (Nexelom Bioscience) для подсчета клеток. Процедуры сбраживания осуществляли в двух повторах в бутылках Duran на 250 мл, содержащих 200 мл стандартного сусла для производства пива пильзнер (Viking Malt). Суммарное давление отслеживали с помощью ANKOM RF Gas Production System® (ANKOM). Процессы сбраживания останавливали спустя 7 суток, клетки удаляли путем центрифугирования (4000 g, 10 мин, 4°C) и супернатант применяли для анализа.

Фенольные соединения (феруловую кислоту, кумаровую кислоту, 4-этилгваякол, 4-этилфенол) определяли количественно с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (UPLC) (Waters) с PDA-детекцией (280 нм). Разделение проводили с применением колонки ВЕН Phenyl Ultra (2,1 × 100 мм, 1,7 мкм) и скоростью потока 0,5 мл/мин. Объем вводимой пробы составлял 1 мкл. Подвижная фаза представляла собой 99,9% А, 0,1% В от 0 до 3 мин с последующим градиентом до 45% В в ходе 5 мин. Элюент А содержал 3% муравьиную кислоту, 10% метанол в воде и элюент В представлял собой 100% метанол. Калибровочные стандарты готовили в метаноле в диапазоне концентраций 0,1-10 мг/л путем разведения стандартной смеси 10 мг/л. Образцы пива фильтровали на фильтре 0,2 мкм, разводили 1,5х элюентом А и перемешивали на вортексе в течение 5 сек. Соединения идентифицировали по времени удерживания и ID подтверждали с помощью метода добавок с использованием стандартного раствора.

Содержание летучих фенолов в полученном пиве показано на фиг. 1А.

В то время как в случае контрольных штаммов CRL-2 и CRL-49 были выявлены как 4-этилфенол, так и 4-этилгваякол, после сбраживания с помощью CRL-90 (*Dekkera anomalous*) 4-этилфенол отсутствовал и было определено минимальное количество 4-этилгваякола. Количества промежуточных соединений 4-винилфенола и 4-винилгваякола были ниже порогового значения для всех процессов сбраживания. Эти результаты указывают на то, что CRL-90 не способен превращать п-кумаровую кислоту в 4-этилфенол и характеризуется сниженной способностью превращать феруловую кислоту в 4-этилгваякол. Таким образом, CRL-90 является первым штаммом *Dekkera*, для которого не наблюдается POF.

Пример 3

Геномные данные

Результаты отсутствия способности превращать феруловую кислоту в 4-этилгваякол и п-кумаровую кислоту в 4-этилфенол подкрепляются геномными данными.

При сравнении полного скаффолда *Dekkera anomalous* CRL-90 с помощью BLAST с эталонным геномом *D. anomalous* (CRL-49) было обнаружено, что у штамма дрожжей CRL-90 отсутствовала N-концевая часть, содержащая первые 1-53714 п. о. (фиг. 1В). Кроме того, было обнаружено, что отсутствующая область содержала ген *DaPAD1* у эталонного штамма.

Таким образом, у штамма CRL-90 отсутствует ген *DaPAD1*.

Предполагаемая декарбоксилаза, кодируемая геном *DaPAD1* у *Dekkera*, характеризуется ограниченной идентичностью последовательностей с декарбоксилазой, известной у других видов дрожжей. Одним из примеров этого является то, что

декарбоксилаза у *Saccharomyces cerevisiae*, называемая FDC1, характеризуется только 8,12% и 9,50% идентичностью аминокислотных последовательностей с предполагаемой декарбоксилазой у *Dekkera anomalus* (DaPAD1). У *Saccharomyces cerevisiae* ScFDC1 активируется ScPAD1. DaPAD1 характеризуется 12,85% идентичностью аминокислотных последовательностей с ScPAD1, однако, похоже, что ее функция отличается, поскольку предполагаемая функция DaPAD1 заключается в декарбоксилазной активности, а ScPAD1 действует как активатор ScFDC1. См. таблицу 1 ниже.

Интересно, что идентичность аминокислотных последовательностей у двух видов *Dekkera* также отличается. DaPAD1 характеризуется 68,64% и 85,31% идентичностью последовательностей с DbPAD2 и DbPAD1 соответственно. См. таблицу 1 ниже.

Таблица 1. Сравнение аминокислотных последовательностей. В верхней правой части показана % идентичность. В нижней левой части показано число отличий (гэпы и несовпадения)

	1	2	3	4	5
<i>B. bruxellensis</i> PAD2	1	80,45	85,31	14,06	8,32
<i>B. bruxellensis</i> PAD1	2	43	68,64	13,55	9,50
<i>B. anomalus</i> PAD1	3	26	69	12,85	8,12
<i>S. cerevisiae</i> ScPAD1	4	214	236	217	7,33
<i>S. cerevisiae</i> ScFDC1	5	463	457	464	468

При сравнении с помощью BLAST полного скаффолда с эталонным скаффолдом, наиболее близкое совпадение, показанное ниже в таблице 2, подтверждает, что у CRL-90 отсутствует ген *DaPAD1*.

Таблица 2:

Параметр	Показатели BLAST для наиболее близкого совпадения
Общий показатель	121,278
Максимальный показатель	83,996
Значения идентичности	42,141

Максимальная % идентичность	99,78
Длина HSP	42,229

Пример 4

Использование мальтозы или глюкозы в качестве единственного источника углерода

Ниже авторы настоящего изобретения описывают тест, демонстрирующий, способен ли штамм дрожжей использовать мальтозу или глюкозу в качестве единственного источника углерода.

Применяли шесть штаммов *Dekkera* с разными геномными картами. Четыре штамма относились к *Dekkera bruxellensis* (CRL-1, CRL-2, CRL-19 и CRL-50), тогда как два остальных штамма (CRL-49 и CRL-90) относились к *Dekkera anomalus*.

Среда YNB

Среду, состоящую из основы азотного агара для дрожжей, с аминокислотами, дополненную 1% (что соответствует 10 г/л) глюкозой или мальтозой соответственно в качестве единственного источника углерода, применяли для тестирования метаболической активности дрожжевых клеток, и, следовательно, косвенно для тестирования способности дрожжевых клеток к росту. Штаммы *Dekkera* инкубировали в трех повторах в 96-луночных планшетах Biolog® (Omnilog) при 25°C без перемешивания и отслеживали кинетику роста с помощью OmniLog®Biolog. Количественное определение основывалось на добавлении тетразолиевого красителя, который восстанавливается до фиолетового формазана в случае продукции NADH, что можно применять в качестве косвенной оценки метаболической активности штамма. Рост штамма зачастую коррелирует с метаболической активностью, и, таким образом, зачастую рост определяют по проявлению фиолетового цвета.

Для тестирования способности дрожжей использовать мальтозу или глюкозу дрожжи выращивали в течение 85 часов в синтетической среде (см. фиг. 2А). По оси x показано время в часах, а по оси y показаны результаты количественного определения метаболической активности на основе изменения цвета.

Как можно увидеть из фиг. 2, CRL-1, CRL-19, CRL-49 и CRL-50 были способны использовать как глюкозу (G), так и мальтозу (M). Однако, CRL-19 был не способен использовать мальтозу (M) в той же степени, что и CRL-1, CRL-49 и CRL50. Только CRL-2 и CRL-90 были способны использовать глюкозу (G), но не мальтозу (M). Таким образом,

как для CRL-2, так и для CRL-90 была показана незначительная метаболическая активность при инкубации с мальтозой в качестве единственного источника углерода.

Пример 5

Способность использовать разные сбраживаемые сахара в сусле

Ниже авторы настоящего изобретения описывают тест, демонстрирующий, способен ли штамм дрожжей использовать разные сбраживаемые сахара, такие как глюкоза, мальтоза, мальтотриоза или мальтотетраоза, в сусле.

Сусло в качестве среды для дрожжей

Сусло 1

С целью изучения способности *Dekkera* использовать сбраживаемые сахара в сусле, сусло из одного солода для производства светлого пива, 16°Plato, применяли для первичного сбраживания с помощью следующих штаммов: CRL-1, CRL-2, CRL-19, CRL-49 и CRL-50. Сбраживание осуществляли при 25°C в течение 10 суток.

CRL-1, CRL-2, CRL-19 и CRL-50 относятся к *Dekkera bruxellensis*, а CRL-49 относится к *Dekkera anomalus*.

Сбраживаемые сахара определяли количественно с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) с применением колонки DIONEX. Показатели содержания этанола получали с помощью аналитической системы Alcolyser BeerME (www.anton-paar.com). Результаты показаны в таблице 3 ниже:

Таблица 3:

	Этанол (%об/об)	Глюкоза (мг/кг)	Мальтоза (мг/кг)	Мальтотриоза (мг/кг)	Мальтотетраоза (мг/кг)
Сусло	0	9835,98	53598,12	13846,41	2614,66
CRL-1	7,49 ± 0,13	4 ± 2	0 ± 0	179 ± 19	3225 ± 150
CRL-2	1,71 ± 0,02	91 ± 16	60215 ± 3559	16674 ± 839	3325 ± 157
CRL-19	7,39 ± 0,08	10 ± 14	22 ± 30	67 ± 46	2686 ± 1072
CRL-49	7,3 ± 0,05	0 ± 0	15 ± 21	3403 ± 388	3064 ± 148
CRL-50	7,75 ± 0,32	37 ± 4	1570 ± 549	19 ± 7	81 ± 1

Брожение для всех штаммов протекало подобным образом, как видно по накоплению CO₂ (фиг. 3А) и продукции этанола (7,5 ± 0,2 %; таблица 3), за исключением CRL-2, который был не способен метаболизировать мальтозу. CRL-2 продуцировал 1,71 ± 0,02% об/об этанола.

Сусло 2

Сусло для производства пива лагер, полученное из солода и сахара (солод и сахар в соотношении 70/30), применяли для первичного сбраживания со следующим штаммом CRL-90 в 200 мл. CRL-90 относится к *Dekkera anomalus*. Сбраживание осуществляли при 25°C в течение 10 суток.

Сбраживаемые сахара определяли количественно с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), как описано выше. Результаты показаны в таблице 4 ниже:

Таблица 4.

QA_HPLC	Сусло «70/30»	Dekkera «70/30»
Фруктоза, мг/кг	2416,17	43,98
Глюкоза, мг/кг	19610,30	124,07
Изомальтоза, мг/кг		111,81
Изомальтотриоза, мг/кг		124,9
Мальтогептаоза, мг/кг		80,83
Мальтогексаоза, мг/кг		347,96
Мальтооктаоза, мг/кг		0
Мальтопентаоза, мг/кг		713,97
Мальтоза, мг/кг	60840,05	64974,43
Мальтотетраоза, мг/кг		1275,96
Мальтотриоза, мг/кг	9609,67	9963,13
Паноза, мг/кг		449,93
Сахароза, мг/кг	3498,56	3291,56
Этанол, % об/об		1,39

Сбраживание CRL-90 протекало подобно CRL-2, как видно по накоплению CO₂ (фиг. 2B). CRL-90 был не способен использовать мальтозу, присутствующую в сусле 70/30. CRL-90 продуцировал 1,39% об/об этанола.

Пример 6

Предполагаемые гены, вовлеченные в ассимиляцию мальтозы

Штаммы дрожжей росли в течение одной недели в 200 мл в среде, содержащей дрожжевой экстракт, пептон и декстрозу (YPD) (дрожжевой экстракт (1%), пептон (2%), декстроза (2%) при 25°C с перемешиванием. Клетки собирали путем центрифугирования при 4000 g, 4°C, промывали путем суспендирования в воде и собирали при тех же условиях.

Как видно из таблицы 4, CRL-90 был не способен использовать мальтозу.

При сравнении полного скаффолда *Dekkera anomalus*, CRL-90, с помощью BLAST с эталонным геномом *Dekkera anomalus*, CRL-49, было обнаружено, что у штамма CRL-90 отсутствовала N-концевая часть, содержащая 1-40469 п. о., см. фиг. 2В. Кроме того, было обнаружено, что у эталонного штамма отсутствующая область содержала кластер генов, вовлеченных в ассимиляцию мальтозы, содержащий *DaMTRA1*, *DaISOM* и *DaMTRA2*.

Геномы CRL-1, CRL-2, CRL-19 и CRL-50 секвенировали с использованием технологии одномолекулярного секвенирования в реальном времени (Pacific Biosciences). Для всех образцов получали геномы хорошего качества. Гены, идентифицированные как такие, которые предположительно вовлечены в ассимиляцию мальтозы, идентифицировали и сравнивали. Поиск с использованием BLAST применяли для поиска конкретных белков в каждом геноме. Число копий для каждого белка предсказывали исходя из совпадений, с фильтрацией по % идентичности (>98%) и длине HSP (полное перекрытие). Результаты показаны в таблице 5 ниже.

Таблица 5:

Копии гена	DbMTRA2	DbMAL12	DbMTRA1	DbISOM(1)	DbISOM(2)	DbMTRA5
CRL-1	3	0	4	1	1	2
CRL-2	2	1	1*	1	1**	2
CRL-19	1	1	1	1	1	2
CRL-50	1	0	3	1	1	2

* CRL-2 содержит одну копию DbMTRA1. Нуклеотидная последовательность, кодирующая ген *DbMTRA1* у CRL-2, характеризуется 97,51% идентичностью последовательностей с нуклеотидной последовательностью, кодирующей ген *DbMTRA1* у CRL-1, т. е. последовательности отличаются 44 нуклеотидами. Идентичность

аминокислотных последовательностей между белком CRL-2 DbMTRA1 и белком CRL-1 DbMTRA1 составляет 97,62%, т. е. последовательности отличаются 14 аминокислотами.

** У CRL-2 отсутствует ген, кодирующий функциональный DbIOSM(2). CRL-2 несет делецию в 1050 п. о., которая прерывает полную трансляцию.

Результаты нуклеотидного выравнивания последовательностей гена DbMTRA1 в случае CRL-1 (обнаружено 4 копии), CRL-50 (обнаружено 3 копии), CRL-19 (обнаружена 1 копия), CRL-2 (обнаружена 1 копия с 97,51% гомологией) показаны на фиг. 4А. Результаты выравнивания отображают N-концевую нуклеотидную последовательность транспортера мальтозы DbMTRA1. Было обнаружено, что копия в случае CRL-2 имеет совершенно другую N-концевую последовательность по сравнению с таковой для CRL-1, CRL-19 и CRL-50.

Осуществляли выравнивание аминокислотных последовательностей для всех копий, обнаруженных для DbMTRA1. Опять же, можно сделать вывод, что аминокислотная последовательность N-конца белка CRL-2 DbMTRA1 отличается от аминокислотной последовательности белка DbMTRA1 CRL-1, CRL-19 и CRL-50.

Предполагаемые транспортеры мальтозы, кодируемые генами *Dekkera*, характеризуются ограниченной идентичностью последовательностей с транспортерами мальтозы, известными у других видов дрожжей. Одним из примеров этого является то, что транспортер мальтозы, ScMAL31, у *Saccharomyces cerevisiae* характеризуется примерно 47% идентичностью последовательностей с транспортером мальтозы, DbMTRA1, обнаруженным у *Dekkera bruxellensis*. Это также имеет место в случае основных изомальтаз. Основные изомальтазы, ScIMA1, у *Saccharomyces cerevisiae* характеризуется лишь примерно 60% идентичностью последовательностей с предполагаемой основной изомальтазой, DbISOM, обнаруженной у *Dekkera bruxellensis*.

Пример 7

Бета-глюкозидазная активность и образование вкуса

Dekkera могут содержать две открытые рамки считывания (ORF), которые предположительно кодируют две бета-глюкозидазы, однако влияние присутствия этих генов в процессе пивоварения у *Dekkera* ранее не изучалось.

Секвенирование ДНК и биоинформатический анализ

Штаммы дрожжей *Dekkera* выращивали в колбах Эрленмейера на 100 мл, содержащих 50 мл YPD, в аэробных условиях при 25°C с перемешиванием (100 об/мин) в течение одной недели.

Клетки собирали путем центрифугирования при 4000 g, 4°C, промывали путем суспендирования в воде и собирали при тех же условиях. Образцы отправляли для

выделения ДНК и полногеномного секвенирования, с библиотекой коротких вставок PE150, на Illumina HiSeq4000 (BGI-Tech Solutions, Гонконг). В качестве инструмента для биоинформатического анализа применяли программное обеспечение CLC Genomics Workbench (www.qiagenbioinformatics.com). Сборку генома клеток осуществляли с использованием программного обеспечения CLC с применением средства сборки *De novo*. Представляющие интерес гены были обнаружены в GenBank, номер доступа ([AKS48905.1](#), [EIF45415.1](#), [AKS48904.1](#)), для DbBGL1, DbBGL2 и DaBGL, и для идентификации наличия или отсутствия каждого гена применяли инструмент Nucleotide BLAST в рамках программного обеспечения CLC.

См. результаты для DbBGL1, DbBGL2 и DaBGL в таблице 6 ниже:

Таблица 6.

Штамм	Вид	ORF для бета-глюкозидазы		
		DbBGL1	DbBGL2	DaBGL
CRL-1	<i>D. bruxellensis</i>	X	-	-
CRL-2	<i>D. bruxellensis</i>	-	X	-
CRL-19	<i>D. bruxellensis</i>	X	X	-
CRL-27	<i>D. bruxellensis</i>	X	-	-
CRL-49	<i>D. anomalus</i>	-	-	X
CRL-50	<i>D. bruxellensis</i>	-	-	-

Было обнаружено, что из штаммов дрожжей *Dekkera bruxellensis*, CRL-1 и CRL-27 имеют одну открытую рамку считывания (ORF) для DbBGL, т. е. DbBGL1. CRL-2 имел одну ORF для DbBGL, т. е. DbBGL2. CRL-19 имел обе ORF, т. е. как DbBGL1, так и DbBGL2. CRL-50 не имел ни одной OFR для DbBGL. Штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, CRL-49, содержал одну OFR для DaBGL.

Для тестирования активности бета-глюкозидазы в клетках *Dekkera*, представляющие интерес клетки выращивали в течение одной недели в среде, содержащей дрожжевой экстракт, пептон и целлобиозу (2%) (YPC). Внеклеточные, ассоциированные с клеткой и внутриклеточные фракции клеток готовили с помощью способа, модифицированного Daenen et al. 2008. В случае внеклеточной фракции, 1 мл культуры переносили в 1,5 мл пробирку типа Эппендорф (ThermoFisher), центрифугировали (4000 g, 5 мин, 4°C) и собирали супернатант. Затем все культуры доводили до достижения оптической плотности (OD) 1 при 600 нм. Клетки промывали стерильной водой и ресуспендировали в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) для сбора ассоциированной с клеткой фракции с ферментами. С целью получения внутриклеточной фракции добавляли 0,5 мг/мл

зимолиазы (ThermoFisher) с PBS и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Затем к фракциям клетки добавляли стеклянные гранулы (425-600 мкм, Sigma) и дважды перемешивали на вортексе в течение 20 секунд и держали на льду в те промежутки времени, когда не проводили перемешивание на вортексе. Затем суспензию центрифугировали (14000 g, 10 мин) и собирали супернатант с получением внутриклеточной фракции. Превращение под действием бета-глюкозидазы в каждой фракции определяли с помощью набора для анализа активности β -глюкозидазы MAK129 (Sigma Aldrich). В качестве субстрата применяли п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид (β -NPG) и химическую переменную измеряли на 405 нм спустя 20 минут инкубации при 37°C. Анализ осуществляли в 96-луночном планшете. Результаты приведены в единицах/л, где одна единица представляет собой количество фермента, который катализирует гидролиз 1,0 мкмоль субстрата в минуту при pH=7 и 37°C.

Внутриклеточную, ассоциированную с клеткой и внеклеточную активность бета-глюкозидазы измеряли у CRL-1, CRL-2, CRL19, CRL-49 и CRL-50. Наибольшая степень превращения у *D. bruxellensis* (вплоть до 74 единиц/л) была выявлена во внутриклеточной фракции CRL-19, который содержит обе ORF для бета-глюкозидазы. Напротив, в клетках с одним геном, кодирующим бета-глюкозидазу, или без таких генов, была выявлена очень малая степень превращения субстрата.

Результаты указывают на то, что DbBGL2 является более эффективным, чем DbBGL1, и предполагается, что между двумя белками может иметь место своего рода аддитивный эффект. Для внутриклеточной фракции *D. anomalus* CRL-49 была показана наиболее высокая активность среди всех тестируемых штаммов *Brettanomyces* (144 единиц/л).

Образование вкуса

С целью изучения способности *Dekkera* способствовать высвобождению ароматов хмеля, ставили два независимых эксперимента:

1) Сусло из одного солода для производства светлого пива, 16 Plato, было предоставлено Jacobsen Breweries для первичного сбраживания;

2) Также Jacobsen Breweries был предоставлен индийский светлый эль Jacobsen (IPA), и его применяли для вторичного сбраживания, с дополнительным добавлением 1,2% глюкозы для стимулирования роста.

Процедуры сбраживания осуществляли с применением штаммов CRL-1, CRL-2, CRL-19, CRL-49 и CRL-50.

Штаммы CRL размножали в вышеупомянутом сусле для производства пива пильзнер в колбах Эрленмейера на 50 мл до достижения требуемого количества клеток.

Процедуры сбраживания выполняли в двух повторах в бутылках Duran на 250 мл, содержащих 200 мл среды. Сбраживание становилось анаэробным, и для отслеживания производительности сбраживания и высвобождения CO₂ применяли ANKOM RF Gas Production System (ANKOM). Применяли норму засева 100000 живых клеток/мл, определенную путем подсчета клеток из инокулята с помощью Cellometer X2 (Nexcelom Bioscience). Образцы во время сбраживания не брали, чтобы исключить попадание воздуха. Пиво собирали, когда высвобождаемый CO₂ больше не поддавался измерению, а затем замораживали его при -20°C до проведения анализа.

Образцы, взятые в конце сбраживания, анализировали в отношении содержания монотерпеновых спиртов и сравнивали с исходным суслом. Из результатов видно, что штаммы CRL-1 (одна ORF для DbBGL) и CRL-50 (без ORF для DbBGL), которые характеризовались наиболее низкой активностью бета-глюкозидазы, обуславливали наиболее высокие концентрации β-цитронеллола, с достижением уровней вплоть до 31,5 мкг/л после сбраживания в случае CRL-50. Кроме того, CRL-2 (у которого отсутствует одна ORF и который не способен использовать мальтозу) характеризовался наиболее низкой степенью превращения гераниола в β-цитронеллол. Общую картину наблюдали для всех штаммов; содержание гераниола снижалось в сторону продукции β-цитронеллола. Линалоол превращался в α-терпинеол, но с более низкой скоростью. В соответствии со стандартными путями превращения, мирцен был полностью истощен во всех случаях, а уровень изоамилизобутирата был несколько повышен.

В коммерческое пиво сухого охмеления с добавлением 1,2% глюкозы инокулировали соответствующий штамм, повторно запечатывали в системе ANKOM и оставляли для повторного брожения на 14 суток. В этот момент времени глюкоза была истощена во всех случаях, как можно видеть по кривым накопления CO₂, и продуцировалось от 6,8 до 7,3% спирта. Абсолютные количества монотерпеновых спиртов были выше при вторичном брожении по сравнению с первичным брожением из-за сухого охмеления, применяемого в случае первичного пива (фиг. 8). Однако биоконверсия монотерпеновых спиртов происходила в той же степени, что и при первичном сбраживании. Например, как при первичном, так и при вторичном сбраживании превращению подвергалось приблизительно 25 микрограмм/л гераниола.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения напитка на основе солода и/или злаков, причем указанный способ предусматривает стадии:

- i) обеспечения водного экстракта солода и/или зерен злаков
- ii) обеспечения штамма дрожжей *Dekkera*, причем указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол при инкубации в водном растворе, содержащем п-кумаровую кислоту
- iii) сбраживания указанного водного экстракта с помощью указанных дрожжей, с получением тем самым указанного напитка на основе солода и/или злаков.

2. Способ по п. 1, в котором указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% как, например, более 20%, как, например, более 15%, как, например, более 10%, как, например, более 5%, как, например, более 1% п-кумаровой кислоты, присутствующей в водном растворе, в 4-винилфенол.

3. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей имеет генотип I и/или генотип II:

I: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего PAD

II: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего SOD.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera anomalus*, имеющий генотип I:

I: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DaPAD1 SEQ ID NO:2 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera anomalus*, и при этом указанный штамм дрожжей содержит мутантный ген *DaPAD1*, кодирующий мутантный белок DaPAD1, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 аминокислот, как, например, по меньшей мере 70 аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 аминокислот SEQ ID NO:2.

6. Способ по любому из пп. 1-3, в котором штаммом дрожжей является штамм дрожжей *Dekkera bruxellensis*, имеющий генотип I:

I: предусматривающий мутацию в гене или делецию гена, кодирующего DbPAD2 SEQ ID NO:6 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 80%, как, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

7. Способ по любому из пп. 1-3, в котором штамм дрожжей относится к виду *Dekkera bruxellensis*, и при этом указанный штамм дрожжей содержит мутантный ген DbPAD2, кодирующий мутантный белок DbPAD2, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 аминокислот, как, например, по меньшей мере 70 аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 аминокислот SEQ ID NO:6.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей:

i. относится к виду *Dekkera anomalus*, и при этом указанный штамм дрожжей содержит мутантный ген *DaSOD*, кодирующий мутантный белок *DaSOD*, в котором отсутствуют по меньшей мере 50 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 100 наиболее близких к С-концу аминокислот, как, например, по меньшей мере 150 наиболее близких к С-концу аминокислот SEQ ID NO: 4; или

ii. относится к виду *Dekkera bruxellensis*, и при этом указанный штамм дрожжей несет мутацию в гене *DbSOD*, приводящую в результате к образованию мутантного гена *DbSOD*, кодирующего мутантный белок *DbSOD*, в котором отсутствуют одна или несколько из аминокислот SEQ ID NO:8.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей не способен превращать более 20%, как, например, более 15%, как, например, более 10%, как, например, более 5%, как, например, более 1% п-кумаровой кислоты, присутствующей в водном экстракте, в 4-этилфенол.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25%, например, более 20%, как, например, более 15%, как, например, более 10%, как, например, более 5%, как, например, более 1% феруловой кислоты, присутствующей в водном экстракте, в 4-этилгваякол.

11. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25%, как, например, более 20%, как, например, более 15%, как, например, более 10%, как, например, более 5%, как, например, более 1% феруловой кислоты, присутствующей в водном растворе, в 4-винилгваякол.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный напиток на основе солода и/или злаков содержит менее 0,5 мг/л 4-этилфенола, как, например, менее 0,3 мг/л, как, например, менее 0,1 мг/л 4-этилфенола.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный напиток на основе солода и/или злаков содержит менее 1 мг/л 4-этилгваякола, как, например, менее 0,8 мг/л, как, например, менее 0,6 мг/л, как, например, менее 0,5 мг/л 4-этилгваякола.

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором водным экстрактом является сусло или получаемый при брожении напиток на основе солода и/или злаков.

15. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором штамм дрожжей не способен использовать более 2% мальтозы, присутствующей в водном экстракте.

16. Способ по любому из предыдущих пунктов, в котором указанные дрожжи также несут мутацию в одном или нескольких из следующих генов, или их делецию:

c. *MTR1*, причем ген *MTR1* кодирует белок MTR1 SEQ ID NO:10 или 16 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

d. *MTR2*, причем ген *MTR2* кодирует белок MTR2 SEQ ID NO:14 или 20 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

e. *ISOM(1)*, причем ген *ISOM(1)* кодирует белок ISOM(1) SEQ ID NO:22 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

f. *ISOM*, причем ген *ISOM* кодирует белок ISOM SEQ ID NO:12 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

g. *ISOM(2)*, причем ген *ISOM(2)* кодирует белок *ISOM(2)* SEQ ID NO:18 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

h. *MTRA3*, причем ген *MTRA3* кодирует белок *MTRA3* SEQ ID NO:26 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

i. *MTRA4*, причем ген *MTRA4* кодирует белок *MTRA4* SEQ ID NO:28 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

j. *MTRA5*, причем ген *MTRA5* кодирует белок *ISOM* SEQ ID NO:30 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей;

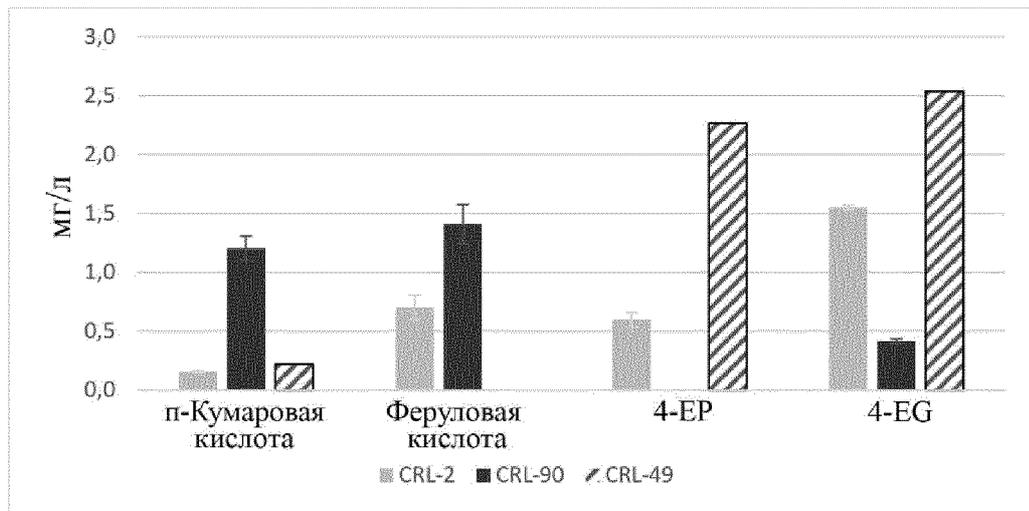
k. *MTRA6*, причем ген *MTRA6* кодирует белок *MTRA6* SEQ ID NO:32 или его функциональный гомолог, характеризующийся с ним по меньшей мере 95% идентичностью последовательностей.

17. Штамм дрожжей *Dekkera*, где указанный штамм дрожжей не способен превращать более 25% п-кумаровой кислоты в 4-этилфенол при инкубации в водном растворе, содержащем п-кумаровую кислоту.

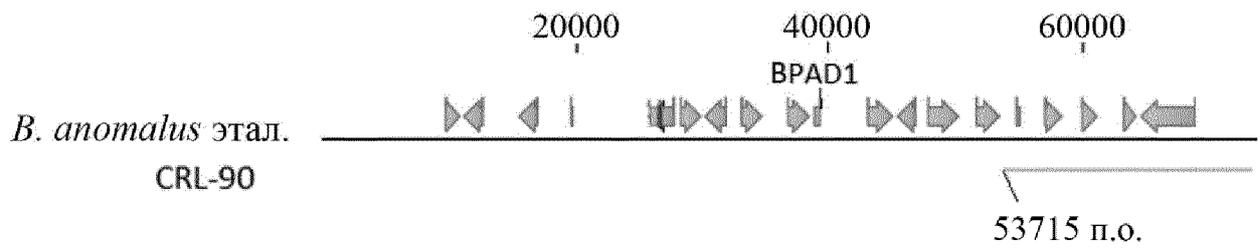
18. Штамм дрожжей по п. 17, где штамм дрожжей является таким, как определено в любом из пп. 2-11.

19. Напиток, полученный с помощью способа по любому из пп. 1-16.

a)

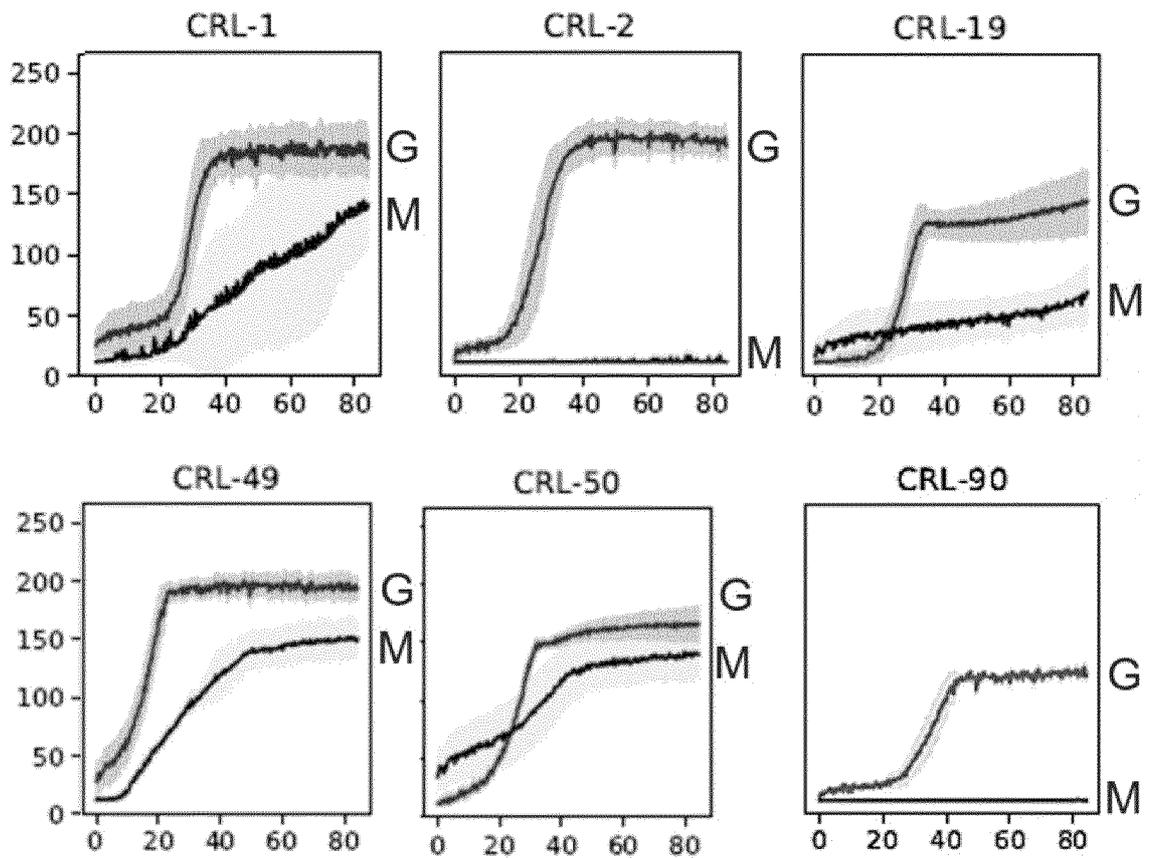


b)

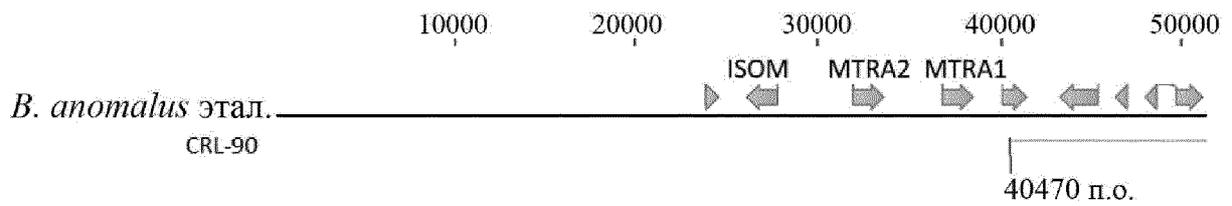


Фиг. 1

A)

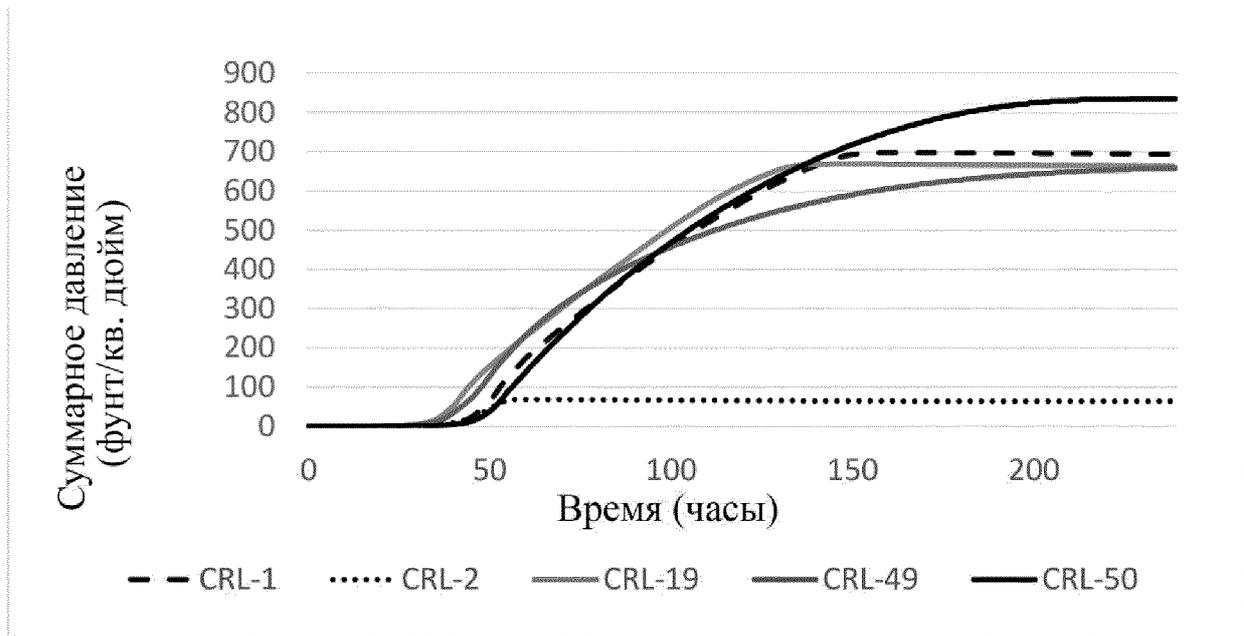


B)

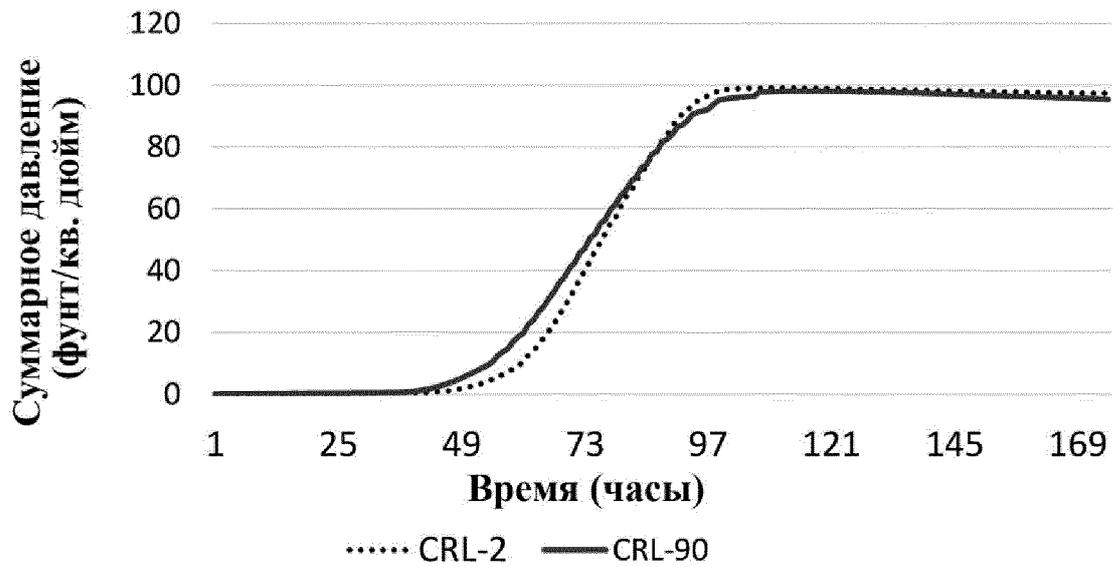


Фиг. 2

A)



B)



Фиг. 3

	1	2	3	4	5
MTRA5	1	64,64	66,21	66,61	66,21
MTRA3	2	209	87,14	88,70	88,66
MTRA1	3	199	76	92,89	93,38
MTRA4	4	197	67	42	96,79
MTRA2	5	199	67	39	19

Фиг. 4

(A)

			20		40		60		
			↓		↓		↓		
CRL-1	<	ATCGGTATCG	TTGAGGAAA	TATAGTTT	GTTTCCAA	TTGATGGGG	AAAGCGGA	AAAGAAATA	70
	<	ATCGGTATCG	TTGAGGAAA	TATAGTTT	GTTTCCAA	TTGATGGGG	AAAGCGGA	AAAGAAATA	70
	<	ATCGGTATCG	TTGAGGAAA	TATAGTTT	GTTTCCAA	TTGATGGGG	AAAGCGGA	AAAGAAATA	70
CRL-50	<	ATCGGTATCG	TTGAGGAAA	TATAGTTT	GTTTCCAA	TTGATGGGG	AAAGCGGA	AAAGAAATA	70
	<	ATCGGTATCG	TTGAGGAAA	TATAGTTT	GTTTCCAA	TTGATGGGG	AAAGCGGA	AAAGAAATA	70
CRL-19	-	ATCGGTATCG	TTGAGGAAA	TATAGTTT	GTTTCCAA	TTGATGGGG	AAAGCGGA	AAAGAAATA	70
CRL-2	-	ATCGGTATCG	TTGAGGAAA	TATAGTTT	GTTTCCAA	TTGATGGGG	AAAGCGGA	AAAGAAATA	70

(B)

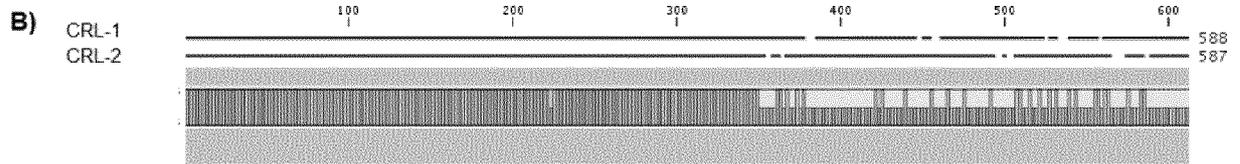
			20		40		60		
			↓		↓		↓		
CRL-1	<	MSMTEQNNSS	ASQIQGAKAD	KSHIENSAPN	QVDDQITR	LGASDEVKKG	ENNEKMPFK	AAIRAPPKA	70
	<	MSMTEQNNSS	ASQIQGAKAD	KSHIENSAPN	QVDDQITR	LGASDEVKKG	ENNEKMPFK	AAIRAPPKA	70
	<	MSMTEQNNSS	ASQIQGAKAD	KSHIENSAPN	QVDDQITR	LGASDEVKKG	ENNEKMPFK	AAIRAPPKA	70
	<	MSMTEQNNSS	ASQIQGAKAD	KSHIENSAPN	QVDDQITR	LGASDEVKKG	ENNEKMPFK	AAIRAPPKA	70
CRL-50	<	MSMTEQNNSS	ASQIQGAKAD	KSHIENSAPN	QVDDQITR	LGASDEVKKG	ENNEKMPFK	AAIRAPPKA	70
	<	MSMTEQNNSS	ASQIQGAKAD	KSHIENSAPN	QVDDQITR	LGASDEVKKG	ENNEKMPFK	AAIRAPPKA	70
	<	MSMTEQNNSS	ASQIQGAKAD	KSHIENSAPN	QVDDQITR	LGASDEVKKG	ENNEKMPFK	AAIRAPPKA	70
CRL-19	-	MSMTEQNNSS	ASQIQGAKAD	KSHIENSAPN	QVDDQITR	LGASDEVKKG	ENNEKMPFK	AAIRAPPKA	70
CRL-2	-	MNKTEQNNSS	ASQIQGAKAD	KSHIENAPN	QVDDQITR	LGASDEVKKG	ENNEKMPFK	AAIRAPPKA	70

Фиг. 5

A)

```
CRL-1 TGGTCTACAGTTTATTTGGAGAATCATGACCAGGCTAGA'
CRL-19 TGGTCTACAGTTTATTTGGAGAATCATGACCAGGCTAGA'
CRL-50 TGGTCTACAGTTTATTTGGAGAATCATGACCAGGCTAGA'
CRL-2 TGGTCTACAGTTTATTTGGA-AATCATGACCAGGCTAGA'
```

↑

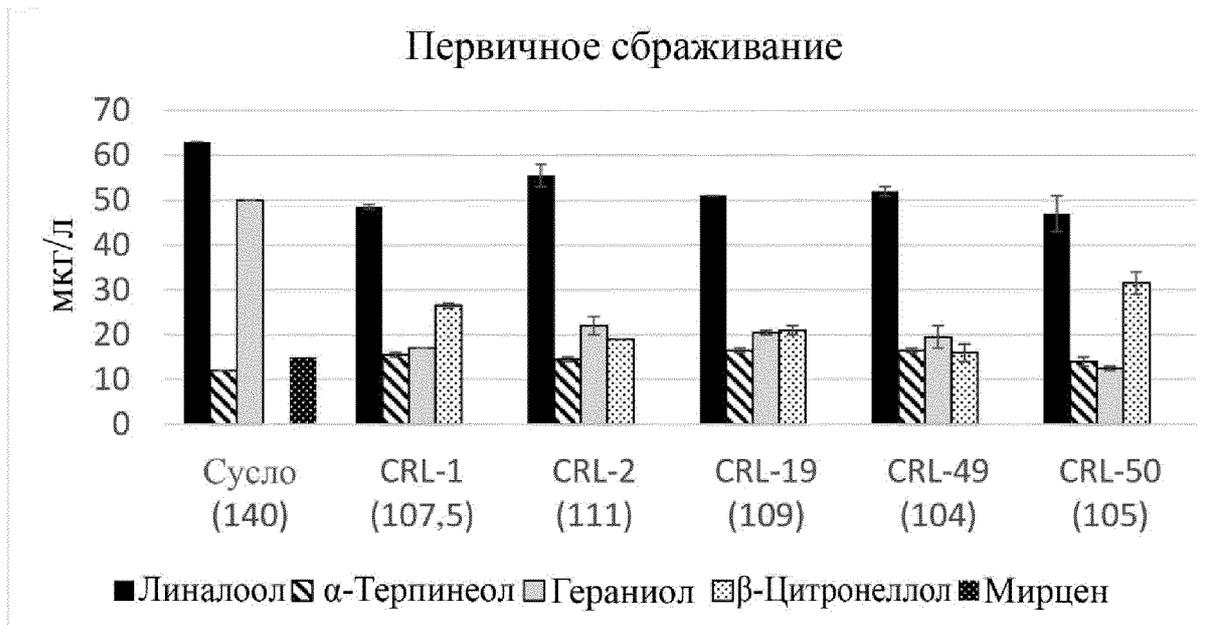


Фиг. 6

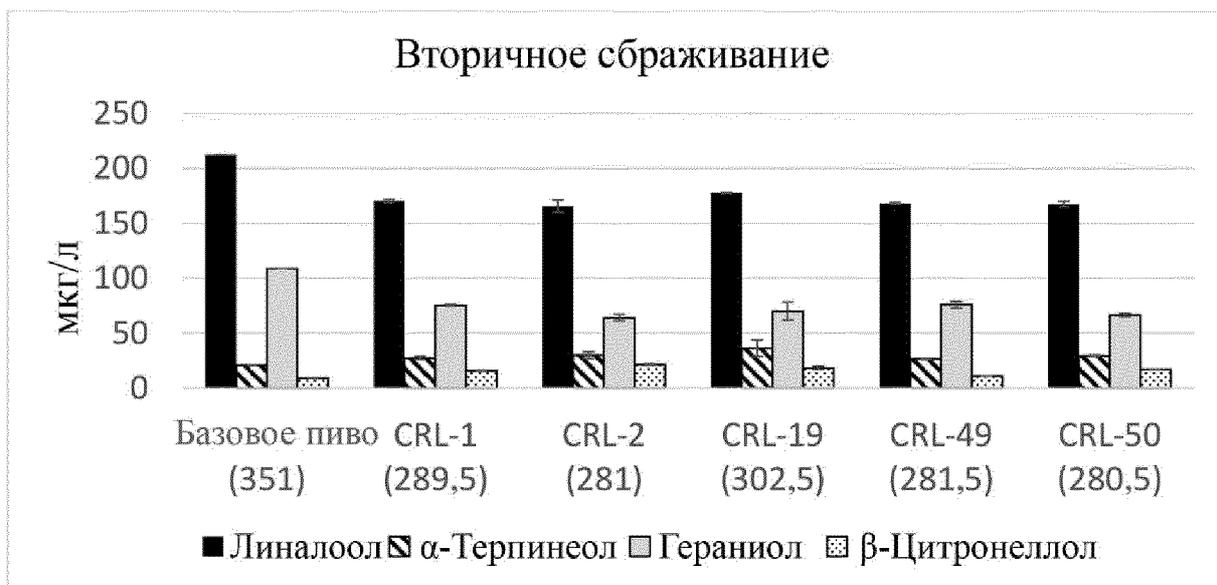


Фиг. 7

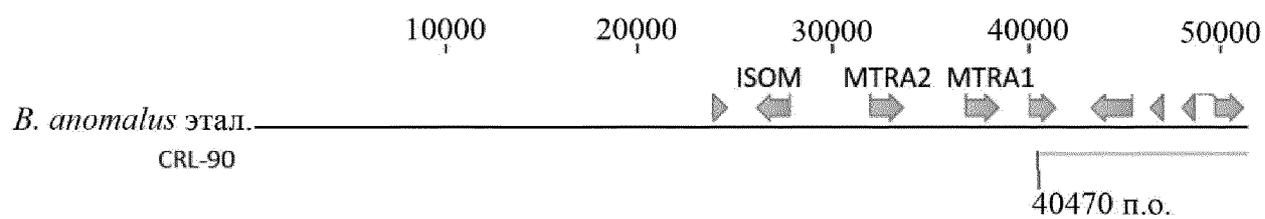
A)



B)



Фиг. 8

A)**Фиг. 9**