

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046780**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.22

(51) Int. Cl. **C12C 12/00** (2006.01)
C12R 1/86 (2006.01)

(21) Номер заявки
202293413

(22) Дата подачи заявки
2021.06.29

(54) **ДРОЖЖИ С НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ДИАЦЕТИЛА**

(31) **20183134.4**

(32) **2020.06.30**

(33) **EP**

(43) **2023.03.14**

(86) **PCT/EP2021/067882**

(87) **WO 2022/002960 2022.01.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КАРЛСБЕРГ А/С (DK)

(72) Изобретатель:
**Ленгелер Клаус, Катц Майкл, Ферстер
Йохен, Феннесси Росс, Гьермансен
Клаес, Чайлян Анна (DK)**

(74) Представитель:
**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)**

(56) **JP-A-2012217430**

WO-A1-2007097089

ZHAO-YUE WANG ET AL.: "Construction of self-cloning industrial brewing yeast with high-glutathione and low-diacetyl production", INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 43, no. 6, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 989-994, XP055306451, GB ISSN: 0950-5423, DOI: 10.1111/j.1365-2621.2007.01546.x, the whole document

WO-A1-2015005378

(57) Изобретение относится к штаммам дрожжей вида *Saccharomyces pastorianus*, обладающим полезной характеристикой продуцирования низких уровней диацетила во время ферментации. Кроме того, предлагаются способы приготовления напитков на основе солода и/или злаков с применением этих штаммов, а также напитки, полученные с помощью этого способа.

B1

046780

046780

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области производства пива и, в частности, к области производства лагерного пива. Более конкретно, изобретение обеспечивает дрожжи с низким содержанием диацетила, которые особенно полезны для быстрой и эффективной ферментации во время производства пива, в частности, при производстве лагерных сортов пива.

Предпосылки создания изобретения

Лагерные сорта пива часто характеризуются профилями свежего и чистого вкуса. Диацетил влияет на вкусовый профиль многих ферментированных продуктов. Однако его типичный маслянистый вкус считается неприятным привкусом в лагерных сортах пива, и удаление этого соединения значительно влияет на затраты времени и энергии на пивоварнях.

Лагерное пиво обычно готовят путем ферментации суслу - богатой углеводами жидкости - с помощью лагерных дрожжей. Лагерные дрожжи обычно отличаются от элевых дрожжей по нескольким параметрам. Лагерные дрожжи обычно принадлежат к виду *Saccharomyces pastorianus*. Зачастую лагерные дрожжи также называют "дрожжами низового брожения", так как они оседают на дне в процессе ферментации. Осаждение или флокуляция дрожжей также может влиять на время обработки, поскольку дрожжи должны осесть в достаточной степени, чтобы собрать их для следующего цикла пивоварения. Для лагерных дрожжей, которые не очень флокулирующие (медленно осаждаются), потребуется охлаждение, что приведет к дополнительному времени обработки. Кроме того, штаммы лагерных дрожжей, как правило, лучше всего использовать при температурах в диапазоне от 7 до 18°C. В отличие от элевых дрожжей, которые обычно относятся к виду *Saccharomyces cerevisiae*, лагерные дрожжи способны использовать мелибиозу в качестве единственного источника углерода и, как правило, не могут расти при 37°C.

Во время ферментации диацетил образуется в результате неферментативного окисления ацетолактата, продуцируемого дрожжевой клеткой, однако во время периода созревания диацетил снова поглощается дрожжевой клеткой и метаболизируется. Часть управления ферментацией предпринимается для того, чтобы гарантировать, что в готовом пиве содержание диацетила находится на уровне ниже установленного порогового значения. Проблема, связанная со снижением содержания диацетила в готовом пиве, является особенно актуальной для лагерного пива, поскольку ферментация происходит при более низкой температуре, что приводит к более медленному повторному поглощению и метаболизму диацетила лагерными дрожжами.

Нижним пределом для восприятия вкуса диацетила в пиве обычно считается 50 частей на миллиард (ppb) диацетила, и необходимость снижения концентрации диацетила до этого уровня в готовом пиве обычно прибавляет значительное количество дополнительного времени, необходимого для созревания лагерного пива, перед завершением процесса пивоварения.

Краткое описание изобретения

Как указано выше, ферментация суслу с использованием общепринятых штаммов лагерных дрожжей *Saccharomyces pastorianus* при температуре от 7 до 18°C приводит к тому, что уровни диацетила в сусле значительно превышают предел восприятия вкуса, составляющий 50 ppb. В связи с этим ранее требовалось несколько дополнительных дней созревания с помощью дрожжей для снижения этих уровней, чтобы гарантировать, что содержание диацетила в готовом пиве находится ниже установленного порогового значения.

Примечательно, что настоящее изобретение обеспечивает новые гибридные варианты штаммов дрожжей *Saccharomyces pastorianus*, которые продуцируют низкие уровни диацетила и/или быстро потребляют указанный диацетил во время ферментации при температуре 18°C или ниже, и поэтому полученному с помощью этих штаммов пиву требуется очень мало времени для созревания. В частности, при ферментации суслу с помощью штаммов дрожжей по изобретению общий уровень диацетила составляет ≤ 60 ppb, предпочтительно ≤ 50 ppb на момент завершения ферментации сахара, т.е. в момент времени во время ферментации, когда уровень сахара является более или менее стабильным. Как правило, наблюдается сокращение времени сбраживания по меньшей мере на 1 день или по меньшей мере на 2 дня по сравнению с современными лагерными штаммами.

Настоящее изобретение также обеспечивает способы производства напитков, которые требуют очень мало времени для созревания пива после ферментации при температуре 18°C или ниже, с использованием штаммов дрожжей *S. pastorianus* и которые обладают приятным вкусом.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения ферментированного водного экстракта, включающий следующие стадии:

- i) обеспечение водного экстракта солода и/или злаков;
- ii) обеспечение штамма дрожжей вида *Saccharomyces pastorianus*, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный ферментированный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила, предпочтительно не более 50 ppb диацетила в самый ранний мо-

мент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного ферментированного тестового раствора не уменьшилось на более чем $0,50^\circ$ Плато за предшествующие 24 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре 18°C или ниже, предпочтительно от 12 до 16°C ; и iii) ферментацию водного экстракта, обеспеченного на стадии i), с помощью указанного штамма дрожжей, обеспеченного на стадии ii), с получением таким образом ферментированного водного экстракта.

Используемый в настоящем документе термин "водный экстракт" используется для обозначения водного экстракта солода и/или зерен злаков, такого как сусло, который используется для приготовления напитка, например, пива, тогда как термин "тестовый раствор" используется для обозначения раствора с более строго определенным составом, который используется для оценки свойств микроорганизма, используемого для ферментации.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ приготовления напитка, включающий следующие стадии:

i) обеспечение водного экстракта солода и/или злаков;

ii) обеспечение штамма дрожжей вида *Saccharomyces pastorianus*, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила, предпочтительно не более 50 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем $0,50^\circ$ Плато за предшествующие 24 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре не более 18°C ;

iii) ферментацию водного экстракта, обеспеченного на стадии i), с помощью указанного штамма дрожжей с получением таким образом ферментированного водного экстракта и

iv) переработку указанного ферментированного водного экстракта в напиток.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ приготовления напитка, включающий следующие стадии:

i) обеспечение водного экстракта солода и/или злаков;

ii) обеспечение штамма дрожжей вида *Saccharomyces pastorianus*, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила, предпочтительно не более 50 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем $0,50^\circ$ Плато за предшествующие 24 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре не более 18°C ;

iii) ферментацию водного экстракта, обеспеченного на стадии i), с помощью указанного штамма дрожжей с получением таким образом ферментированного водного экстракта и

iv) переработку указанного ферментированного водного экстракта в напиток, при этом стадии переработки включают одно или несколько из следующего:

- 1) фильтрация,
- 2) карбонизация,
- 3) созревание или
- 4) розлив.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает штамм дрожжей, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, имеющем видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, и где указанный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила, предпочтительно не более 50 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем $0,50^\circ$ Плато за предшествующие 24 ч после инкубации указанного штамма дрожжей в указанном экстракте.

Описание чертежей

На фиг. 1 показаны уровни диацетила и $^\circ$ Плато в сусле, инкубированном с гибридным штаммом дрожжей ZDA1 и контрольным штаммом дрожжей Hybrid yeast 7 из испытания в масштабе 50 л при (A) 16°C и (B) 18°C . Фиг. 1C представляет собой тот же график, что и фиг. 1B, но только со штаммом ZDA1 и другой осью для общего диацетила при 18°C . Результаты описаны в примере 1.

На фиг. 2 показаны уровни диацетила в сусле, инкубированном с гибридными штаммами дрожжей ZDA1 и контрольным штаммом дрожжей Hybrid yeast 7 из испытания в масштабе 10 гл при 16°C (фиг. 2A). $^\circ$ Плато дополнительно показано для гибридного штамма дрожжей ZDA1 (фиг. 2B). Результаты описаны в примере 4.

На фиг. 3 показано отношение между пропанолом и изобутанолом в девяти различных коммерческих сортах пива по сравнению с пивом, приготовленным с использованием штамма дрожжей ZDA2 (89-

84393 ZDA F1) согласно настоящему изобретению. Все сорта пива имеют крепость около 5% ABV.

На фиг. 4A-F показано выравнивание белковых последовательностей ILV2 между WS34-78, ser (Saccharomyces cerevisiae), eub (Saccharomyces eubayanus), Hybrid7 (Hybrid yeast 7), ZDA1 и ZDA2.

На фиг. 5A-C показано выравнивание белковых последовательностей ILV6 между WS34-78, ser (Saccharomyces cerevisiae), eub (Saccharomyces eubayanus), Hybrid7 (Hybrid yeast 7), ZDA1 и ZDA2.

На фиг. 6A-E показано выравнивание белковых последовательностей ILV3 между WS34-78, ser (Saccharomyces cerevisiae), eub (Saccharomyces eubayanus), Hybrid7 (Hybrid yeast 7), ZDA1 и ZDA2.

На фиг. 7A-D показано выравнивание белковых последовательностей ILV5 между WS34-78, ser (Saccharomyces cerevisiae), eub (Saccharomyces eubayanus), Hybrid7 (Hybrid yeast 7), ZDA1 и ZDA2.

На фиг. 8A-E показано выравнивание белковых последовательностей BAT1 между WS34-78, ser (Saccharomyces cerevisiae), eub (Saccharomyces eubayanus), Hybrid7 (Hybrid yeast 7), ZDA1 и ZDA2.

На фиг. 9A-D показано выравнивание белковых последовательностей BAT2 между WS34-78, ser (Saccharomyces cerevisiae), eub (Saccharomyces eubayanus), Hybrid7 (Hybrid yeast 7), ZDA1 и ZDA2.

На фиг. 10 показаны уровни °Плато и диацетила в сусле, инкубированном со штаммом дрожжей ZDA2 и контрольным штаммом дрожжей Hybrid yeast 7, из испытаний в коммерческом масштабе при 16°C. Результаты описаны в примере 8.

Подробное описание

Определения

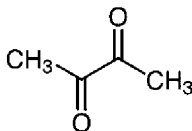
Используемые в настоящем документе формы единственного числа могут означать одно или несколько, в зависимости от контекста, в котором их применяют.

Используемый в настоящем документе термин "приблизительно" означает $\pm 10\%$, предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 2\%$.

Используемый в настоящем документе термин "пиво" относится к напитку, приготовленному путем ферментации сусла. Предпочтительно указанную ферментацию осуществляют с помощью дрожжей.

Используемый в настоящем документе термин "зеленое пиво" относится к раствору, полученному непосредственно после ферментации сусла, предпочтительно с помощью дрожжей. Таким образом, "зеленое пиво" получают перед лагированием. Другими словами, зеленое пиво представляет собой раствор, полученный сразу после завершения ферментации сахара. В общем случае, пиво больше не считается "зеленым", когда оно достигло полной зрелости вкуса и аромата.

Используемый в настоящем документе термин "диацетил" относится к химическому соединению формулы



Концентрация диацетила в образце может быть измерена с помощью газовой хроматографии в соответствии с методом Европейской пивоваренной конвенции ЕВС 9.24.2, который включает период инкубации образцов при 60°C в течение 90 минут для определения общего диацетила, который будет отражать общую сумму предшественника ацетолактата и свободного диацетила. В настоящем изобретении при описании диацетила, продуцируемого раскрытыми в настоящем документе штаммами дрожжей, термин "диацетил" относится к "общему диацетилу", если не указано иное. Таким образом, концентрация диацетила в образце относится к концентрации общего диацетила, то есть к общей сумме предшественника ацетолактата и свободного диацетила.

Применяемый в настоящем документе термин "злаки" относится к любому растению семейства злаковых, дающему съедобное зерно, такому как пшеница, просо, рис, ячмень, овес, рожь, тритикале, сорго и кукуруза.

Применяемый в настоящем документе термин "зерно" относится к семенам злаков, включающим зерновку злаков, также называемых внутренними семенами. Кроме того, зерно может содержать нижнюю цветковую чешую и верхнюю цветковую чешую. У большинства сортов ячменя нижняя цветковая чешуя и верхняя цветковая чешуя прирастают к зерновке и являются частью зерна после обмолота. Однако встречаются и голозерные сорта ячменя. У них зерновка свободна от нижней цветковой чешуи и верхней цветковой чешуи и обмолачивается свободно, как у пшеницы. Термины "зерно" и "ядро" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Под термином "сусло" подразумевают жидкий экстракт солода и/или зерен злаков и необязательно дополнительные добавки. Сусло обычно получают путем затирания, необязательно с последующим "промыванием", в процессе экстракции остаточных Сахаров и других соединений из дробины после затирания горячей водой. Промывание обычно проводят в фильтрационном чане, заторном фильтре или другом устройстве, обеспечивающем разделение экстрагируемой воды от дробины. Сусло, получаемое после затирания, как правило, обозначают как "первое сусло", тогда как сусло, получаемое после промывания, обычно обозначают как "второе сусло". Если не указано, термин "сусло" может представлять собой первое сусло, второе сусло или комбинацию обоих. При общепринятом получении пива сусло варят вместе с хмелем. Сусло без хмеля также может называться

"сладким суслом", тогда как сусло, которое варили с хмелем, может называться "вареным суслом" или просто суслом.

Используемый в настоящем документе термин "водный экстракт" относится к любому водному экстракту солода и/или зерен злаков. Таким образом, неограничивающими примерами могут быть сусла с заданным количеством ферментируемых сахаров.

Используемый в настоящем документе термин "ферментированный водный экстракт" относится к любому водному экстракту, инкубированному с микроорганизмом, таким как штамм дрожжей, где ферментация сахара завершена.

Ферментация сахара считается завершенной в тот момент времени во время ферментации, когда уровень сахара, измеренный по шкале °Плато, больше не уменьшается значительно. Предпочтительно ферментацию сахара можно считать завершенной, когда уровень сахара не изменился на более чем 0,5 °Плато в течение периода, составляющего 24 ч, или когда уровень сахара не изменился на более чем 0,25 °Плато в течение периода, составляющего 12 ч. Ферментированный водный экстракт может, например, представлять собой экстракт на основе ферментированного солода и/или злаков.

Используемый в настоящем документе термин "тестовый раствор" относится к любым водным жидкостям или растворам. Тестовый раствор может содержать заданные уровни конкретных соединений. Таким образом, неограничивающие примеры могут представлять собой сусло с заданным содержанием сахара.

Используемый в настоящем документе термин "ферментированный тестовый раствор" относится к любому тестовому раствору, инкубированному с микроорганизмом, таким как штамм дрожжей, в котором ферментация сахара завершена.

Используемый в настоящем документе термин "°Плато" относится к плотности, измеряемой по шкале Плато. Шкала Плато является эмпирически полученной ареометрической шкалой для измерения плотности пива или сусла в массовых процентах экстрактивного вещества. По шкале выражают плотность в граммах экстракта на 100 г сусла. Плато, например, можно измерить с помощью Alcolyzer или портативного устройства от Anton Paar.

"Видимое содержание экстрактивных веществ" в данном контексте относится к плотности данного пива или сусла, измеренной по шкале °Плато. Поскольку плотность в первую очередь определяется содержанием сахара, видимое содержание экстрактивных веществ является показателем содержания сахара в растворе или экстракте. Видимое содержание экстрактивных веществ раствора можно измерить, например, с помощью ручного Anton-PAAR, серийный номер DM.

Используемый в настоящем документе термин "алкоголь по объему (ABV)" относится к количеству спирта (этанола) в заданном объеме алкогольного напитка (выраженный в объемных процентах). Он определяется как количество миллилитров чистого этанола, присутствующее в 100 мл раствора при 20°C. ABV можно измерить с помощью Alcolyzer.

Используемый в настоящем документе термин "RDF" или "реальная степень ферментации" относится к степени, до которой сахар в сусле ферментируется в спирт в пиве, также называемый аттенуацией. RDF выражает процент ферментированного экстракта. RDF от 50 до 60% соответствует полнотельным сортам пива, в котором более 40% исходного экстракта осталось неферментированным, в то время как RDF выше 80% соответствует сортам пива с высокой аттенуацией, в котором менее 20% исходного экстракта не ферментировано. Ощущение во рту в значительной степени определяется процентным содержанием RDF; чем выше процент RDF, тем светлее и суше пиво.

Используемый в настоящем документе термин "флокуляция" относится к процессу, при котором мелкие частицы, такие как клетки дрожжей, слипаются в хлопья. Затем хлопья могут всплывать на поверхность жидкости (сгущение), оседать на дно жидкости (осаждение) или легко отфильтровываться от жидкости. Специалисты по дрожжам и пивовары часто классифицируют флокуляцию дрожжей как "высокую", "среднюю" или "низкую" в зависимости от степени флокуляции, наблюдаемой у штамма дрожжей в процессе ферментации. Штаммы с высокой флокуляцией могут производить более яркое пиво с меньшим количеством взвешенных дрожжей, что облегчает фильтрацию. Флокуляция может быть увеличена за счет более низких температур, поэтому для дрожжей с низкой флокуляцией может потребоваться дополнительная стадия охлаждения после завершения ферментации. Таким образом, дрожжи с высокой флокуляцией имеют возможность сократить время обработки по сравнению с дрожжами с низкой флокуляцией, поскольку для получения более светлого и легко фильтруемого пива не требуется охлаждение. Флокуляцию можно, например, определить путем подсчета количества дрожжевых клеток в растворе после ферментации, т.е. путем подсчета количества дрожжевых клеток в образце, взятом из верхней % части контейнера, содержащего ферментированный водный экстракт или тестовый раствор.

Используемый в настоящем документе термин "ферментация" относится к инкубации водного экстракта или тестового раствора с микроорганизмом, таким как штамм дрожжей.

Используемый в настоящем документе термин "солод" относится к зерновым злакам, которые ослужены. Термин "зеленый солод" относится к пророщенным зернам злаков, которые не подвергались стадии сушки в печи. В некоторых вариантах осуществления зеленый солод представляет собой молотый

зеленый солод.

Используемый в настоящем документе термин "высушенный в печи солод" относится к проросшим зернам злаков, которые были высушены путем сушки в печи. В некоторых вариантах осуществления высушенный в печи солод представляет собой измельченный высушенный в печи солод. Как правило, указанные зерна злаков проросли в контролируемых условиях окружающей среды.

Используемый в настоящем документе термин "источник углерода" относится к любой органической молекуле, которая может снабжать дрожжи энергией и углеродом для клеточного биосинтеза. В частности, указанный источник углерода может представлять собой углеводы, и более предпочтительно источником углерода могут быть моносахариды, дисахариды, трисахариды, тетрасахариды и/или короткие олигосахариды. Источники углерода, которые могут ферментироваться дрожжами, часто называют ферментируемыми сахарами, включая, но без ограничения, глюкозу, фруктозу, мальтозу, мальтотриозу и сахарозу.

Аминокислоты могут называться в настоящем документе с использованием однобуквенного и трехбуквенного кодов IUPAC. Если не указано иное, термин "аминокислота" относится к стандартным аминокислотам.

Используемый в настоящем документе термин "функциональный ген" относится к гену, который при транскрипции и трансляции экспрессирует белок, обладающий по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99%, например, 100% идентичностью последовательности белку, кодируемому соответствующим геном штамма дикого типа, где ген является эндогенным. Белок, экспрессируемый функциональным геном, должен быть функциональным гомологом белка, кодируемого соответствующим геном штамма дикого типа, при этом ген является эндогенным, т.е. он должен иметь тот же тип ферментативной активности, и указанная активность должна быть на уровне, аналогичном белку, кодируемому соответствующим геном штамма дикого типа, где ген является эндогенным. В частности, термин "функциональный ген" не охватывает гены, кодирующие укороченные белковые продукты с незначительной ферментативной активностью или без нее. Предпочтительно термин "ген", используемый в настоящем документе, относится к функциональному гену.

Используемый в настоящем документе термин "количество функциональных копий" относится к общему количеству функциональных генов в штамме дрожжей.

"Номер функциональной копии" используется в настоящем документе взаимозаменяемо с "номером активной копии".

Используемый в настоящем документе термин "функциональный гомолог" обозначает полипептид, имеющий по меньшей мере одну биологическую функцию, имеющую сходство с эталонным полипептидом. В целом указанный функциональный гомолог также имеет значительную идентичность последовательности с эталонным полипептидом. Предпочтительно функциональным гомологом эталонного полипептида является полипептид, который имеет ту же биологическую функцию, что и эталонный белок, и который имеет высокий уровень идентичности последовательности с эталонным полипептидом.

Используемый в настоящем документе термин "нативный промотор" относится к промотору, нуклеотидная последовательность которого имеет по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99%, например, 100% идентичности последовательности промотора штамма дикого типа, где ген является эндогенным. Таким образом, ген, экспрессируемый при участии своего нативного промотора, обычно экспрессируется на эндогенных уровнях.

Используемый в настоящем документе термин "идентичность последовательностей" описывает родство между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями, то есть последовательностью-кандидатом (например, мутантной последовательностью) и эталонной последовательностью (такой как последовательность дикого типа) на основе их попарного выравнивания. Для целей настоящего изобретения идентичность последовательностей для двух аминокислотных последовательностей определяют с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), реализованного в программе Needle из пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277.), предпочтительно версии 5.0.0 или более поздней (доступно на https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Используемыми параметрами являются штраф за открытие гэпа 10, штраф за продолжение гэпа 0,5 и матрица замен EBLOSUM62 (версия EMBOSS 30 BLOSUM62). Выводимые данные в Needle, помеченные как "наиболее длинный идентичный участок" (полученные с применением опции -nobrief), применяют в качестве процента идентичности и рассчитывают следующим образом:

$(\text{Идентичные остатки} \times 100) / (\text{Длина выравниваемого участка} - \text{Общее число гэпов в выравниваемом участке})$.

Алгоритм Нидлмана-Вунша также используется для определения того, соответствует ли данная аминокислота в последовательности, отличной от эталонной последовательности, заданному положению эталонной последовательности. Для целей настоящего изобретения идентичность последовательностей

для двух нуклеотидных последовательностей определяют с применением алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, см. выше), реализованного в программе Needle из пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), предпочтительно версии 5.0.0 или более поздней. Используемыми параметрами являются: штраф за открытие гэпа 10, штраф за продолжение гэпа 0,5 и матрица замен DNAFULL (версия EMBOSS NCBI NUC4.4). Выводимые данные в Needle, помеченные как "наиболее длинный идентичный участок" (полученные с применением опции -nobrief), применяют в качестве процента идентичности и рассчитывают следующим образом: (Идентичные дезоксирибонуклеотиды × 100)/(Длина выравниваемого участка - Общее число гэпов в выравниваемом участке). Идентичность последовательности всегда оценивают по сравнению с полноразмерной эталонной последовательностью, т.е. укороченные белки без пробелов или несоответствий не считаются на 100% идентичными эталонной последовательности.

Используемый в настоящем документе термин "мутации" включает вставки, делеции, замены, трансверсии и точечные мутации в кодирующих и не кодирующих областях гена. Точечные мутации могут затрагивать изменения одной пары оснований и могут приводить к образованию преждевременных стоп-кодонов, мутаций со сдвигом рамки считывания, мутациям сайта сплайсинга или заменам аминокислот. Ген, содержащий мутацию, может называться "мутантным геном". Если указанный мутантный ген кодирует полипептид с последовательностью, отличной от последовательности 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.

Используемый в настоящем документе термин "делеции" может означать делецию всего гена, или только части гена, или части хромосомы.

Термин "стоп-кодон", используемый в настоящем документе, относится к триплету нуклеотидов в генетическом коде, который в мРНК приводит к терминации трансляции. Термин "стоп-кодон", используемый в настоящем документе, также относится к триплету нуклеотидов в гене, кодирующем стоп-кодон в мРНК. Стоп-кодон в ДНК обычно имеет одну из следующих последовательностей: TAG, TAA или TGA.

Термин "рост", используемый в настоящем документе в отношении дрожжей, относится к процессу, при котором дрожжевые клетки размножаются. Таким образом, если дрожжевые клетки растут, количество дрожжевых клеток увеличивается. Количество дрожжевых клеток может быть определено любым пригодным способом. Используемый в настоящем документе термин "способный к использованию" относится к способности дрожжей использовать конкретное соединение в качестве источника углерода и/или азота для клеточного биосинтеза.

Штамм дрожжей

Настоящее изобретение относится к штамму дрожжей, такому как штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus*, который неожиданно продуцирует низкие уровни общего диацетила и/или быстро потребляет диацетил во время ферментации при температуре 18°C или ниже при инкубации в экстракте солода и/или злаков, имеющем видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато.

Для производства пива используются различные виды дрожжей, самые известные из которых *Saccharomyces pastorianus* и *Saccharomyces cerevisiae*. Лагерное пиво обычно ферментируют с использованием дрожжей вида *Saccharomyces pastorianus*. Таким образом, *Saccharomyces pastorianus* по изобретению могут представлять собой, например, любые дрожжи, пригодные для производства лагерного пива. В частности, *Saccharomyces pastorianus* могут являться штаммом дрожжей низового брожения. Предпочтительно, чтобы вид *Saccharomyces pastorianus* представлял собой гибрид между *S. cerevisiae* и *S. eubayanus*. Также предпочтительно, чтобы указанный вид *Saccharomyces pastorianus* был способен утилизировать мальтозу и мелибиозу. Таким образом, *Saccharomyces pastorianus* предпочтительно представляет собой штамм дрожжей, представляющий собой гибрид между *S. cerevisiae* и *S. eubayanus*. Также предпочтительно, чтобы указанный штамм *Saccharomyces pastorianus* был способен утилизировать мальтозу и мелибиозу.

В одном аспекте штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, при этом тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, и где указанный ферментированный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила, предпочтительно не более 50 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,50° Плато за предшествующие 24 ч после инкубации указанного штамма дрожжей в указанном экстракте, при этом указанная ферментация происходит при температуре не более 18°C.

Таким образом, штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* согласно изобретению предпочтительно способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при тестировании способом, включающим следующие стадии:

а) обеспечение тестового раствора, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато,

б) инкубацию указанного штамма дрожжей *Saccharomyces pastorianus* с указанным тестовым раствором при температуре 18°C или ниже, предпочтительно от 12 до 18°C, более предпочтительно при 16°C,

в) определение самого раннего момента времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,50° Плато за предшествующие 24 ч во время указанной инкубации и

г) определение уровня диацетила в указанный самый ранний момент времени, при этом указанный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила, предпочтительно не более 50 ppb диацетила в указанный самый ранний момент времени.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации с указанным штаммом дрожжей в тестовом растворе, где тестовый раствор может представлять собой любой из тестовых растворов, описанных ниже, предпочтительно тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, и где ферментированный тестовый раствор содержит максимальный уровень диацетила, как описано ниже, в самый ранний момент времени, где видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,50° Плато, например, не уменьшилось на более чем 0,40° Плато, например, не уменьшилось на более чем 0,30° Плато, например, не уменьшилось на более чем 0,20° Плато за предшествующие 24 ч после инкубации с указанным штаммом дрожжей в указанном тестовом растворе, при этом указанная ферментация происходит при температуре, указанной ниже. В частности, видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,50° Плато за предшествующие 24 ч.

Указанный максимальный уровень содержания диацетила предпочтительно составляет не более 60 ppb, например не более 55 ppb диацетила, например не более 50 ppb диацетила, например не более 45 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем вышеупомянутое значение °Плато. В частности, указанный уровень диацетила в указанный самый ранний момент времени может составлять не более 45 ppb.

При определении свойств дрожжей, как описано выше, инкубацию предпочтительно проводят при температуре не более 18°C, например при температуре в диапазоне от 12 до 18°C или в диапазоне от 14 до 16°C. В частности, указанную инкубацию можно проводить при температуре приблизительно 16°C.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, имеющем видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, и где указанный ферментированный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила, предпочтительно не более 50 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,25° Плато за предшествующие 12 ч после инкубации указанного штамма дрожжей в указанном экстракте, при этом указанная ферментация происходит при температуре не выше 18°C.

Таким образом, штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* согласно изобретению предпочтительно способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при тестировании в способе, включающем следующие стадии:

а) обеспечение тестового раствора, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато,

б) инкубацию указанного штамма дрожжей *Saccharomyces pastorianus* с указанным тестовым раствором при температуре не выше 18°C,

в) определение самого раннего момента времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,25° Плато за предшествующие 12 ч во время указанной инкубации и

г) определение уровня диацетила в указанный самый ранний момент времени, при этом указанный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила, предпочтительно не более 50 ppb диацетила в указанный самый ранний момент времени.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, где тестовый раствор может представлять собой любой из тестовых растворов, описанных ниже, и где ферментированный тестовый раствор содержит максимальный уровень диацетила, как описано ниже, в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,25° Плато, например, не уменьшилось на более чем

0,20° Plato, например не уменьшилось на более чем 0,15° Plato, например не уменьшилась на более чем 0,10° Plato за предшествующие 24 ч после инкубации указанного штамма дрожжей в указанном экстракте, при этом указанная ферментация происходит при температуре, указанной ниже. В частности, видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилась на более чем 0,25° Plato за предшествующие 12 ч.

Указанный максимальный уровень содержания диацетила предпочтительно составляет не более 60 ppb диацетила, например, не более 55 ppb диацетила, например, не более 50 ppb диацетила, например, не более 45 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем вышеупомянутое значение °Plato. В частности, указанный максимальный уровень диацетила в указанный самый ранний момент времени может составлять 50 ppb.

Вышеупомянутую инкубацию предпочтительно проводят при температуре не более 18°C, например, при температуре в диапазоне от 12 до 18°C. В частности, указанную инкубацию можно проводить при температуре приблизительно 16°C.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° по Plato, где указанный тестовый раствор содержит не более 120 ppb диацетила, например, не более 60 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,50° Plato в течение последующих 24 ч, где указанная ферментация происходит при температуре не выше 18°C.

Таким образом, штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* согласно изобретению предпочтительно способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при тестировании в способе, включающем следующие стадии:

- a) обеспечение тестового раствора, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Plato,
- b) инкубацию указанного штамма дрожжей *Saccharomyces pastorianus* с указанным тестовым раствором при температуре не выше 18°,
- c) определение самого раннего момента времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,50° Plato в течение последующих 24 ч во время указанной инкубации, и
- d) определение уровня диацетила в указанный самый ранний момент времени, при этом указанный тестовый раствор содержит не более 120 ppb диацетила, например не более 60 ppb диацетила в указанный самый ранний момент времени.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, где тестовый раствор может представлять собой любой из тестовых растворов, описанных ниже, и где ферментированный тестовый раствор содержит максимальный уровень диацетила, как описано ниже, в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,50° Plato, например, не уменьшается на более чем 0,40° Plato, например, не уменьшается на более чем 0,30° Plato, например, не уменьшается на более чем 0,20° Plato в течение последующих 24 ч после инкубации указанного штамма дрожжей в указанном экстракте, при этом указанная ферментация происходит при температуре, указанной ниже. В частности, видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,50° Plato в последующие 24 ч.

Указанный максимальный уровень диацетила предпочтительно составляет не более 120 ppb диацетила, например, не более 115 ppb диацетила, например, не более 110 ppb диацетила, например, не более 60 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем вышеупомянутое значение °Plato. В частности, указанный максимальный уровень диацетила в указанный самый ранний момент времени может составлять 110 ppb. В частности, указанный максимальный уровень диацетила в указанный самый ранний момент времени может составлять 55 ppb.

Вышеупомянутую инкубацию предпочтительно проводят при температуре не более 18°C, например, при температуре в диапазоне от 12 до 18°C. В частности, указанную инкубацию можно проводить при температуре приблизительно 16°C.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Plato, где указанный тестовый раствор содержит не более 120 ppb диацетила, например не более 65 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание

экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,25° Плато в течение следующих 12 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре не выше 18°C.

Таким образом, штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* согласно изобретению предпочтительно способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при тестировании в способе, включающем следующие стадии:

a) обеспечение тестового раствора, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато,

b) инкубацию указанного штамма дрожжей *Saccharomyces pastorianus* с указанным тестовым раствором при температуре не выше 18°,

c) определение самого раннего момента времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,25° Плато в течение следующих 12 ч во время указанной инкубации, и

d) определение уровня диацетила в указанный самый ранний момент времени, при этом указанный тестовый раствор содержит не более 120 ppb диацетила, например, не более 65 ppb диацетила в указанный самый ранний момент времени.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, при этом тестовый раствор может представлять собой любой из тестовых растворов, описанных ниже, и при этом ферментированный тестовый раствор содержит максимальный уровень диацетила, как описано ниже, в самый ранний момент времени, где видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,25° Плато, например, не уменьшается на более чем 0,20° Плато, например, не уменьшается на более чем 0,15° Плато, например, не уменьшается на более чем 0,10° Плато в течение следующих 12 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре, указанной ниже. В частности, видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,25° Плато в течение следующих 12 ч.

Указанный максимальный уровень диацетила предпочтительно составляет не более 120 ppb диацетила, например, не более 115 ppb диацетила, например, не более 110 ppb диацетила, например, не более 105 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем вышеупомянутое значение °Плато. В частности, указанный максимальный уровень диацетила в указанный самый ранний момент времени может составлять 110 ppb, например, не более 55 ppb диацетила.

Вышеупомянутую инкубацию предпочтительно проводят при температуре не более 18°C, например, при температуре в диапазоне от 12 до 18°C. В частности, указанную инкубацию можно проводить при температуре приблизительно 16°C.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, и при этом указанный тестовый раствор содержит не более 265 ppb диацетила в любой момент времени в течение 5 дней после начала инкубации с дрожжами, где инкубацию проводят при температуре не более 18°C и где к указанному тестовому раствору добавляют от 7 до 15 млн жизнеспособных клеток дрожжей/мл.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, и где указанный ферментированный тестовый раствор содержит не более 50 ppb диацетила после инкубации с указанным штаммом дрожжей в течение не более 6 дней. В частности, указанный ферментированный тестовый раствор может содержать не более 50 ppb диацетила после инкубации с указанным штаммом дрожжей в течение не более 5 дней. В частности, указанный ферментированный тестовый раствор может содержать не более 50 ppb диацетила после инкубации с указанным штаммом дрожжей в течение не более 4 дней.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, и где указанный тестовый раствор содержит не более 50 ppb диацетила после инкубации с указанным тестовым раствором в течение не более 5 дней при температуре не более 16°C. В частности, указанный ферментированный тестовый раствор может содержать не более 50 ppb диацетила после инкубации с указанным штаммом дрожжей в течение не более 4 дней при температуре не более 16°C.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом

растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, и где указанный штамм дрожжей способен продуцировать по меньшей мере 4,0 мл/л этанола на °Плато при инкубации указанного штамма дрожжей в указанном тестовом растворе.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, и где указанный штамм дрожжей способен продуцировать по меньшей мере 4,0 мл/л этанола на °Плато при инкубации указанного штамма дрожжей в указанном тестовом растворе в течение от 4 до 6 дней. В частности, указанный штамм дрожжей можно инкубировать в указанном тестовом растворе в течение примерно 4 дней.

В очень предпочтительном варианте осуществления штамм дрожжей представляет собой штамм дрожжей, способный

продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный ферментированный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,50° Плато за предшествующие 24 ч;

продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный ферментированный раствор содержит не более 60 ppb диацетила, предпочтительно не более 50 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,25° Плато за предшествующие 12 ч;

продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный ферментированный тестовый раствор содержит не более 120 ppb диацетила, например, не более 60 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,50° Плато в течение следующих 24 ч; и

продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный ферментированный тестовый раствор содержит не более 120 ppb диацетила, например, не более 60 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,25° Плато в течение следующих 12 ч;

при этом ферментация происходит, как описано в настоящем документе в примере 6.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей обладает высокой флокуляцией. Флокуляция может быть определена, например, как клетки в суспензии после ферментации. "Клетки в суспензии" обычно определяют путем подсчета клеток дрожжей в образце, взятом из верхней 3/4, например, из верхней 2/3, например, из верхней половины контейнера, содержащего ферментированный тестовый раствор. Если ферментацию проводят в коническом цилиндрическом резервуаре, указанный образец предпочтительно берут над конусом. Низкое количество клеток в растворе после ферментации указывает на высокую флокуляцию.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, и где указанный тестовый раствор содержит не более 10 млн клеток на миллилитр, например не более 9,5 млн клеток на миллилитр, например не более 9,0 млн клеток на миллилитр, например не более 8,5 млн клеток на миллилитр, например не более 8,0 млн клеток на миллилитр в растворе, в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,50° Плато за предшествующие 24 ч.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* способен расти на среде с мелибиозой в качестве единственного источника углерода.

В предпочтительных вариантах осуществления описанный в настоящем документе штамм дрожжей представляет собой не-ГМО организм. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления указанный штамм дрожжей не подвергался стадии генетического конструирования.

Тестовый раствор

В некоторых вариантах осуществления тестовый раствор представляет собой сусло с видимым со-

держанием экстрактивных веществ приблизительно 16° Плато. В некоторых вариантах осуществления тестовый раствор содержит по меньшей мере 40 г/кг мальтозы.

Тестовый раствор, как правило, представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато. Таким образом, тестовый раствор может, в частности, представлять собой сусло. Тестовый раствор предпочтительно может иметь видимое содержание экстрактивных веществ в диапазоне от 12 до 18° Плато и, более предпочтительно, видимое содержание экстрактивных веществ приблизительно 16° Плато. Тестовый раствор может дополнительно содержать цинк в диапазоне от 0,20 до 0,40 мг/л, и значение pH может быть отрегулировано в диапазоне от 4,0 до 6,0.

Один из примеров тестового раствора содержит глюкозу в диапазоне 12-25 г/л, мальтозу в диапазоне 60-80 г/л, мальтотриозу в диапазоне 15-20 г/л, цинк в диапазоне от 0,20 мг/л до 0,40 мг/л, свободный альфа-аминоазот (FAN) в диапазоне 110-250 мг/л и соотношение валин/FAN от 0,6 до 0,8.

В некоторых вариантах осуществления тестовый раствор готовят из солода пилснер, возможно, с добавлением ячменной добавки.

Генотип

Штаммы дрожжей *Saccharomyces pastorianus* в соответствии с изобретением имеют фенотип, согласно которому они способны продуцировать ферментированный тестовый раствор с пониженным уровнем диацетила, как описано выше в разделе под заголовком "штамм дрожжей".

В дополнение к указанной фенотипической характеристике штаммы дрожжей в соответствии с изобретением предпочтительно могут иметь один или несколько генотипов, описанных в настоящем документе ниже.

ILV2, ILV6, ILV5, ILV3, BAT1 и BAT2 участвуют в синтезе L-валина из пирувата. В этом процессе может происходить спонтанное образование диацетила.

Малая субъединица ацетолактатсинтазы (ILV6) и каталитическая субъединица ацетолактатсинтазы (ILV2) превращают пируват в альфа-ацетолактат.

Кетол-кислотная редуктоизомераза (ILV5) катализирует превращение альфа-ацетолактата в 2,3-гидрокси-изовалерат.

Дигидрокси-кислотная дегидратаза (ILV3) катализирует превращение 2,3-гидроксиизовалерата в 2-кетоиозалатерат.

Аминотрансфераза разветвленных аминокислот (BAT1) катализирует превращение 2-кетоиозалатерата в L-валин в митохондриях, и аминотрансфераза разветвленных аминокислот (BAT2) катализирует указанную реакцию в цитозоле.

Расположение хромосом:

Ген	Хромосома	Начало-конец
<i>ILV2</i>	13	484084..486147
<i>ILV6</i>	3	104619..105548
<i>ILV5</i>	12	838066..839253
<i>ILV3</i>	10	464451..466208
<i>BAT1</i>	8	517532..518713
<i>BAT2</i>	10	705744..706874

Сходство белков *S. Cerevisiae* и *S. eubayanus* (последовательности белков)

	Идентичность последовательности %	Длина аминокислотной (aa) последовательности
<i>ILV2</i>	93,17	688
<i>ILV6</i>	95,81	310
<i>ILV5</i>	96,97	396
<i>ILV3</i>	96,76	586
<i>BAT1</i>	94,42	394
<i>BAT2</i>	90,45	377

Понятно, что, когда клетка дрожжей "имеет" точное количество генов, указанная клетка не содер-

жит больше генов, чем указанное количество. Точно так же, если клетка дрожжей "имеет" гены в диапазоне от XX до YY, указанная клетка дрожжей не содержит более YY генов.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* имеет не более пяти генов, кодирующих функциональный ILV2, например, не более 4 генов, кодирующих функциональный ILV2, например, в диапазоне от 1 до 5 генов, кодирующих функциональный ILV2, например, в диапазоне от 1 до 4 генов, кодирующих функциональный ILV2, где каждый ген, кодирующий ILV2, кодирует ScILV2 с SEQ ID NO: 32 или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с ним, или кодирует SeILY2 с SEQ ID NO: 38 или гомолог, обладающий по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с ним. Предпочтительно, чтобы штамм дрожжей по изобретению имел не более двух функциональных генов, кодирующих ILV2, например, штамм дрожжей может иметь от 1 до 2, например, ровно 2 функциональных гена, кодирующих ILV2. Предпочтительно указанные функциональные гены кодируют ScILV2 с SEQ ID NO: 32 или SeILV2 с SEQ ID NO: 38, или функциональный гомолог любого из вышеупомянутых, обладающий по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с ними. В одном варианте осуществления указанные функциональные гены кодируют ScILV2, предпочтительно ScILV с SEQ ID NO: 32. В одном варианте осуществления указанные функциональные гены кодируют ILV2 ZDA1, ZDA2 и/или ZDA3, при этом последовательности ILV2 ZDA1, ZDA2 и/или ZDA3 представлены на фиг. 4.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей имеет не более двух функциональных генов, кодирующих ILV2, при этом каждый ген, кодирующий ILV2, кодирует ScILV2 с SEQ ID NO: 32 или SeILY2 с SEQ ID NO: 38, или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними; по меньшей мере четыре функциональных гена, кодирующих ILV3, например, по меньшей мере пять функциональных генов, кодирующих ILV3, например, по меньшей мере шесть функциональных генов, кодирующих ILV3, где каждый ген, кодирующий ILV3, кодирует ScILV3 с SEQ ID NO: 35 или SeILV3 с SEQ ID NO: 41, или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними; и по меньшей мере три функциональных гена, кодирующих ILV5, например, по меньшей мере четыре функциональных гена, кодирующих ILV5, например, по меньшей мере пять функциональных генов, кодирующих ILV5, где каждый ген, кодирующий ILV5, кодирует ScILV5 с SEQ ID NO: 34 или SeILV5 с SEQ ID NO: 40, или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей имеет не более двух функциональных генов, кодирующих ILV2, где каждый ген, кодирующий ILV2, кодирует ScILV2 с SEQ ID NO: 32 или SeILV2 с SEQ ID NO: 38, или функциональный гомолог любого из вышеупомянутых, обладающий по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с ними; и в диапазоне от 5 до 9 функциональных генов, кодирующих ILV3, например, в диапазоне от 5 до 7, например, 6 функциональных генов, кодирующих ILV3, где каждый ген, кодирующий ILV3, кодирует ScILV3 с SEQ ID NO: 35 или SeILV3 с SEQ ID NO: 41, или функциональный гомолог любого из вышеупомянутых, обладающий по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с ними; и в диапазоне от 4 до 8 функциональных генов, кодирующих ILV5, например, в диапазоне от 4 до 6, например, 5 функциональных генов, кодирующих ILV5, где каждый ген, кодирующий ILV5, кодирует ScILV5 с SEQ ID NO: 34 или SeILV5 с SEQ ID NO: 40, или функциональный гомолог любого из вышеупомянутых, обладающий по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с ними.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* имеет не более четырех генов, кодирующих функциональный ILV6, например, в диапазоне от двух до четырех генов, кодирующих функциональный ILV6, где каждый ген, кодирующий ILV6, кодирует ScILV6 с SEQ ID NO: 33 или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с ним, или кодирует SeILV6 с SEQ ID NO: 39 или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 98% идентичностью последовательности с ним.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* имеет по меньшей мере два гена, кодирующих функциональный ILV5, например, по меньшей мере четыре гена, кодирующих функциональный ILV5, например, по меньшей мере пять генов, кодирующих функциональный ILV5, где каждый ген, кодирующий ILV5, кодирует ScILV5 с SEQ ID NO: 34 или функциональный гомо-

шеупомянутых.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* имеет по меньшей мере четыре гена, кодирующих функциональный BAT2, например, по меньшей мере пять генов, кодирующих функциональный BAT2, например, по меньшей мере шесть генов, кодирующих функциональный BAT2, где каждый ген, кодирующий функциональный BAT2, кодирует ScBAT2 с SEQ ID NO: 37 или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 98%-99% идентичностью последовательности с ним, или кодирует SeBAT2 с SEQ ID NO: 43 или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 98%-99% идентичностью последовательности с ним. В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* имеет не более 20 генов, например, не более 15 генов, например, не более 10 генов, кодирующих функциональный BAT2, при этом ген, кодирующий функциональный BAT2, может представлять собой любой из вышеупомянутых. В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* имеет от 5 до 20 генов, например, от 5 до 15 генов, например, от 5 до 10 генов, кодирующих функциональный BAT2, при этом каждый ген, кодирующий функциональный BAT2, может представлять собой любой из вышеупомянутых.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* несет мутацию или делецию одного или нескольких генов ILV2.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* несет мутацию сдвига рамки считывания в одном или нескольких генах ILV2.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* несет мутацию, приводящую к снижению или отсутствию экспрессии одного или нескольких генов ILV2.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* несет мутацию или делецию одного или нескольких генов ILV6.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* несет мутацию сдвига рамки считывания в одном или нескольких генах ILV6.

В некоторых вариантах осуществления штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* несет мутацию, приводящую к снижению или отсутствию экспрессии одного или нескольких генов ILV6.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сумма генов, кодирующих функциональный ILV2 и функциональный ILV6, меньше, чем сумма генов, кодирующих функциональный ILV5 и функциональный ILV3, при этом указанные функциональные ILV2, ILV6, ILV3 и ILV5 могут представлять собой любые из вышеупомянутых. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сумма генов, кодирующих функциональный ILV2, меньше, чем сумма генов, кодирующих функциональный ILV5 и функциональный ILV3, при этом указанные функциональные ILV2, ILV5 и ILV3 могут представлять собой любые из вышеупомянутых. В одном варианте осуществления сумма генов, кодирующих функциональный ILV2 и функциональный ILV6, меньше, чем сумма генов, кодирующих функциональный ILV5, функциональный ILV3, функциональный BAT1 и функциональный BAT2, где указанные функциональные ILV2, ILV6, ILV3, ILV5; BAT1 и BAT2 могут представлять собой любые из вышеупомянутых. Другими словами, в некоторых вариантах осуществления сумма генов, кодирующих ILV5 и ILV3, выше, чем сумма генов, кодирующих ILV2 и ILV6. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сумма генов, кодирующих ILV5 и ILV3, выше, чем сумма генов, кодирующих ILV2, ILV6, BAT1 и BAT2.

В некоторых вариантах осуществления отношение генов ILV5 и ILV3 к генам ILV2 составляет по меньшей мере 1, например, по меньшей мере 1,5, например, по меньшей мере 2, например, по меньшей мере 2,5, например, по меньшей мере 3, при этом указанные гены ILV2, ILV5 и ILV3 кодируют любой из вышеупомянутых функциональных ILV2, ILV5 и ILV3 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления отношение генов ILV5 и ILV3 к генам ILV2 и ILV6 составляет по меньшей мере 1, например, по меньшей мере 1,2, например, по меньшей мере 1,4, например, по меньшей мере 1,6, например, по меньшей мере 1,8 или, например, по меньшей мере 1,8 по меньшей мере 2, где указанные гены ILV2, ILV6, ILV5 и ILV3 кодируют любой из вышеупомянутых функциональных ILV2, ILV6, ILV5 и ILV3 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления отношение генов ILV5, ILV3, BAT1 и BAT2 к ILV2 составляет по меньшей мере 1, например, по меньшей мере 1,5, например, по меньшей мере 2, например, по меньшей мере 2,5, например, по меньшей мере 3, например, по меньшей мере 4, например по меньшей мере 5, например по меньшей мере 6, где указанные гены ILV2, ILV5, ILV3, BAT1 и BAT2 кодируют любой из вышеупомянутых функциональных ILV2, ILV5, ILV3, BAT1 и BAT2 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления отношение генов ILV5, ILV3, BAT1 и BAT2 к ILV2 и ILV6 составляет по меньшей мере 1, например, по меньшей мере 1,5, например, по меньшей мере 2, например, по меньшей мере 2,5, например, по меньшей мере 3, например, по меньшей мере 4, где указанные гены ILV2, ILV6, ILV5, ILV3, BAT1 и BAT2 кодируют любой из вышеупомянутых функциональных ILV2, ILV6, ILV5, ILV3, BAT1 и BAT2 соответственно.

Ферментированный водный экстракт на основе солода и/или злаков и способы его получения

Изобретение обеспечивает штаммы дрожжей *Saccharomyces pastorianus*, описанные выше в разделе под заголовком "штамм дрожжей", а также способы приготовления ферментированного водного экстракта на основе солода и/или злаков с использованием указанных штаммов дрожжей.

Одним из аспектов изобретения является обеспечение способов получения ферментированного водного экстракта, при этом указанный способ включает следующие стадии:

- i) обеспечение водного экстракта солода и/или злаков;
- ii) обеспечение штамма дрожжей, где указанный штамм дрожжей может представлять собой любой из штаммов дрожжей, описанных выше в разделе "Штамм дрожжей"; и
- iii) ферментацию водного экстракта, обеспеченного на стадии i), с помощью указанного штамма дрожжей, обеспеченного на стадии ii), тем самым получая ферментированный водный экстракт.

Водный экстракт может представлять собой любой водный экстракт солода и/или зерен злаков. Таким образом, неограничивающим примером является сусло. Водный экстракт может быть, например, получен путем приготовления экстракта солода путем затирания и необязательно промывания, как описано в настоящем документе в этом разделе ниже.

Солод относится к зерновым злакам, например, зерна ячменя, которые были осоложены. Под термином "соложение" следует понимать процесс, включающий замачивание и проращивание зерен в процессе, происходящем в контролируемых условиях окружающей среды, за которым необязательно следует стадия сушки. Указанная стадия сушки может предпочтительно представлять собой сушку проросших зерен в печи при повышенных температурах. Можно также использовать зеленый солод, не подвергавшийся сушке в печи, в частности солод, полученный способом, описанным в WO 2018/001882. Соложение важно для синтеза многочисленных ферментов, которые вызывают модификацию зерен, процессы которой в первую очередь деполимеризуют крахмал и клеточные стенки погибшего эндосперма с мобилизацией питательных веществ зерен и активируют другие деполимеразы. В последующем процессе сушки вкус и цвет формируются, по меньшей мере частично, благодаря химическим реакциям потемнения.

Замачивание можно проводить любым общепринятым способом, известным специалисту в данной области. Один не ограничивающий пример включает замачивание при температуре в диапазоне от 10 до 25°C с чередованием сухих и влажных условий. Проращивание может быть выполнено любым обычным способом, известным специалисту в данной области. Один не ограничивающий пример включает проращивание при температуре в диапазоне от 10 до 25°C, необязательно с изменением температуры в диапазоне от 1 до 4 ч. Замачивание и проращивание также можно проводить комбинированным способом, например, как описано в международной патентной заявке WO 2018/001882.

Сушку в печи можно проводить при общепринятых температурах, таких как по меньшей мере 75°C, например, в диапазоне от 80 до 90°C, например, в диапазоне от 80 до 85°C. Таким образом, солод может быть получен, например, любым из способов, описанных Briggs et al. (1981) и Hough et al. (1982). Однако также по настоящему изобретению можно использовать любой другой подходящий способ получения солода, такой как способы получения специальных солодов, включая, но без ограничения, способы жарки солода.

Солод может быть дополнительно обработан, например, путем помола. Помол можно проводить в сухом состоянии, т.е. солод перемалывается в сухом виде, или во влажном состоянии, если используется зеленый солод.

Солод, т.е. молотый солод может быть затерт для приготовления водного экстракта указанного солода. Исходной жидкостью для приготовления напитка может быть водный экстракт солода, т.е. водный экстракт солода, приготовленный затиранием.

Таким образом, способ приготовления ферментированного водного экстракта на основе солода и/или злаков в соответствии с изобретением может включать стадию получения водного экстракта, такого как сусло, путем затирания солода и необязательно дополнительных добавок. Также указанная стадия затирания необязательно может включать промывание, и, таким образом, указанная стадия затирания может представлять собой стадию затирания, включающую стадию промывания, или стадию затирания, исключая стадию промывания.

Как правило, получение водного экстракта начинают помолом солода и/или зерен. Если добавляют дополнительные добавки, их также можно молоть в зависимости от их природы. Если добавка представляет собой зерновое растение, его можно, например, молоть, тогда как сиропы, сахара и т.п., как правило, не перемалывают. Перемалывание облегчается доступом воды к частицам зерен на стадии затирания. При затирании можно продолжать ферментативную деполимеризацию субстратов, инициированную при соложении. Как правило, водный экстракт получают путем смешивания и инкубации молотого солода и воды, то есть в процессе затирания. При затирании солод/жидкую композицию можно дополнять дополнительными композициями, богатыми углеводами, например добавками из молотого ячменя, кукурузы или риса. Добавки из несоложенных зерновых растений, как правило, содержат небольшое количество или не содержат активных ферментов, делая их важными для дополнения солодом или экзогенными

ферментами для обеспечения ферментами, необходимыми для деполимеризации полисахаридов и т.д.

При затирании молотый солод и/или молотые зерна и необязательно дополнительные добавки инкубируют с жидкой фракцией, такой как вода. Температура инкубации обычно либо оставляют постоянной (изотермическое затирание), либо постепенно повышают, например последовательно повышают. В любом случае в указанную жидкую фракцию высвобождаются растворимые вещества в солоде/зерне/добавках. Последующая фильтрация обеспечивает разделение водного экстракта и остаточных твердых частиц, где последние также называются как "отработанное ядро". Полученный таким образом водный экстракт также может быть обозначен как "первое сусло". Дополнительная жидкость, такая как вода, может быть добавлена к отработанным ядрам во время процесса, также называемого промыванием. После промывания и фильтрации можно получить "второе сусло". Дополнительное сусло можно получать, повторяя процедуру. Неограничивающие примеры подходящих способов получения сусла описаны в Briggs et al. (1981) и Hough et al. (1982).

Как упоминалось выше, водный экстракт также можно приготовить путем затирания только неосоложенных зерен. В неосоложенных зернах отсутствуют или содержатся только ограниченные количества ферментов, полезных для получения сусла, таких как ферменты, способные к разрушению клеточной стенки, или ферменты, способные к деполимеризации крахмала в сахара. Таким образом, в вариантах осуществления изобретения, где для затирания используют до 80%, например, 90% или например, 100% неосоложенного зерна, такого как ядра ячменя, предпочтительно, чтобы в сусло добавляли один или несколько подходящих внешних ферментов пивоварения. Подходящие ферменты могут представлять собой липазы, ферменты, разрушающие крахмал (например, амилазы), глюканызы [предпочтительно (1-4)-и/или (1,3,1-4)-бета-глюканыза], и/или ксиланызы (такие как арабиноксиланыза), и/или протеазы, или ферментные смеси, содержащие один или несколько из вышеупомянутых ферментов, например Cereflo, Ultraflo или Onda Pro (Novozymes).

Водный экстракт также может быть приготовлен с использованием смеси осоложенных и неосоложенных ядер, и в этом случае при получении можно добавлять один или несколько подходящих ферментов. Даже в вариантах осуществления, где используется солод, также могут быть добавлены ферменты. Более конкретно, ядра можно использовать совместно с солодом в любой комбинации для затирания - с внешними ферментами для пивоварения или без них - в качестве неограничивающих примеров, в такой как пропорции ядра солода = приблизительно 100:0, или приблизительно 75:25, или приблизительно 50:50, или приблизительно 25:75.

Водный экстракт, полученный после затирания, также может называться как "сладкое сусло". В общепринятых способах сладкое сусло варят с хмелем или без него, где после этого его можно называть как вареное сусло.

Водный экстракт можно нагревать или кипятить перед тем, как подвергнуть его ферментации с помощью дрожжей по изобретению. В одном аспекте изобретения второе и последующие сусла можно комбинировать, а затем подвергать нагреванию или кипячению. Водный экстракт можно нагревать или кипятить в течение любого подходящего времени, т.е. в диапазоне от 60 до 120 мин.

Конечные характеристики ферментированного водного экстракта на основе солода и/или злаков в значительной степени зависят от количества и типа ферментируемых сахаров, присутствующих в водном экстракте солода и/или ядер злаков, а также от характеристик штамма дрожжей, используемого во время ферментации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный водный экстракт имеет видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 12° Плато, например, по меньшей мере 15° Плато, например в диапазоне 5-15° Плато, например, в диапазоне 10-20° Плато, например в диапазоне 15-25° Плато.

В некоторых вариантах осуществления указанный водный экстракт ферментируют с помощью указанного штамма дрожжей в течение не более 6 дней, например не более 5 дней, например не более 4 дней, например не более 3 дней.

Дополнительным преимуществом штаммов дрожжей по настоящему изобретению может быть то, что они пригодны для ферментации сусла с низкими уровнями содержания аминокислот. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления указанный водный экстракт содержит не более 3500 мг/л, например не более 3000 мг/л, например не более 2500 мг/л аминокислот.

Таким образом, водный экстракт, т.е. сусло, может быть приготовлено, как описано выше. Ферментированный водный экстракт на основе солода и/или злаков может быть приготовлен путем ферментации указанного водного экстракта с помощью указанного штамма дрожжей в соответствии с изобретением.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления указанный ферментированный водный экстракт представляет собой зеленое пиво.

В общих чертах спиртовые ферментированные водные экстракты, такие как пиво, могут быть изготовлены из осоложенного и/или неосоложенного зерна. Солод, в дополнение к хмелю и дрожжам, придает вкус и цвет напитку, такому как пиво. Кроме того, солод действует как источник ферментируемого

сахара и ферментов. Неограниченные описания примеров подходящих способов соложения и пивоварения можно найти, например, в публикациях Briggs et al. (1981) и Hough et al. (1982).

Доступны многочисленные, регулярно обновляемые методы анализа ядра, солода и пивных продуктов, например, среди прочего, Американская ассоциация химиков-зерновых (1995 г.), Американское общество химиков-пивоваров (1992 г.), Европейская конвенция по пивоварению (1998 г.), и Институт пивоварения (1997). Общеизвестно, что для заданного пивоваренного завода используется множество конкретных процедур, причем наиболее существенные различия связаны с предпочтениями местных потребителей. Любой такой способ производства пива может быть использован в настоящем изобретении.

Первая стадия производства пива из суслу предпочтительно включает нагревание указанного суслу, как описано выше, за которым следует последующая фаза охлаждения суслу и, необязательно, отдых в вихревом чане.

Способы по изобретению включают стадию ферментации водного экстракта солода и/или зерна злаков с помощью штаммом дрожжей в соответствии с изобретением. Указанная ферментация может представлять собой ферментацию неферментированного водного экстракта или ферментированного водного экстракта, все еще содержащего ферментируемые сахара для дрожжей. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления указанная ферментация может быть проведена по существу сразу же после завершения затирания или после нагревания суслу.

Ферментацию можно проводить в ферментационных чанах, содержащих дрожжи в соответствии с изобретением, т.е. дрожжи, обладающие одной или несколькими характеристиками, описанными выше в настоящем документе.

В процессе многодневной ферментации вырабатываются вкусовые вещества. Если штамм дрожжей не способен превращать определенные соединения, они все еще будут присутствовать после стадии ферментации iii).

В некоторых вариантах осуществления стадия ферментации iii) происходит при любой из температур, указанных ниже, при этом водный экстракт инкубируют с любым количеством дрожжевых клеток, как описано ниже, при этом ферментированный водный экстракт содержит максимальный уровень диацетила, как описано ниже, и при этом ферментация завершается максимум через 5 дней, например, максимум через 4 дня, например, максимум через 3 дня. В частности, ферментация завершается максимум через 4 дня.

В конкретном варианте осуществления ферментация с использованием штамма дрожжей по изобретению завершается, и содержание диацетила составляет ниже 60 ppb, например 50 ppb, по меньшей мере на 12 ч, например по меньшей мере на 24 ч раньше, чем ферментация, проводимая со штаммом дрожжей W-34/78 в тех же условиях.

Вышеупомянутую ферментацию предпочтительно проводят при температуре не более 18°C, например при температуре в диапазоне от 12 до 18°C. В частности, указанную ферментацию можно проводить при температуре приблизительно 16°C.

Указанный максимальный уровень содержания диацетила предпочтительно составляет не более 60 ppb диацетила, например не более 55 ppb диацетила, например не более 50 ppb диацетила, например не более 45 ppb диацетила, когда ферментация завершена. В частности, указанный уровень диацетила по завершении ферментации составляет не более 60 ppb.

Вышеупомянутую ферментацию предпочтительно проводят путем инкубации водного экстракта по меньшей мере с 6 млн жизнеспособных дрожжевых клеток на миллилитр, например по меньшей мере с 10 млн жизнеспособных дрожжевых клеток на миллилитр, например по меньшей мере с 14 млн жизнеспособных дрожжевых клеток на миллилитр, например в пределах 7-8 млн жизнеспособных дрожжевых клеток на миллилитр, например, в пределах 14-16 млн жизнеспособных дрожжевых клеток на миллилитр. В частности, указанную ферментацию можно проводить путем инкубации водного экстракта с приблизительно 15 млн дрожжевых клеток на миллилитр.

В некоторых вариантах осуществления указанный ферментированный водный экстракт имеет содержание алкоголя по меньшей мере 4% ABV, например, по меньшей мере 5% ABV, например, по меньшей мере 6% ABV, например, по меньшей мере 7% ABV.

В некоторых вариантах осуществления указанный ферментированный водный экстракт содержит по меньшей мере 25 мг/л пропанола, например, по меньшей мере 30 мг/л пропанола.

В некоторых вариантах осуществления указанный ферментированный водный экстракт содержит не более 8 мг/л изобутанола, например не более 7 мг/л изобутанола, например не более 6 мг/л изобутанола.

В некоторых вариантах осуществления указанный ферментированный водный экстракт содержит выгодное соотношение пропанол:изобутанол. В частности, отношение пропанол:изобутанол может быть равно по меньшей мере 1,5, например, по меньшей мере 2,0, например, по меньшей мере 2,5, например, по меньшей мере 3,0, например, по меньшей мере 3,5, например, по меньшей мере 4,0, например, по меньшей мере 4,5, например, по меньшей мере 5,0, например, по меньшей мере 5,5, например, по меньшей мере 6,0, например, по меньшей мере 6,5.

В некоторых вариантах осуществления ферментированный водный экстракт, полученный с помощью дрожжей по изобретению, имеет реальную степень ферментации (RDF), которая составляет по меньшей мере 1,5%, такую как на 2% ниже при том же % ABV, чем ферментация, проводимая со штаммом дрожжей W-34/78 или штаммом дрожжей Hybrid yeast 7 в тех же условиях. Напитки на основе солода и/или зерна и способы их производства

Ферментированный водный экстракт на основе солода и/или злаков, описанный выше, может быть дополнительно переработан в напиток.

Аспектом изобретения является обеспечение способов производства напитка на основе солода и/или злаков, при этом указанный способ включает следующие стадии:

i) приготовление ферментированного водного экстракта, как описано выше в настоящем документе в разделе "ферментированный водный экстракт на основе солода и/или злаков и способы его получения", и

ii) дальнейшую переработку указанного ферментированного водного экстракта в напиток.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения напиток на основе солода и/или злаков разбавляют жидкостью, такой как вода.

Необязательно, вода может быть использована для разбавления напитка на основе солода и/или злаков и, таким образом, регулирования, например, содержания этанола. В одном варианте осуществления настоящего изобретения пропорции воды: напитка на основе солода и/или злаков могут находиться в диапазоне от 0,1 до 5 частей воды на 1 часть напитка на основе солода и/или злаков.

Дополнительный процесс может, например, также включать охлаждение и/или фильтрацию напитка на основе солода и/или злаков. Также могут быть добавлены добавки. Кроме того, может быть добавлен CO₂. Наконец, напиток на основе солода и/или злаков, такой как пиво, может быть пастеризован и/или профильтрован перед его упаковкой (например, в бутылки или банки).

В предпочтительных вариантах осуществления напиток представляет собой пиво.

В одном из аспектов настоящего изобретения напиток на основе солода и/или злаков, полученный путем ферментации водного экстракта с помощью указанного штамма дрожжей по настоящему изобретению, имеет приятный вкус.

Вкус напитка на основе солода и/или злаков, полученного путем ферментации с помощью дрожжей по изобретению, может быть проанализирован, например, комиссией специалистов по дегустации пива. Предпочтительно указанная комиссия подготовлена для дегустации и описания вкусоароматических характеристик пива с особым акцентом на альдегиды, бумажный привкус, вкус выдержанности, сложные эфиры, высшие спирты, жирные кислоты и сернистые компоненты.

Обычно комиссия по дегустации будет состоять из 3-30 членов, например из 5-15 членов, предпочтительно из 8-12 членов. Комиссия по дегустации может оценивать наличие различных вкусоароматических характеристик, таких как бумажный, окисленный, выдержанный и хлебный привкусы, а также вкусоароматические характеристики сложных эфиров, высших спиртов, сернистых компонентов и тела пива. Общий вкус пива обычно оценивается комиссией по дегустации по нескольким различным характеристикам по шкале от 1 до 9, где средняя оценка более 5 означает, что пиво имеет приемлемый вкус.

Настоящее изобретение также относится к напиткам на основе солода и/или злаков, приготовленным способами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления напиток содержит по меньшей мере 25 мг/л пропанола, например по меньшей мере 30 мг/л пропанола.

В некоторых вариантах осуществления напиток содержит не более 8 мг/л изобутанола, например не более 6 мг/л изобутанола.

Как правило, ферментированный водный экстракт или напиток, приготовленный с использованием штаммов дрожжей по изобретению, будет иметь конкретное отношение пропанол:изобутанол, например отношение, подобное отношениям, показанным на фиг. 2. Таким образом, если ферментированный водный экстракт или напиток имеет такое конкретное отношение пропанол:изобутанол, это указывает на то, что ферментированный водный экстракт или напиток получены путем ферментации с помощью штамма дрожжей по изобретению. В частности, указанное отношение пропанол:изобутанол может составлять по меньшей мере 1,5, например, по меньшей мере 2,0, например, по меньшей мере 2,5, например, по меньшей мере 3,0, например, по меньшей мере 3,5, например, по меньшей мере 4,0, например, по меньшей мере 4,5, например, по меньшей мере 5,0, например, по меньшей мере 5,1, например, по меньшей мере 5,2, например, по меньшей мере 5,3, например, по меньшей мере 5,4, например, по меньшей мере 5,5, например, по меньшей мере 6,0, например, по меньшей мере 6,5.

Пункты

Изобретение может быть дополнительно определено с помощью следующих пунктов:

1. Способ получения ферментированного водного экстракта, при этом указанный способ предусматривает следующие стадии:

i) обеспечение водного экстракта солода и/или злаков;

ii) обеспечение штамма дрожжей вида *Saccharomyces pastorianus*, при этом указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, при этом тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое

содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, при этом указанный ферментированный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,50° Плато за предшествующие 24 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре не выше 18°C; и

iii) ферментацию водного экстракта, полученного на стадии i), с помощью указанного штамма дрожжей, обеспеченного на стадии ii), с получением таким образом ферментированного водного экстракта.

2. Штамм дрожжей, кодирующий в пределах своего генома:

a) самое большее два функциональных гена, кодирующих ILV2, где каждый ген, кодирующий ILV2, кодирует ScILV2 с SEQ ID NO: 32 или SeILV2 с SEQ ID NO: 38, или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними; и

b) по меньшей мере пять функциональных генов, например, по меньшей мере шесть функциональных генов, кодирующих ILV3, где каждый ген, кодирующий ILV3, кодирует ScILV3 с SEQ ID NO: 35 или SeILV3 с SEQ ID NO: 41, или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними.

3. Штамм дрожжей, способный продуцировать ферментированный водный экстракт при инкубации в водном экстракте солода и/или злаков, при этом указанный ферментированный водный экстракт имеет отношение пропанол:изобутанол, равное по меньшей мере 2,0.

4. Штамм дрожжей по любому из пп. 2-3, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, при этом тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, при этом указанный ферментированный тестовый раствор содержит не более 60 ppb общего диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,50° Плато за предшествующие 24 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре не выше 18°C.

5. Способ или штамм дрожжей по п.1 или 4, где указанный момент времени представляет собой самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,40° Плато, например 0,30° Плато, например 0,20° Плато за предыдущие 24 ч.

6. Способ или штамм дрожжей по любому из пп.1 и 4-5, где указанный тестовый раствор содержит не более 55 ppb диацетила, например не более 50 ppb диацетила, например не более 45 ppb диацетила при указанной температуре в самый ранний момент времени.

7. Способ получения ферментированного водного экстракта, при этом указанный способ предусматривает следующие стадии:

i) обеспечение водного экстракта солода и/или злаков;

ii) обеспечение штамма дрожжей вида *Saccharomyces pastorianus*, при этом указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, при этом тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила, в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,25° Плато за предшествующие 12 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре не выше 18°C; и

iii) ферментацию водного экстракта, обеспеченного на стадии i), с помощью указанного штамма дрожжей с получением таким образом ферментированного водного экстракта.

8. Штамм дрожжей по любому из пп.2-6, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, при этом тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный тестовый раствор содержит не более 60 ppb общего содержания диацетила, в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,25° Плато за предшествующие 12 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре не выше 18°C.

9. Способ или штамм дрожжей по любому из пп. 7-8, где указанный момент времени представляет собой самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,20° Плато, например, 0,15° Плато, например, 0,10° Плато за предшествующие 12 ч.

10. Способ или штамм дрожжей по любому из пп.7-8, где указанный тестовый раствор содержит не более 55 ppb диацетила, например не более 50 ppb диацетила, например не более 45 ppb диацетила в указанный самый ранний момент времени.

11. Способ получения ферментированного водного экстракта, включающий следующие стадии:

i) обеспечение водного экстракта солода и/или злаков;

ii) обеспечение штамма дрожжей вида *Saccharomyces pastorianus*, при этом указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, при этом тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный тестовый раствор содержит не более 120 ppb диацетила, например, не более 60 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,50° Плато в течение следующих 24 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре не выше 18°C; и

iii) ферментацию водного экстракта, полученного на стадии i), с помощью указанного штамма дрожжей с получением таким образом ферментированного водного экстракта.

12. Штамм дрожжей по любому из пп.2-6 и 8-10, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, при этом указанный тестовый раствор содержит не более 120 ppb общего диацетила, например, не более 60 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,50° Плато в течение следующих 24 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре не более 18°C.

13. Способ или штамм дрожжей по любому из пп. 11-12, где указанный момент времени представляет собой самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,40° Плато, например 0,30° Плато, например 0,20° Плато в течение следующих 24 ч.

14. Способ получения ферментированного водного экстракта, включающий следующие стадии:

i) обеспечение водного экстракта солода и/или злаков;

ii) обеспечение штамма дрожжей вида *Saccharomyces pastorianus*, при этом указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, при этом тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный тестовый раствор содержит не более 120 ppb диацетила, например, не более 65 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,25° Плато в течение следующих 12 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре не более 18°C; и

iii) ферментацию водного экстракта, полученного на стадии i), с помощью указанного штамма дрожжей с получением таким образом ферментированного водного экстракта.

15. Штамм дрожжей по любому из пп.2-6, 8-10 и 12-13, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный тестовый раствор содержит не более 120 ppb диацетила, например, не более 65 ppb общего диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,25° Плато в течение следующих 12 часов, при этом указанная ферментация происходит при температуре не выше 18°C.

16. Способ или штамм дрожжей по любому из пп. 14-15, где указанный момент времени представляет собой самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшается на более чем 0,20° Плато, например 0,15° Плато, например 0,10° Плато в течение следующих 12 ч.

17. Способ или штамм дрожжей по любому из пп.11-15, где указанный тестовый раствор содержит не более 115 ppb диацетила в указанный самый ранний момент времени.

18. Способ или штамм дрожжей по любому из пп.1 и 4-17, где указанный тестовый раствор содержит не более 10 млн клеток на миллилитр, например не более 9,5 млн клеток на миллилитр, не более 9,0 млн клеток на миллилитр, например не более 8,5 млн клеток на миллилитр в растворе в указанный самый ранний момент времени.

19. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где тестовый раствор стадии ii) или тестовый раствор представляет собой сусло, имеющее видимое содержание экстрактивных веществ приблизительно 16° Плато.

20. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где тестовый раствор стадии ii) или тестовый раствор содержит по меньшей мере 40 г/кг мальтозы.

21. Способ или штамм дрожжей по любому из предыдущих пунктов, где указанная ферментация на стадии ii) или указанная ферментация происходит при температуре в диапазоне от 12 до 18°C.

22. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанная ферментация стадии ii) или указанная ферментация происходит при температуре не более 16°C.

23. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанная ферментация на стадии ii) или указанная ферментация происходит после инокуляции от 7000000 до 20000000 жизнеспособных дрожжевых клеток на мл тестового раствора.

24. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный водный экстракт ферментируют с помощью указанного штамма дрожжей в течение не более 6 дней, например не более 5 дней, например не более 4 дней.

25. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный водный экстракт имеет видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 12° Плато, например, по меньшей мере 15° Плато.

26. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный водный экстракт представляет собой сусло.

27. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный водный экстракт содержит не более 3500 мг/л, например не более 3000 мг/л, не более 2500 мг/л аминокислот.

28. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный ферментированный водный экстракт содержит не более 60 ppb диацетила, например, не более 55 ppb диацетила, например, не более 50 ppb диацетила, например, максимально 45 ppb диацетила, такого как самое большее 40 ppb диацетила.

29. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный ферментированный водный экстракт содержит не более 10 млн клеток на миллилитр, например не более 9,5 млн клеток на миллилитр, не более 9,0 млн клеток на миллилитр, например не более 8,5 млн клеток на миллилитр в растворе в указанный самый ранний момент времени.

30. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный ферментированный водный экстракт имеет содержание алкоголя по меньшей мере 4% ABV, например по меньшей мере 5% ABV.

31. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный ферментированный водный экстракт содержит по меньшей мере 25 мг/л пропанола, например, по меньшей мере 30 мг/л пропанола.

32. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный ферментированный водный экстракт содержит не более 8 мг/л изобутанола, например не более 6 мг/л изобутанола.

33. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный ферментированный водный экстракт содержит отношение пропанол.изобутанол, равное по меньшей мере 2,0, например, по меньшей мере 2,5, например, по меньшей мере 3,0, например, по меньшей мере 4,0, например, по меньшей мере 5,0, например, по меньшей мере 5,5.

34. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор, при этом указанный тестовый раствор содержит не более 265 ppb диацетила в любой момент времени в течение 5 дней после начала инкубации, и где к указанному тестовому раствору добавляют от 7 до 8 миллионов дрожжевых клеток.

35. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор, содержащий не более 50 ppb диацетила, после инкубации в указанном тестовом растворе в течение не более 6 дней, например не более 5 дней, например не более 4 дней.

36. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор, содержащий не более 50 ppb диацетила, после инкубации в указанном тестовом растворе при температуре не более 16°C в течение не более 5 дней, например, не более 4 дней.

37. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать первый ферментированный тестовый раствор, содержащий не более 60 ppb диацетила, после инкубации в указанном тестовом растворе в течение заданного времени, при этом указанное заданное время составляет по меньшей мере на 12 ч, например по меньшей мере на 24 ч меньше, чем время, необходимое для штамма дрожжей W-34/78, инкубируемого в тех же условиях, для получения второго ферментированного тестового раствора, содержащего не более 60 ppb диацетила, после инкубации в указанном тестовом растворе.

38. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать по меньшей мере 4,0, например, по меньшей мере 4,7 мл/л этанола по °Плато при инкубации указанного штамма дрожжей в указанном тестовом растворе.

39. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать по меньшей мере 4,0, например, по меньшей мере 4,7 мл/л этанола по °Плато при инкубации указанного штамма дрожжей в указанном тестовом растворе в течение от 4 до 6 дней, например, в течение приблизительно 4 дней.

40. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей способен расти на среде с мелибиозой в качестве единственного источника углерода.

или гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними.

56. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей имеет по меньшей мере три функциональных гена, таких как по меньшей мере четыре функциональных гена, кодирующих BAT1, где каждый ген, кодирующий BAT1, кодирует ScBAT1 с SEQ ID NO: 36 или SeBAT1 с SEQ ID NO: 42, или гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними.

57. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей имеет по меньшей мере четыре гена, например, по меньшей мере пять генов, кодирующих BAT2, где каждый ген, кодирующий BAT2, кодирует ScBAT2 с SEQ ID NO: 37 или SeBAT2 с SEQ ID NO: 43, или гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними.

58. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей имеет по меньшей мере четыре функциональных гена, таких как по меньшей мере пять функциональных генов, кодирующих BAT2, где каждый ген, кодирующий BAT2, кодирует ScBAT2 с SEQ ID NO: 37 или SeBAT2 с SEQ ID NO: 43, или гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними.

59. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где сумма генов в указанном штамме дрожжей, кодирующих ILV2 и ILV6, ниже, чем сумма генов, кодирующих ILV5 и ILV3.

60. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где сумма генов в указанном штамме дрожжей, кодирующих ILV2, меньше, чем сумма генов, кодирующих ILV5 и ILV3.

61. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где отношение генов в указанном штамме дрожжей ILV5 и ILV3 против ILV2 составляет по меньшей мере 1, например, по меньшей мере 1,5, например, по меньшей мере 2, например, по меньшей мере 2,5 или например, по меньшей мере 3.

62. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где отношение функциональных генов в указанном штамме дрожжей ILV5 и ILV3 против ILV2 составляет по меньшей мере 1, например, по меньшей мере 1,5, например, по меньшей мере 2, например, по меньшей мере 2,5, например, по меньшей мере 3.

63. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где отношение генов в указанном штамме дрожжей ILV5 и ILV3 против ILV2 и ILV6 составляет по меньшей мере 1, например, по меньшей мере 1,2, например, по меньшей мере 1,4, например, по меньшей мере 1,6, например, по меньшей мере 1,8 или, например, по меньшей мере 2.

64. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где отношение функциональных генов в указанном штамме дрожжей ILV5 и ILV3 против ILV2 и ILV6 составляет по меньшей мере 1, например, по меньшей мере 1,2, например, по меньшей мере 1,4, например, по меньшей мере 1,6, например, по меньшей мере 1,8 или по меньшей мере 2.

65. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где гены, кодирующие ILV2, ILV3 и/или ILV5, экспрессируются из своих нативных промоторов.

66. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где гены, кодирующие ILV2, ILV3, ILV5, ILV6, BAT1 и/или BAT2, экспрессируются из своих нативных промоторов.

67. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей несет мутацию или делецию одного или нескольких генов ILV2.

68. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей несет мутацию сдвига рамки считывания в одном или нескольких генах ILV2.

69. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую к снижению или отсутствию экспрессии одного или нескольких генов ILV2.

70. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей несет мутацию или делецию одного или нескольких генов ILV6.

71. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей несет мутацию сдвига рамки считывания в одном или нескольких генах ILV6.

72. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую к снижению или отсутствию экспрессии одного или нескольких генов ILV6.

73. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей не содержит какой-либо гетерологичной ДНК.

74. Способ или штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей не подвергался стадии генетического конструирования.

75. Ферментированный водный экстракт, приготовленный с помощью способа по любому из предшествующих пунктов.

76. Способ приготовления напитка, включающий следующие стадии:

- i) приготовление ферментированного водного экстракта по любому из предшествующих пунктов и
- ii) переработку указанного ферментированного водного экстракта в напиток.

77. Способ по п.76, в котором стадии обработки включают одно или несколько из следующего:

- i) фильтрация,
- ii) карбонизация,
- iii) созревание или
- iv) розлив.

78. Напиток, приготовленный с помощью способа по любому из пп.76-77.

79. Напиток по п.78, где указанный напиток содержит по меньшей мере 25 мг/л пропанола, такое как по меньшей мере 30 мг/л пропанола.

80. Напиток по любому из пп.78-79, где указанный напиток содержит не более 8 мг/л изобутанола, такое как не более 6 мг/л изобутанола.

81. Напиток по любому из пп.78-80, где указанный напиток представляет собой пиво.

82. Ферментированный водный экстракт по п.75 или напиток по любому из пп.78-81, где указанный экстракт или указанный напиток имеет отношение пропанол:изобутанол, равное по меньшей мере 3,0, такое как по меньшей мере 4,0, такое как по меньшей мере 5,0, такое как по меньшей мере 5.5.

83. Штамм дрожжей, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор после инкубации указанного штамма дрожжей в тестовом растворе, имеющем видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, и где указанный тестовый раствор содержит не более 60 ppb диацетила, например, не более 50 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось на более чем 0,50° Плато за предшествующие 24 ч после инкубации указанного штамма дрожжей в указанном экстракте.

84. Штамм дрожжей *Saccharomyces pastorianus* по п.83, где штамм дрожжей является таким, как определено по любому из пп.1-72.

Примеры Материалы и способы Приготовление сусла

Как правило, сусло, используемое в приведенных ниже экспериментальных примерах, готовили путем затирания 70% солода Пилснер и 30% ячменной добавки в 2,7 л воды/кг солода.

Режим затирания был таким, как показано в табл. 1 ниже.

Таблица 1. Режим затирания для приготовления сусла

	Темп (°C) в начале	Темп (°C) в конце	Время (мин)	Общее время (мин)
Затирание	52,0	52,0	5	5
<i>Выдержка</i>	52,0		15	20
Увеличение темпер.	52,0	65,0	13	33
<i>Выдержка</i>	65,0		50	83
Увеличение темпер.	65,0	72,0	7	90
<i>Выдержка</i>	72,0		20	100
Увеличение темпер.	72,0	78,0	6	106
<i>Выдержка</i>	78,0		10	116

Вариации этого режима затирания могут по-прежнему давать сусло, пригодное для ферментации.

После затирания сусло кипятят в течение 60 мин. Чтобы гарантировать, что сусло подходит для ферментации, желательно, чтобы оно имело состав в следующих диапазонах:

- Глюкоза 12-25 г/л
- Мальтоза 60-80 г/л
- Мальтотриоза 15-20 г/л
- Цинк от 0,16 до 0,18 мг/л
- Свободный альфа-аминоазот (FAN) 110-250 мг/л
- Валин/FAN от 0,6 до 0,8

В табл. 2 ниже в качестве ориентира приведен средний состав сусла, приготовленного из 70% солода Пилснер и 30% ячменной добавки. Ожидается, что сусло, которое не соответствует некоторым из приведенных ниже параметров, все еще будет производить хорошее пиво.

Таблица 2. Иллюстративная композиция сусла, приготовленного из 70% солода Пилснер и 30% ячменной добавки

Сахара	г/100 мл сусла	STD	Минералы	мг/л	STD
Фруктоза	0,29	0,06	Са Кальций	46,15	9,28
Глюкоза	1,93	0,70	Mg Магний	115,73	15,31
Сахароза	0,35	0,09	Na Натрий	21,03	10,63
Мальтоза	7,84	0,52	K Калий	815,82	170,68
Мальтотриоза	1,69	0,55	Zn Цинк	0,17	0,10
Сумма ферментируемых сахаров	12,10	0,95	Cu Медь	0,07	0,02
Сахар (Моно дисахариды Disaccharides)	10,59	0,45	Fe Железо	0,12	0,08
Инвертированные сахара BUR Law FR	2,30	0,40	Al Алюминий	0,01	0,01
			Mn Марганец	0,11	0,08
			P Фосфор	511,96	61,85
			SI Кремний	18,43	9,03
Аминокислоты	мг/л	STD			
Аспарагиновая кислота (Asp)	89,53	16,66	FAN* мг/л	207,16	52,16
Глутаминовая кислота (Glu)	91,43	15,62			
Серин (Ser)	92,10	28,01	VAL/FAN	0,61	0,03
Гистидин (His)	59,09	15,86			
Глицин (Gly)	44,98	12,42			
Треонин (Thr)	81,00	25,22			
Аргинин (Arg)	161,68	59,35			
Аланин (Ala)	120,60	27,66			
Тирозин (Tyr)	133,16	39,81			
Метионин (Met)	47,92	17,61			
Валин (Val)	141,48	34,78			
Фенилаланин (Phe)	147,45	30,83			
Изолейцин (Iso)	81,80	21,26			
Лейцин (Leu)	181,02	31,62			
Лизин (Lys)	115,49	36,49			
Класс 1 Сумма аминокислот	410,67	90,89			
Класс 2 Сумма аминокислот	681,55	148,43			
Класс 3 Сумма аминокислот	532,18	113,77			

* FAN = свободный альфа-аминоазот

Чтобы способствовать флокуляции дрожжей, перед ферментацией в сусло можно добавить дополнительное количество цинка, как описано в некоторых примерах ниже.

Капельная ПЦР

Геномную ДНК получали из диплоидных штаммов дрожжей и гаплоидных клонов спор с использованием набора для очистки ДНК MasterPure Genomic от Epicentre. Концентрации каждого конечного препарата ДНК довели до 50 нг/мкл ДНК с использованием воды Milli-Q. ДНК количественно определяли с использованием спектрофотометров NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Использование капельной ПЦР Biorad (QX200) и зондов, предназначенных для гибридизации с генами ILV2 *Saccharomyces eubayanus* и *Saccharomyces cerevisiae*. Эти зонды использовали для нацеливания на геномную ДНК в гаплоидных клонах спор и для контроля диплоидных штаммов дрожжей. Используя этот метод, авторы изобретения смогли количественно определить соотношение между двумя вариантными генами ILV2. Чтобы различить аллели ILV2 *S. eubayanus* и *S. cerevisiae*, была разработана видоспецифичная цифровая ПЦР-реакция, основанная на анализе TaqMan. Для этой цели были разработаны целевые специфические праймеры в гомологичных областях гена ILV2 для *S. eubayanus* и *S. cerevisiae*, что означает, что один и тот же прямой и обратный праймер могут одновременно амплифицировать копии обоих видов ILV2. Видоспецифические зонды были разработаны так, чтобы быть идентичными, за исключением одного нуклеотида, что позволяет проводить различие между аллелями ILV2 *S. eubayanus* и *S. cerevisiae*. Видоспецифический зонд для *S. cerevisiae* имеет Т в положении нуклеотида 1515 в последовательности ILV2 *S. cerevisiae* дикого типа, тогда как видоспецифический зонд для *S. eubayanus* имеет С в положении нуклеотида 1515 в последовательности ILV2 *S. eubayanus* дикого типа. Были разработаны следующие праймеры и зонды, чтобы проводить различие между аллелем ILV2 *S. eubayanus* и аллелем ILV2 *S. cerevisiae*:

Мишень-специфические праймеры ILV2, которые будут одновременно амплифицировать ILV2 *S. cerevisiae* и *S. eubayanus*:

мишень-специфический прямой праймер (5'-GCCAACGACACAGGAAGAC-3') (SEQ ID NO: 1);

мишень-специфический обратный праймер (5'-GTACCTAAACCACCTGATGT-3') (SEQ ID NO: 2).

Видоспецифические зонды, которые позволят проводить различие между копиями ILV2 *S. cerevisiae* и *S. eubayanus*:

зонд, специфический для аллеля ILV2 *S. cerevisiae* (5'-TGGGCTGCTCAACAC-3') (SEQ ID: 3) - помеченный 5' FAM и 3' BHQ1;

зонд, специфический для аллеля ILV2 *S. eubayanus* (5'-ACGTACGGAATGTGGATT-3') (SEQ ID NO: 4) - помеченный 5' HEX и 3' BHQ1

Используя систему Droplet Digital PCR QX200 (Bio-Rad Laboratories), проводили ddPCR в соответствии с инструкциями производителя. Для аналитических целей 5 мкл очищенной геномной ДНК (концентрация ДНК 5 нг/мкл) штаммов дрожжей добавляли к 17-мкл смеси для ПЦР, содержащей 11 мкл 2x ddPCR Supermix для зондов (№ dUTP; Bio-Rad), 900 нМ мишень-специфического прямого праймера для ПЦР, 900 нМ мишень-специфического обратного праймера для ПЦР, 250 нМ зонда, специфического для аллеля ILV2 *S. cerevisiae*, и 250 нМ зонда, специфического для аллеля ILV2 *S. eubayanus*. Реакционную смесь загружали на AutoDG Droplet Generator (Bio-Rad Laboratories) и проводили образование капель в соответствии с руководством производителя. Эмульсию капель подвергали термическому циклированию в стандартных условиях ПЦР: денатурация при 95°C в течение 10 мин, 40 циклов ПЦР при 94°C в течение 30 с и 55°C в течение 1 мин и заключительный этап удлинения при 98°C в течение 10 мин перед хранением титрационного микропланшета при 8°C. ПЦР-амплификацию в каплях подтверждали с использованием системы QX200 (Bio-Rad Laboratories) и данные анализировали с помощью программного обеспечения QuantaSoft (версия v1.7, Bio-Rad Laboratories). Определение общего числа копий гена ILV2

В первом раунде соотношения между ILV2 *S. eubayanus* и *S. cerevisiae* анализировали непосредственно на очищенной геномной ДНК из каждого отдельного клона спор. Некоторые клоны спор, несмотря на происхождение от одних и тех же исходных дрожжей, имели различную генетическую основу ILV2. Оказалось, что некоторые клоны спор содержат только 100% генов ILV2 клона спор *S. cerevisiae*. Поскольку большинство исходных лагерьных дрожжей являются три- или тетраплоидными (Wahlter et al, 2014), можно предположить, что 100% клонов спор ILV2 *S. cerevisiae* могут иметь от 1 до 3 копий. Для клонов спор с обоими типами ILV2, например 50/50, можно предположить 1 копию каждого типа в клонах спор или 2 + 2 в исходных дрожжах. Штаммы с соотношениями, близкими к 67/33, будут означать 1 копию ILV2 *S. cerevisiae* и 2 копии ILV2 *S. eubayanus*.

Чтобы обеспечить более точную оценку количества копий в клонах спор с близким к 100% ILV2 *S. cerevisiae*, испытание повторяли путем добавления или внесения известных количеств чистой внешней ДНК *S. eubayanus* к образцам для получения распределения *S. cerevisiae*/*S. eubayanus* после внесения. Соотношения ScILV2/SeILV2, которые будут сильно сдвигаться в сторону *S. eubayanus* после внесения, будут указывать на низкое количество копий ILV2 *S. cerevisiae*, а если соотношение будет сдвигаться лишь незначительно в сторону ДНК *S. eubayanus* и по-прежнему будет преобладать высокое значение ILV2 *S. cerevisiae*, то это будет указывать на то, что исходный клон спор имеет много копий ILV2 *S. cerevisiae*.

Добавление осуществляли таким образом, что каждый образец 50 нг/мкл ДНК смешивали с ДНК *S. eubayanus* в той же концентрации 50 нг/мкл в соотношении 50/50 (10 мкл образца + 10 мкл ДНК *S. eubayanus*).

Метод оценки капельной QPCR количественно отражает общее количество присутствующих копий ILV2, но не может выявить наличие некоторых инактивированных аллелей ILV2 из-за наличия определенных SNP или мутаций сдвига рамки считывания. Такие мутации могут быть сначала обнаружены с помощью последующего секвенирования геномной ДНК методом секвенирования по Сэнгеру или секвенирования следующего поколения.

Скрининг на флокуляцию

Для оценки флокуляционной способности клонов спор дрожжей их сначала выращивали в обычном сусле при комнатной температуре в течение нескольких дней. Для каждого штамма 2 мл культуры переносили в реакционную пробирку на 2 мл, тщательно встряхивали и клетки оставляли отстаиваться на 10 мин. Для определения кальцийзависимой флокуляции клетки из 2 мл ранее упомянутых культур собирали, дважды промывали 50 мМ раствором EDTA и затем ресуспендировали в 2 мл 50 мМ Tris, 50 мМ янтарной кислоты и 100 мМ КОН без кальция (Stratford 1996). Значение pH доводили до pH 4,0, что соответствует конечным значениям pH культур сусла. Суспензии клеток снова тщательно встряхивали и оставляли для отстаивания на 5 мин. Результаты регистрировали фотографически.

Определение общего содержания диацетила клонов спор при ферментациях сусла с использованием цилиндров с магнитным перемешиванием

Клоны спор и контрольные дрожжи предварительно выращивали в течение трех дней в 2 мл жидкой среды YPD на шейкере-переворачивателе Stuart SB2 (www.stuart-equipment.com). Встряхивающие

колбы без перегородок, содержащие 25 мл пастеризованного стандартного сусла Пилснер с плотностью 16 Плато, инокулировали двумя мл предварительных культур и выращивали при комнатной температуре на вибростоле со средним встряхиванием в течение 5 дней для получения плотных культур в стационарной фазе.

Ферментации пива проводили в стеклянных цилиндрах, как описано ранее (Güiterrez et al., 2018). Ферментации проводили в высоких стеклянных мерных цилиндрах объемом 250 мл (331 × 39 × 39 мм; Duran), содержащих 200 мл сусла Пилснер и закрытых перевернутым химическим стаканом с носиком (Duran) в верхней части цилиндра, чтобы обеспечить выход углекислого газа и легкое взятие образцов для анализа. Ферментации проводили при непрерывном перемешивании со скоростью 150 об/мин с использованием магнитного стержня на перемешивающей платформе перемешивающего устройства Variomag при 16°C внутри холодильника (шкафный инкубатор типа TS 606-G/4-i). Количество дрожжевых клеток оценивали с помощью Cellometer (<https://www.nexcelom.com/applications/cellometer>) и инокулировали (заправляли) в количестве 15 миллионов клеток на мл сусла, и эффективность ферментации контролировали путем измерения потери массы в результате метаболического выделения CO₂. Образцы по 10 мл отбирали во время ферментации на 2, 3 и 4 день для анализов диацетила. Образцы центрифугировали при 1900 g в течение 10 мин и супернатанты хранили в морозильной камере при -20°C до дальнейшего использования. Ферментации считались завершенными, когда невозможно было измерить дальнейшую потерю массы ферментационных цилиндров. Измеряли общее содержание диацетила с помощью газовой хроматографии в соответствии с методом Европейской пивоваренной конвенции EBC 9.24.2, который включает период инкубации образцов при 60°C в течение 90 мин для определения общего содержания диацетила, которое будет отражать общую сумму предшественника ацетолактата и свободного диацетила. Штаммы дрожжей Hybrid yeast 7 *Saccharomyces pastorianus* представляют собой штамм для производства лагеров и обладают высокой флокуляцией, что позволяет собирать дрожжи в конце ферментации без дополнительного охлаждения. Hybrid yeast 7 используют в качестве сравнения с дрожжами по настоящему изобретению.

ZDA1 представляет собой дрожжи по изобретению.

ZDA2 представляет собой дрожжи по изобретению.

ZDA3 представляет собой дрожжи по изобретению.

W-34/78 *Saccharomyces pastorianus* представляет собой коммерчески доступный штамм лагерных дрожжей от Weihenstephan Hefebank (info@hefebank-weihenstephan.de), Германия. Известно, что эти дрожжи довольно эффективно снижают диацетил и демонстрируют высокую флокуляцию, но все же значительно меньшую, чем штамм Hybrid yeast 7, при ферментации в описанном выше сусле. Его используют в качестве сравнения с дрожжами по настоящему изобретению. W-34/78 также упоминается в настоящем документе как WS34/78.

Пример 1. Испытание в масштабе 50 л при 16 и 18°C с использованием штамма дрожжей ZDA1 и сравнительного штамма Hybrid yeast 7

Чтобы проверить различие в уровнях диацетила во время ферментации нового гибридного штамма дрожжей по сравнению с контрольным штаммом дрожжей, 50 л пива было приготовлено из сусла, как описано в разделе "Материалы и способы", со значением °Плато от 15 до 16. Перед ферментацией pH сусла доводили до 4,9 и добавляли цинк до конечной концентрации 0,30 мг/л. Сусло инокулировали 12-15 миллионами жизнеспособных дрожжевых клеток на мл сусла. Ферментацию проводили при температуре 16°C или 18°C. Как правило, лагеры ферментируются при температуре от 12 до 16°C. Если дрожжи выдерживают 18°C, это может ускорить процесс ферментации. Образцы получали на 0-й день и в различные моменты времени во время ферментации, как указано в таблицах ниже. Результаты показаны в табл. 3 и 4 ниже и представлены на фиг. 1 от А до С.

Таблица 3. Ферментация в масштабе 50 л при 18°C

Дрожжи	День	Темп °C	°Плато	Диацетил ppb	pH	Алкоголь Об. %
ZDA 1	0		15,79		4,90	
	1	18,3	13,61	87	4,33	
	3		3,33	54		
	4	18,0	3,23	26	4,16	6,95
Hybrid yeast 7	0		15,78		4,90	
	1	17,9	13,6	489	4,45	
	3		3,06	137		
	4	17,7	3,01	56	4,05	7,02

Таблица 3. Ферментация в масштабе 50 л при 16°C

Дрожжи	День	Темп °С	°Плато	Диацетил ppb	pH	Алкоголь Об.%
ZDA1	0		15,27		4,89	
	4	15,8	3,52	93	4,11	
	5	15,7	3,38	50	4,15	
	6	15,7	3,38	31	4,15	
	7	15,7		19	4,15	6,55
Hybrid yeast 7	0		15,27		4,89	
	4	16,2	3,39		4,04	
	5	16,3	3,28		4,09	
	6	16,3	3,26	77	4,09	
	7	16,3		42	4,09	6,59

Считается, что пиво отвечает техническим условиям, когда уровень диацетила составляет ниже 50 ppb, и значение Плато является стабильным (использован весь ферментируемый сахар). Желательно получить пиво, отвечающее техническим условиям, в кратчайшие сроки, при этом производя по меньшей мере сходное количество алкоголя по сравнению с контрольными дрожжами.

Уровни диацетила при 18°C

Как видно из табл. 3 и фиг. 1B и 1C, штамм дрожжей ZDA1 был способен вырабатывать ферментированное сусло (зеленое пиво) в течение трех дней, где уровень диацетила был близок к 50 ppb, и в то же время весь ферментируемый сахар, присутствующий в сусле, был использован (о чем свидетельствует падение °Плато, которое составляет менее 0,50 за 24 ч) при ферментации при 18°C. Напротив, контрольный штамм дрожжей Hybrid yeast 7 начал с очень высокого уровня диацетила (фиг. 1B), и ему потребовалось 4 дня, чтобы достичь такого же уровня диацетила, который имелся у штамма ZDA1 на 3-й день.

Самым ранним моментом времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ не уменьшалось более чем на 0,50° Плато за предшествующие 24 ч, считался 4-й день для обоих штаммов. На 4-й день зеленое пиво, полученное с помощью Hybrid yeast 7, содержало приблизительно 56 ppb диацетила, тогда как зеленое пиво, полученное с помощью ZDA1, содержало только 26 ppb.

Когда ферментацию проводили при 16°C (табл. 4 и фиг. 1A), самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ не снижалось более чем на 0,50° Плато за предшествующие 24 часа, был на 5-й день для обоих штаммов. В это время штамм ZDA1 достиг желаемого уровня диацетила 50 ppm, тогда как контрольные дрожжи Hybrid yeast 7 должны были бродить еще два дня, чтобы достичь уровня диацетила ниже 50 ppm.

Уровни пропанола, изобутанола и SO₂ после ферментации при 16 или 18°C

В дополнение к диацетилу и Плато, в готовом пиве, приготовленном из 50 л тестового пива, измеряли уровни пропанола и изобутанола. Готовое пиво доводили до содержания алкоголя 5,0% по объему, CO₂ до 5,1 г/л и разливали в зеленые бутылки емкостью 330 мл. Не ограничиваясь какой-либо теорией, пропанол и изобутанол, как полагают, являются индикаторами ограниченного метаболического потока в метаболическом пути аминокислот с разветвленной цепью, в частности, низкой активности ILV2 дрожжей, и, следовательно, являются хорошим способом оценить, обладает ли штамм дрожжей потенциалом производить диацетил на низком уровне. Высокое отношение пропанол:изобутанол указывает на то, что дрожжи производят диацетил на низком уровне. Результаты показаны в табл. 5 ниже.

Таблица 5. Содержание пропанола и изобутанола в ферментированном сусле (зеленое пиво)

Дрожжи	Темп °С	Пропанол	Изобутанол	Отношение пропанол:изобутанол	SO ₂
ZDA1	16	35,09	4,93	7,73	7
	18	42,18	6,39	6,60	6
Hybrid yeast 7	16	15,53	17,50	0,89	4
	18	19,3	19,57	0,97	2

Как видно из табл. 5, как при 16°C, так и при 18°C зеленое пиво, полученное в результате ферментации с помощью гибридного штамма дрожжей ZDA1, показало более высокие уровни пропанола по сравнению с зеленым пивом, полученным с применением контрольного штамма дрожжей Hybrid yeast 7. Сусло инкубированное со гибридным штаммом дрожжей ZDA1, также имело более низкие уровни изобутанола по сравнению с Hybrid yeast 7, что привело по меньшей мере к 6,8-кратному различию отношения пропанол:изобутанол.

Также наблюдалось, что уровни SO₂ в зеленом пиве, полученном с помощью штамма дрожжей ZDA1, были выше, чем в зеленом пиве, полученном с помощью контрольного штамма. Это может обеспечить преимущество с точки зрения сохранения готового пива.

На фиг. 3 показано отношение пропанола к изобутанолу в коммерческом пиве по сравнению с пивом "контрольная бутылка 89-84393 ZDA2", полученным с использованием штамма дрожжей ZDA2 согласно изобретению. Пиво "контрольная бутылка 89-84393 ZDA2" изготавливали во время испытания в масштабе 50 л и выдерживали до 5%. Все коммерческие сорта пива имеют более низкое отношение про-

панола к изобутанолу.

Пример 2. Испытание в масштабе 50 л при 16°C со штаммами дрожжей ZDA2 и ZDA3

Два других гибридных штамма дрожжей с благоприятными профилями диацетила идентифицировали и сравнивали со штаммом ZDA1 из примера 1. Готовили 50 л пива из сусла, как описано в разделе "Материалы и способы", со значением °Плато 16. Перед ферментацией сусло регулировали до pH 4,9 и добавляли цинк до конечной концентрации 0,30 мг/л. Сусло инокулировали 14 млн жизнеспособных дрожжевых клеток на мл сусла. Дрожжи для инокуляции получали в результате первой ферментации в масштабе 50 л, где дрожжевые клетки собирали в конце ферментации и использовали для повторной заправки во втором испытании на ферментацию в масштабе 50 л. Это напоминает способ крупномасштабного производства пива. Ферментацию проводили при 16°C. Образцы получали в 0-й день и во время ферментации, как указано в таблице ниже. Результаты показаны в табл. 6 ниже.

Таблица 6. Ферментация в масштабе 50 л при 16°C

Дрожжи	День	Темп °C	°Плато	Диацетил ppb	pH	Алкоголь Об. %
ZDA1	0		16,05		4,9	
	1	16,2	13,7	90	4,45	
	3			63		
	4	16,4	2,99	48	4,22	
	5	16,3	2,94		4,24	7,29
ZDA2	0		16,05		4,9	
	1	16,2	14,13	48	4,47	
	3			55		
	4	16,5	3,09	42	4,21	
	5	16,4	3,01		4,24	7,28
ZDA3	0		16,05		4,9	
	1	15,9	13,73	68	4,41	
	3			45		
	4	16,2	3,04	35	4,28	
	5	15,9	3		4,29	7,26

Как показано в табл. 6, все три кандидата (ZDA1, ZDA2 и ZDA3) показали уровни содержания диацетила ниже 50 ppb на 4-й день, что соответствовало времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ достигало плато. Кроме того, ZDA3 имел уровни содержания диацетила ниже 50 ppb уже на 3-й день.

Пример 3. Результаты дегустации

Ферментированное сусло, полученное в примере 2, далее перерабатывали в готовые сорта пива, доводя содержание спирта до 5% по объему, CO₂ до 5,1 г/л, и разливали в стандартные датские зеленые бутылки емкостью 330 мл. Пиво оценивала комиссия специалистов по дегустации, состоящая из 10 дегустаторов. Каждый член комиссии по дегустации прошел обширную подготовку, в частности, каждый член был подготовлен для оценки вкусоароматических характеристик с акцентом на сложные эфиры, высшие спирты, сернистые компоненты и тело пива. Каждый член комиссии по дегустации оценивал разные вкусовые нотки. В частности, общий вкус оценивали по шкале от 1 до 9 и представляли как "Основной результат" в табл. 7 ниже.

Таблица 7. Результаты дегустации пива из испытания в масштабе 50 л из примера 2

Название образца	Основной результат первой ферментации
ZDA1	6.1 Удовлетворительно
ZDA2	5.7 Удовлетворительно
ZDA3	5.8 Удовлетворительно

Как показано в табл. 7, образцы пива, произведенные всеми штаммами дрожжей, получили оценку не ниже 5,7 (удовлетворительно).

Пример 4. Испытание пива в масштабе 10 гл при 16°C с использованием штамма дрожжей ZDA1 и сравнительного штамма Hybrid yeast 7

Цель этого примера состояла в том, чтобы исследовать, демонстрирует ли гибридный штамм дрожжей ZDA1 такой же благоприятный профиль диацетила, который наблюдался в масштабе 50 л в примере 1. Пиво в объеме 10 гл было приготовлено из сусла, как описано в разделе "Материалы и способы" со значением °Плато приблизительно 16. Перед ферментацией сусло регулировали до pH 4,95 и добавляли цинк до конечной концентрации 0,8 мг/л. Сусло инокулировали по меньшей мере 15 млн жизнеспособных дрожжевых клеток на мл сусла гибридных штаммов дрожжей ZDA1 или контрольного штамма лагерных дрожжей Hybrid дрожжей 7 с последующей ферментацией при температуре приблизительно 16°C. Дрожжи для инокуляции получали из первой варки, как описано в примере 2. Образцы получали в 0-й день и в дни, указанные ниже в табл. 8 результатов. Результаты представлены в табл. 8 и проиллюстрированы на фиг. 2А и В.

Таблица 8. Ферментация в масштабе 10 гл при 16°C.

Дрожжи	День	Темп °С	°Плато	Диацетил ppb	pH	Алкоголь Об. %
ZDA1	0	15,7	16,05		4,73	
	1	15,9	14,24	239	4,49	0,92
	4	15,7	2,87	55	4,11	7,15
	5	15,9	2,73	28	4,19	7,28
	6	15,9	2,65	14	4,13	7,43
Hybrid yeast 7	0	15,8	16,1		4,72	
	1	15,8	14,41	868	4,54	0,87
	4	16,0	3,34	509	4,07	6,84
	5	15,7	2,67	205	4,06	7,32
	6	15,8	2,56	91	4,05	7,48
	7	15,0	2,53	36	4,11	7,48

Штамм дрожжей ZDA1 продуцирует довольно низкий начальный уровень содержания диацетила, а зеленое пиво, полученное с использованием гибридных штаммов дрожжей ZDA1, приблизилось к порогу вкусового ощущения диацетила (50 ppb) на 4-й день, и на 5-й день снизилось до 28 ppb. Тем не менее, зеленое пиво, полученное с помощью контрольного штамма дрожжей Hybrid yeast 7, впервые достигло этого порога на 7-й день (фиг. 2А). На фиг. 2В показано, что общий уровень диацетила в зеленом пиве, полученном с помощью гибридного штамма дрожжей ZDA1, близок к 50 ppb приблизительно в то же время, когда ферментируемые сахара близки к завершению ферментации, то есть на 4-й день.

Пример 5. Результаты дегустации

Ферментированное сусло, полученное в примере 4, далее перерабатывали в готовое пиво, доводя содержание алкоголя до 4,6% по объему, CO₂ до 5,4 г/л, и разливали в 330 мл бутылки из темного стекла. Пиво оценивала комиссия специалистов по дегустации пива в Дании и Франции, состоящая из 10 дегустаторов. Каждый член комиссии по дегустации прошел обширную подготовку, в частности, каждый член был подготовлен для оценки вкусоароматических характеристик с акцентом на сложные эфиры, высшие спирты, сернистые компоненты и тело пива. Каждый член комиссии по дегустации оценивал разные вкусовые нотки. В частности, общий вкус был оценен по шкале от 1 до 9 и представлен как "Основной результат" в табл. 9 ниже.

Таблица 9. Результаты дегустации вкуса пива, полученного в испытании объемом 10 гл из примера 4.

Название образца	Основной результат
ZDA1	6.6 Удовлетворительно
Hybrid yeast 7	6.4 Удовлетворительно

Как показано в табл. 9, образцы пива, приготовленные с использованием штамма дрожжей ZDA1, получили оценку 6,6 (удовлетворительно), которая немного выше, чем у пива, полученного с использованием контрольного штамма Hybrid yeast 7.

Пример 6. Испытание при 16°C, включающее три контрольных штамма лагерных дрожжей

Этот эксперимент проводили для сравнения трех новых штаммов дрожжей из примера 2 с дополнительными коммерчески доступными штаммами дрожжей, а также с контролем, используемым в примерах 1, 2 и 4. 40 л пива было приготовлено из сусла, как описано в разделе "Материалы и способы", с той небольшой разницей, что первая выдержка при 52°C составила 30 мин. Для ферментации значение °Плато составляло от 15 до 16. Перед ферментацией сусло регулировали до pH 4,9 и добавляли цинк до конечной концентрации 0,30 мг/л. Сусло инокулировали 7,5 млн жизнеспособных дрожжевых клеток на мл гибридных штаммов дрожжей ZDA1, ZDA2 и ZDA3, а также контрольным штаммом лагерных дрожжей Hybrid yeast 7, и контрольными штаммами лагерных дрожжей W-34/78, которые коммерчески доступны от фирмы Weihenstephan, Германия. Сусло ферментировали при температуре приблизительно 16°C. Образцы получали в 1-й день и в дни, указанные в приведенной ниже таблице результатов. Результаты показаны в табл. 10.

Таблица 10. Ферментация в масштабе 40 л при 16°C

Дрожжи	День	Темп °С	% Плато	Диаметр тил ррb	pH	Клеток в жидкости (млн/ мл)	Алкоголь Об.%	Пропанол	Изопропанол
Hybrid yeast 7	1	15,7	15,54	88	4,71				
	2	16,5	12,78	431	4,45				
	3			869					
	4			520					
	5	16,4	2,49	265	4,02				
	6	16,5	2,45	115	4,05	0,8			
	7		2,37	57	4,0				
	8			44			7,35	11,02	9,57
W-34/78	1	14,5	15,4	176	4,64				
	2	16,1	12,54	470	4,33				
	3			485					
	4			286					
	5	16,3	2,97	150	4,1				
	6	16,2	2,68	62	4,15				
	7	15,4	2,63	41	4,19	17			
	8			33			7,2	11,08	9,85
ZDA1	1	15,6	15,26	89	4,69				
	2	16,3	12,24	166	4,38				
	3			133					
	4			74					
	5	16,2	2,9	42	4,15				
	6	16,1	2,73	24	4,2	2,5			
	7	16,2	2,69	16	4,25				
	8	15,6	15,26	89	4,69		7,18	27,04	4,00
ZDA2	1	14,7	15,47	20	4,64				
	2	16,1	12,7		4,4				
	3			245					
	4			102					
	5	16,3	2,68	49	4,05				
	6	16,2	2,55	25	4,09	1,2			
	7	16,2	2,5	15	4,13		7,3	22,54	3,61
ZDA3	1	14,6	15,5	39	4,63				
	2	16,5	12,96	92	4,4				

					2				
3			116						
4			63						
5	16,4	3,78	32	4,0 8					
6	16,5	3,28	18	4,1 2	2,8				
7	16,3	3,21	12	4,1 5		6,9	24,20	3,56	

В этом испытании все три штамма с низким содержанием диацетила (ZDA1, ZDA2 и ZDA3) показали уровни диацетила ниже 50 ppb на 5-й день, что соответствовало времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ достигло плато для всех протестированных штаммов дрожжей, в то время как ни один из контрольных штаммов не показал уровни диацетила ниже 110 ppb в тот же день. Самым ранним моментом времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ не уменьшилось на более чем 0,50° Плато за предшествующие 24 ч, считается 6-й день для всех этих испытаний. На 6-й день все штаммы с низким содержанием диацетила (ZDA1, ZDA2 и ZDA3) имели уровень содержания диацетила ниже 45 ppb (24 ppb, 25 ppb и 18 ppb, соответственно), тогда как контрольные штаммы (Hybrid yeast 7, W-34/ 70 и W-34/78) имели более высокие уровни содержания диацетила (115 ppb, 62 ppb и 62 ppb, соответственно).

Эти результаты являются замечательными, если учесть, что дрожжи Weihenstephan менее флокулентны, чем штамм Hybrid yeast 7 и штаммы по изобретению. Количество клеток в жидкости (над осадком дрожжей) в конце ферментации является хорошим показателем флокуляции. Эти данные показаны в табл. 10 выше как "Клетка в жидкости" (чем ниже значение, тем более хлопьевидными являются дрожжи). Высокая флокуляция является преимуществом, когда дрожжи должны быть собраны из производственного резервуара для инокуляции следующего сула для производства пива. Если флокуляция дрожжей низкая, этот процесс потребует охлаждения зеленого пива до 24 ч. С другой стороны, высокая флокуляция может привести к меньшему контакту между дрожжами и сулом во время ферментации, что, вероятно, снизит скорость, с которой дрожжи могут потреблять диацетил, и продлит время ферментации.

Таким образом, описанные в настоящем документе примеры обеспечивают штаммы дрожжей, которые способны снижать содержание диацетила до уровня менее 50 ppb примерно в то же время, когда были израсходованы ферментируемые сахара (или даже раньше), и в то же время не требуют какого-либо дополнительного охлаждения зеленого пива для сбора дрожжей для следующего производства пива благодаря их высокой флокуляции при 16°C.

Кроме того, можно видеть, что штаммы дрожжей с низким содержанием диацетила можно легко идентифицировать по отношению пропанол/изобутанол, поскольку у всех оно выше 6, тогда как у всех контрольных штаммов оно ниже 1,4.

Пример 7. Генотипирование штаммов дрожжей

Сборка геномов

Для четырех (Hybrid Yeast 7, ZDA1, ZDA2 и W 34-78) из пяти геномов был разработан подход к тандемному анализу с использованием данных NGS из платформ Illumina и Pacbio. Контроль качества, фильтрацию и сборку осуществляли в соответствии с конвейером собственной разработки. Все геномы были собраны de novo с использованием программного обеспечения Canu 1.9, которое использует данные, сгенерированные платформой Pacbio. Впоследствии чтения, сгенерированные платформой Illumina, были сопоставлены (Pilon 1.22) со сборкой, созданной Canu 1.9, чтобы повысить точность консенсуса черновых сборок. Для генома ZDA3 из-за отсутствия данных Illumina использовали только Canu 1.9 без дальнейшего улучшения сборки.

Полученные собранные геномы использовали в запросах BLAST.

Blast и выравнивание хитов

Для каждого из генов (ILV2, ILV3, ILV5, ILV6, BAT1, BAT2) соответствующую аминокислотную последовательность гена *S. cerevisiae* использовали в качестве запрашиваемой последовательности для каждого из 5 геномов с использованием алгоритма TBLASTN. Наконец, хиты фильтровали путем сохранения тех, которые имели по меньшей мере 65-80% идентичности последовательности или покрывали по меньшей мере 40% длины запрашиваемой последовательности. Выравнивание аминокислотных последовательностей ILV2, ILV3, ILV5, ILV6, BAT1, BAT2 между WS34-78, cer (*Saccharomyces cerevisiae*), eub (*Saccharomyces eubayanus*), Hybrid7 (Hybrid yeast 7), ZDA1 и ZDA2 показано на фиг. 4-9. Анализ BLAST не повторяли для соответствующих генов *S. Eubayanus*, поскольку на последней стадии фильтрации хитам разрешалось иметь идентичность последовательностей до 65%, таким образом, в этой установке все хиты от *S. cerevisiae* и *S. eubayanus* будут захвачены из-за высокого сходства между ними. Инструмент множественного выравнивания последовательностей MUSCLE (3.8) использовали для выравнивания всех хитов, идентифицированных с помощью анализа BLAST.

Идентификационный анализ плоидности

Идентификационный анализ плоидности проводили с использованием модифицированной версии

алгоритма *sppIDer*. Короткие чтения платформы Illumina четырех из пяти геномов сопоставляли с комбинированным эталонным геномом *S. cerevisiae* и *S. eubayanus*, и чтения с качеством картирования (MQ) >3 сохраняли и сортировали в порядке комбинированного эталонного генома; затем рассчитывали покрытие комбинированного эталонного генома. Затем пользовательский скрипт вычислял среднее покрытие для каждого вида, и комбинированный эталонный геном, разбитый на окна.

Технические недостатки анализа BLAST

Использование BLAST для изучения влияния геномных различий на фенотип штаммов имеет ряд недостатков, наиболее важными из которых являются:

- i) невозможность оценить дубликации на геном и/или хромосомном уровне;
- ii) чувствительность к ошибкам или неясностям в сборках.

Все методы сборки генома имеют проблемы, связанные с созданием значимых сборок при наличии полиплоидии. Это приводит к результату, когда несколько областей из разных копий хромосом схлопываются в один каркас. В принципе, ситуация менее серьезна, когда происходят события дубликации генов, поскольку они могут быть идентифицированы с использованием определенных методов сборки и соответствующих экспериментальных установок. Однако вполне вероятно, что дубликации генов, особенно если геномные различия отсутствуют или присутствуют лишь в ограниченных количествах в разных копиях, не удастся должным образом обнаружить на стадии сборки. Что касается второго пункта, BLAST, в принципе, сможет идентифицировать более подробную информацию о различных вариантах, таких как функциональные SNP и нефункциональные ORF. Однако ошибки или двусмысленность в сборке могут привести к большому количеству ложных вызовов, например, ложным SNP и неоднозначной геномной архитектуре.

Поэтому было решено выполнить, параллельно с простой идентификацией вариантов BLAST, оценку наблюдаемой плоидности каждой геномной области в данных секвенирования, в результате хромосомной плоидности и дубликации или делеции гена.

В целом создание сборок *de novo* с разрешением гаплотипов остается серьезной проблемой в настоящее время. Методы NGS (*PacBio* и *Illumina*) производят огромное количество данных, но по-прежнему технически сложно отличить ошибки от истинных вариантов последовательности. Кроме того, нужно присвоить истинные варианты разным копиям генома, когда образец является полиплоидным. Сборки в этих анализах проводили с использованием алгоритмов, не учитывающих гаплотипы, поэтому конечная результирующая сборка представляла свернутый геном гаплотипа.

Полученные результаты

Результаты показаны в табл. 11 ниже.

Таблица 11. Идентифицированные аллельные копии выбранных генов у штаммов дрожжей ZDA1, ZDA2, ZDA3, W-34/78 и Hybrid yeast 7

НАЗВАНИЕ ГЕНА	ОБЩЕЕ ЧИСЛО КОПИЙ ОСНОВАННО НА ПЛОИДНОСТИ НЕСУЩЕЙ ХРОМОСОМЫ	BLAST ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ КОПИИ (ПОЛНЫЕ КОПИИ)	УЧАСТИЕ ГЕНОМА (НА ОСНОВЕ BLAST)	УСЕЧЕННЫЕ КОПИИ
ZDA1				
<i>ILV2</i>	4	1	S.cer=1	1 (S.eub)
<i>ILV6</i>	4	2	S.cer=1 и S.eub=1	
<i>ILV5</i>	5	2	S.cer=1 и S.eub=1	
<i>ILV3</i>	6	4	S.cer=2 и S.eub=2	
<i>BAT1</i>	5 (6)	3	S.cer=2 и S.eub=1	
<i>BAT2</i>	6	3	S.cer=2 и S.eub=1	
ZDA2				
<i>ILV2</i>	5	1	S.cer=1	1 (S.eub)
<i>ILV6</i>	4	2	S.cer=1 и S.eub=1	
<i>ILV5</i>	5	2	S.cer=1 и S.eub=1	
<i>ILV3</i>	6	3	S.cer=1 и S.eub=2	
<i>BAT1</i>	5(6)	2	S.cer=1 и S.eub=1	1 (S.cer)

<i>BAT2</i>	6	2	S.cer=1 и S.eub=1	1 (S.cer)
ZDA3				
<i>ILV2</i>		1	S.cer=1	1 (S.Eub)
<i>ILV6</i>		4	S.cer=1 и S.eub=3	
<i>ILV5</i>		3	S.cer=2 и S.eub=1	
<i>ILV3</i>		2	S.cer=1 и S.eub=1	
<i>BAT1</i>		2	S.cer=1 и S.eub=1	
<i>BAT2</i>		3	S.cer=2 и S.eub=1	
W-34/78				
<i>ILV2</i>	3	2	S.cer=1 и S.eub=1	
<i>ILV6</i>	3	1	S.eub=1	
<i>ILV5</i>	3	2	S.cer=1 и S.eub=1	
<i>ILV3</i>	4	2	S.cer=1 и S.eub=1	
<i>BAT1</i>	3	3	S.cer=2 и S.eub=1	
<i>BAT2</i>	4	2	S.cer=1 и S.eub=1	
HYBRID YEAST 7				
<i>ILV2</i>	5	1	S.cer=1	
<i>ILV6</i>	5	1	S.cer=1	
<i>ILV5</i>	4	1	S.cer=1	1 (S.Eub)
<i>ILV3</i>	4	1	S.eub=1	
<i>BAT1</i>	4	1	S.cer=1	
<i>BAT2</i>	4	1	S.eub=1	

Число в скобках обозначает пloidность хромосомы по режиму. Число без скобок обозначает пloidность расположения гена на этой хромосоме.

Пример 8. Испытание пивоварения в промышленных масштабах с использованием штамма дрожжей ZDA2 и сравнительного штамма Hybrid yeast 7

Цель этого примера состояла в том, чтобы исследовать, демонстрирует ли гибридный штамм дрожжей ZDA2 такой же благоприятный профиль диацетила, как и в предыдущих примерах, при применении в пивоварении в промышленных масштабах (приблизительно 1800 гл), когда дрожжи собирают и вносят повторно.

Пиво в объеме 1800 гл было приготовлено из суслу, состоящего из солода и добавки, полученного путем обычного инфузионного затирания и со значением °Плато приблизительно 16. Перед ферментацией сусло регулировали до pH 4,9-5,0. В сусло повторно вносили дрожжи поколения 8 как ZDA2, так и контрольного штамма лагерных дрожжей Hybrid yeast 7, и ферментировали при температуре приблизительно 16°C. Образцы получали в день 0 и в дни, указанные в приведенной ниже табл. 12 результатов и проиллюстрированные на фиг. 10.

Таблица 12. Ферментация в объеме 1800 гл при 16°C

Дрожжи	День	Темп °C	°Плато	Диацетил ppb	pH	Алкоголь Об. %	RDF %
ZDA2	0	15,0	16,60		5,00		
	1	15,0	14,25	80,0	4,60		
	2	16,0	11,23	142,0	4,42		
	3	16,0	7,70	200,0	4,29		
	4	16,0	4,95	172,0	4,24		
	5	16,0	2,91	116,0	4,27		
	6	16,0	2,72	51,0	4,35		
	7	16,0	2,70	38,0	4,36	7,64	69,9
Hybrid yeast 7	0	15,0	15,90		4,90		
	1	15,0	13,30	822,0	4,54		
	2	16,0	9,73	1387,0	4,37		
	3	16,0	6,85	1622,0	4,27		
	4	16,0	4,17	1469,0	4,23		
	5	16,0	2,39	713,0	4,25		
	6	16,0	2,18	429,0	4,29		
	7	16,0	2,18	148,0	4,28	7,52	71,9

Штамм дрожжей ZDA2 продуцирует довольно низкий уровень диацетила на протяжении всей ферментации, а зеленое пиво, полученное с использованием гибридного штамма дрожжей ZDA2, достигло порога вкусового ощущения диацетила (50 ppb) уже на 6-й день. В это время плато не уменьшилось на более чем 0,5 за последние 24 ч. Зеленое пиво, полученное с помощью контрольного штамма дрожжей Hybrid yeast 7, не достигло порога вкусового ощущения для диацетила на 7-й день, через два дня после этого плато не уменьшилось на более чем 0,5 в течение 24 ч (фиг. 10). Следовательно, характеристики для зеленого пива в отношении диацетила и плато были достигнуты по меньшей мере на 2 дня раньше при использовании дрожжей ZDA2 по сравнению с эталонными дрожжами Hybrid yeast 7.

Интересно, что дрожжи ZDA2 достигли реальной степени ферментации (RDF), которая была на 2% ниже, чем у Hybrid yeast 7, в то время как процентное содержание алкоголя было практически одинаковым в двух сортах зеленого пива. Следовательно, дрожжи ZDA способны производить такое же количество спирта при более низкой реальной степени ферментации, что приводит к лучшему вкусу пива. Эта тенденция снижения RDF на 1,5-2,5% при том же уровне содержания алкоголя для дрожжей ZDA2 наблюдалась во всех поколениях ферментации, предшествующих 8-му поколению, показанному в этом примере (см. табл. 13).

Таблица 13. RDF и ABV для 8 поколений ферментации

Поколение дрожжей		1	2	3	4	5	6	7	8
ZDA2	RDF	68,2	69,5	69	69,5	68,9	69	70,4	69,9
	ABV	7,2	7,5	7,31	7,38	7,43	7,43	7,58	7,64
Hybrid yeast 7	RDF	70,1	70,6	71,1	71,1	71,3	71,3	72,1	71,9
	ABV	7,4	7,28	7,36	7,48	7,47	7,58	7,6	7,52

Пример 9. Оценка пивоваренных штаммов с помощью секвенирования с использованием Hybrid Nanopore-Shuming и биоинформатики для расчета количества копий соответствующих генов

Штаммы секвенировали с использованием платформы Shumina, как описано ранее. Для секвенирования Nanopore ДНК сверхвысокой молекулярной массы готовили с использованием методологии, описанной Denis et al.

Чтобы подготовить HMW геномную ДНК для секвенирования, образцы обрабатывали с использованием колонок Zymo Genomic Clean и Concentrator, а затем проверяли на качество и количество с помощью флуориметрического анализа deNovix dsDNA Broad Range.

Все образцы были мультиплексированы, и библиотеки были созданы с использованием химии SQK-LSK109 и пакетов Native Barcode Extension EXP-NBD104 и EXP-NBD114 от Oxford Nanopore Technologies. Все необходимые стадии очистки осуществляли с использованием магнитных частиц Clean NA для NGS. Секвенирование генома проводили на ячейках MinION FlowCells FLO-MIN106D в течение 48-72 ч.

Необработанные данные секвенирования получали с помощью bonito (<https://->

github.com/nanoporetech/bonito) и демультимплексовали с использованием guppy (<https://nanoporetech.com/nanopore-sequencing-data-analysis>). Сборки Hybrid-Genome выполняли с использованием Marsurca (<https://github.com/alekseyzimin/masurca>) в сочетании с файлами fastq Nanopore и Illumina, и собранные геномы были аннотированы с помощью prokka. (<https://github.com/tseemann/prokka>). Охват секвенирования и число копий интересующих генов рассчитывали с помощью qualimap (<http://qualimap.conesalab.org/>) и визуализировали с помощью Integrative Genomics Viewer (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

Картирование прочтений и обнаружение SNP выполняли в программе CLC Genomics Workbench (версия 11). Вкратце, обрезанные чтения сопоставляли с гибридным геномом дрожжей "in silico", который включал конкатенацию геномов *S. eubayanus* (Accession: GCA_0012986.25.1) и *S. cerevisiae* (GCA_000146045.2). С помощью основного инструмента обнаружения вариантов были обнаружены однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и вставки/делеции (инделлы). В настоящем документе количество функциональных копий генов ILV2 может быть оценено на основе диагностических SNP, которые существовали на отдельных аллелях в дрожжах ZDA.

В генах ILV2 *S. cerevisiae* имеется сдвиг рамки считывания C', который инактивирует полученный белок (Leu575fs) из-за вставки Т-нуклеотида в этот кодон. % картирования прочтений Illumina на этой частоте составлял примерно 33%, что позволяет предположить, что 1 из 3 копий ILV2sc была инактивирована. Кроме того, было замечено, что в аллелях ILV2 *Eubayanus* делеция Т-нуклеотида привела к сдвигу рамки считывания, что приводит к инактивирующему усечению (Leu304fs). Знание количества копий (CN) генов ILV2 *cerevisiae* позволило рассчитать количество копий других генов на основе картирования прочтений, как описано ранее. Подсчет CN WS34/78 также был основан на оценке, основанной на картировании прочтений, где количество копий ILV2 было основано на предыдущих доказательствах того, что очень похожий штамм (WS34/70) является тетраплоидными дрожжами с равным содержанием генома *S. cerevisiae* и *S. eubayanus*. (Walther et al.2014). Кроме того, в примере 10 при удалении аллелей ILV2 *eubayanus* было обнаружено, что WS34/78 действительно имеет две копии аллелей ILV2 *eubayanus* (всего 4 аллеля ILV2, включая аллели *cerevisiae*). Эти результаты обобщены в табл. 14.

Таблица 14. Расчетное число функциональных копий представляющих интерес генов. Cere относится к аллелям *Cerevisiae*, а Eub относится к аллелям *Eubayanus*

	Число функциональных копий - ZDA1	Число функциональных копий - ZDA2	Число функциональных копий - WS3478
ILV2_Cere	2	2	2
ILV2_Eub	0	0	2
ILV3_Cere	4	4	2
ILV3_Eub	2	2	2
ILV5_Cere	3	3	1
ILV5_Eub	2	2	2
ILV6_Cere	2	2	1
ILV6_Eub	2	2	3
BAT1_Cere	3	3	4
BAT1_Eub	2	2	2
BAT2_Cere	4	4	2
BAT2_Eub	2	2	3

Эталонный штамм WS3478 имеет 4 функциональные копии гена ILV2, в то время как ZDA1 и ZDA2 имеют только по 2 функциональные копии этого гена. Кроме того, WS3478 имеет 4 функциональные копии ILV3 и 3 функциональные копии ILV5, в то время как для штаммов ZDA1 и ZDA2 это число равно 6 и 5 соответственно.

Пример 10. Адаптации числа копий гена в модельных пивных дрожжах W-34/78

Общая цель этого эксперимента заключалась в корректировке числа копий соответствующих генов в модельном штамме дрожжей (*Saccharomyces pastorianus* ssp. штамм *carlsbergensis* (WS34/78)), чтобы отразить генотип ZDA1 и ZDA2. WS34/78 коммерчески доступен от Weihenstephan, Germany, и также упоминается здесь как W-34/78. Для этого гены в штамме WS34/78 необходимо было либо инактивировать, либо дополнительно экспрессировать в соответствии с табл. 15.

Таблица 15. Необходимые изменения в генотипе штамма WS34/78 для отражения соответствующего генотипа представляющих интерес штаммов с низким содержанием диацетила

Ген	Аллель	Изменение
ILV2	<i>S. eubayanus</i>	-2 копии
ILV3	<i>S. cerevisiae</i>	+2 копии
ILV5	<i>S. cerevisiae</i>	+2 копии

Инактивацию проводили с помощью придающих устойчивость кассет с антибиотиками, нацеленных на кодирующие последовательности представляющих интерес генов (например, ILV2). В настоящем документе кодирующая последовательность ДНК (cds) была удалена путем гомологичной рекомбинации таким образом, что остались только 99 п.н. N-концевой области и 107 п.н. C-концевой области гена. Сверхэкспрессию генов (т.е. ILV3 и ILV5) проводили таким образом, чтобы не затрагивать аутентичный геномный контекст, т.е. клонировали кассету, которая включала примерно 1 т.п.н., расположенных "выше" по отношению к cds, cds и 0,5 т.п.н., расположенных "ниже" по отношению к cds. Таким образом, кассета содержит нативные последовательности промотора и терминатора, и экспрессия дополнительных копий генов предположительно находится под естественным контролем. Кроме того, использовали однокопийную плазмиду дрожжей, чтобы контролировать количество копий.

Трансформация клеток WS34/78

Клетки штамма WS34/78 *Saccharomyces pastorianus* ssp. *carlsbergensis* делали способными к поглощению ДНК, следуя методу, описанному Gietz and Schiestel (DOI: 10.1038/nprot.2007.17). Как правило, клетки трансформировали 1 мкг плазмидной ДНК или ПЦР-ампликона. Продолжительность воздействия теплового шока сократили до 15 мин при сохранении температуры 42°C.

Создание экспрессионных кассет

Основываясь на информации о последовательности ДНК штамма WS34/78 из примера 9, экспрессионные кассеты создавали путем ПЦР-амплификации нативных последовательностей ДНК WS34/78, содержащих примерно 1000 п.н., расположенных "выше" по отношению к cds, и 500 п.н., расположенных "ниже" по отношению к cds, таким образом, содержащие нативные последовательности промотора и терминатора. Точную длину ампликонов можно вывести из соответствующих последовательностей праймеров, приведенных в примерах. Фланкирующие cds области размером 1000 п.н. или 500 п.н. должны обеспечивать аутентичный/нативный контроль интересующих генов. Клонированные ПЦР-ампликоны (в плазмиде/интегрированные в хромосому) контролировали секвенированием ДНК по Сэнгеру с использованием выделенной плазмидной ДНК в качестве матрицы для реакций секвенирования.

Хромосомная интеграция кассет экспрессии

На первой стадии экспрессионную кассету собирали путем слияния модуля экспрессии генов с модулем устойчивости к антибиотикам, что обеспечивает возможность положительного отбора события интеграции. Кассету сливали с ПЦР-ампликонами, кодирующими ДНК-участки, для гомологичной рекомбинации с хромосомой WS34/78. Сайтами для интеграции были локусы PAD1 WS34/78, так как этот ген является нефункциональным в этих дрожжах, и поэтому замена этого гена не влияет на профиль вкуса. Фланкирующие области, используемые для гомологичной рекомбинации, имели длину примерно 500 п.н. Клоны дрожжей, которые росли в присутствии антибиотика, анализировали с помощью ПНР (т.е. ПНР для отбора колоний) для проверки вставки кассеты. Положительные клоны дополнительно анализировали на наличие мутаций в модуле экспрессии. Ампликоны, покрывающие модуль экспрессии, контролировали секвенированием ДНК по Сэнгеру.

Клонирование ILV-генов в плазмиде pYESVIII

Плаزمида pYESVIII (BRAIN;) представляет собой челночный вектор *E.coli* - Yeast, который реплицируется с большим числом копий в *E.coli* и поддерживается в виде единственной копии плазмиды в дрожжевых клетках благодаря репликации ori CEN6. Кассеты экспрессии обычно вставляли в сайт множественного клонирования, используя метод сборки Гибсона.

Если необходимо вставить две копии одного и того же аллеля, предпочтительно, чтобы одна копия интересующего гена (GOI) имела аутентичную последовательность ДНК, в то время как cds второй копии были изменены таким образом, чтобы нативная последовательность белка оставалась неизменной. Это было достигнуто путем химического синтеза генов с использованием алгоритмов оптимизации экспрессии генов в дрожжевых клетках (оптимизация использования кодонов). Это было сделано для уменьшения вероятности рекомбинации при трансформации плазмиды в клетки дрожжей.

Для экспрессии генов ILV3 из плазмиды будет собрана тандемная конструкция (бицистронная экспрессия). В настоящем документе один промотор регулирует экспрессию двух кодирующих последовательностей ILV3 (одна нативная, одна синтетическая cds). Две кодирующие последовательности будут соединены 2А-пептидным линкером, который делает возможным пропуск рибосом, так что обе cd транслируются под контролем нативного промотора ILV3. Технология 2А-пептида изменяет C-конец первого белка путем добавления 3-аминокислотной метки (NPG), в то время как N-конец последующего белка начинается с пролина (Liu, Z. et al., 2017; DOI: 10.1038/s41598-017-02460-2).

E. coli трансформировали собранными *in vitro* плазмидами, плазмиды выделяли из трансформантов, контролировали рестрикционным расщеплением и ДНК-секвенированием с последующей трансформацией компетентных клеток WS34/78.

Таблица 16. Штаммы и плазмиды, использованные/сконструированные в проекте. Нижний индекс *sc* обозначает гены *Saccharomyces cerevisiae*, а *eu* обозначает гены *Saccharomyces eubayanus* в межвидовых гибридных пивоваренных дрожжах WS34/78

Штамм	ILV Генотип	Манипуляция / Регулировка	Описание
#1	Нативный	Нет (штамм WT)	Штамм WS34/78 <i>Saccharomyces pastorianus</i> <i>ssp. carlsbergensis</i>
#2	Δ Ilv2eu	WS34/78 [2x ILV2eu]:: Zeo R	Оба аллеля ILV2 (<i>S.</i> <i>eubayanus</i>) инактивированные вставкой ShBle-кассеты
#3	Δ Ilv2eu; +1 ILV3eu	Штамм #2; PAD1::ILV3eu	Вставка кассеты экспрессии ILV3 (<i>S.</i> <i>eubayanus</i>) в локус PAD1
#4	Нативный	Плазмида #0	Штамм #1, трансформированный плазмидой pYESVIII без вставки
#5	Δ Ilv2eu; +1 ILV5sc	Штамм #2, плазмида #1	Штамм № 2, несущий pYESVIII, кодирующую 1 копию аллеля ILV5sc
#7	Δ Ilv2eu; +1 ILV5sc; +1 ILV3eu	Штамм #3, Плазмида #1	Штамм № 3, несущий pYESVIII, кодирующую 1 копию аллеля ILV5sc
Плазмиды			
#0	G418R	pYESVIII	Базовая плазмида; <i>cen6-ori</i> ; KanMX-устойчивый маркер
#1	+1 ILV5sc	pYESVIII, 1x ILV5sc	ILV5sc аллель, клонированный в плазмиду #0

**Примеры/мутантные варианты *S. pastorianus* WS34/78
Рекомбинантные штаммы**

Генерация штамма № 2

Матрицы для ПЦР

Плазмида pYES5-Cen6-Sh.ble (*sc*) 2.0 (BRAIN), кодирующая кассету Sh.ble геномной ДНК *S. pastorianus* WS34/78, штамм №1 (Табл. 16)

Используемые праймеры:

CRA43: SEQ ID NO:44

CRA44: SEQ ID NO: 45

CRA49: SEQ ID NO: 46

CRA50: SEQ ID NO: 47

CRA51: SEQ ID NO: 48

CRA52: SEQ ID NO: 49

Кассету sh.ble (фрагмент 1) амплифицировали из плазмиды pYES5-Cen6-Sh.ble (*Saccharomyces cerevisiae* (*sc*)) 2.0 (BRAIN Biotech AG) с использованием праймеров CRA43/44. Плечи гомологии генерировали путем амплификации фланкирующих областей ILV2 (*Saccharomyces eubayanus* (*se*)) из геномной ДНК штамма № 1 с помощью аллель-специфических праймеров CRA49/51 (5'-фланкирующая область; фрагмент 2) и CRA50/52 (3'-фланкирующая область; фрагмент 3). Матрицу HR генерировали с помощью

ПЦР с удлинением с перекрытием, используя праймеры CPA49/50 и фрагменты 1+2+3 в качестве матрицы. Аллель-специфическому нокауту ILV2 (se) посредством гомологичной рекомбинации способствовала запатентованная BRAIN технология NUCLEASE. Это привело к получению ряда штаммов, которые имели единичные или двойные интеграции в локусе ILV2 (se) и были видимые на агарозном геле. Штамм с двойной делецией ILV2 (se) был выбран для последующего анализа.

Последовательность кассеты нокаута ILV2 (se):

SEQ ID NO: 50

Генерация штамма № 3

Матрицы для ПЦР

Геномная ДНК *S. pastorianus* WS34/78, штамм №1 (табл. 16)

кассета NTC-ДНК (Нурсеотрицин); BRAIN Biotech AG

Используемые праймеры:

CPA70: SEQ ID NO: 51

CPA71: SEQ ID NO: 52

CPA91: SEQ ID NO: 53

CPA96: SEQ ID NO: 54

CPA111: SEQ ID NO: 55

CPA112: SEQ ID NO: 56

CPA113: SEQ ID NO: 57

CPA114: SEQ ID NO: 58

CPA128: SEQ ID NO: 59

CPA129: SEQ ID NO: 60

Кассету экспрессии ILV3 (se) (продукт 1) амплифицировали из геномной ДНК штамма № 1 с помощью аллель-специфических праймеров CPA70/71. Затем продукт 1 дополнительно амплифицировали с помощью праймеров CPA70/129, в результате чего получали продукт 2. Амплификацию NTC-экспрессионной кассеты (продукт 3) осуществляли с помощью праймеров CPA91/96 и NTC-DNA-String в качестве матрицы. Продукт 4 генерировали путем амплификации продукта 3 с помощью праймеров CPA91/128. Продукт 3 и продукт 4 собирали с помощью набора NEBuilder® HiFi для сборки ДНК-конструкций и амплифицировали с помощью праймеров CPA70/91 для создания фрагмента 1. Плечи гомологии генерировали путем амплификации фланкирующих областей PAD1 из геномной ДНК штамма № 1 с помощью праймеров CPA111/112 (5'-фланкирующая область; фрагмент 2) и CPA113/114 (3'-фланкирующая область; фрагмент 3). Окончательную кассету интеграции ILV3-NTC генерировали путем сборки фрагмента 1+2+3 с последующей амплификацией с помощью праймеров CPA111/114. Для получения штамма № 3 штамм № 2 трансформировали последней кассетой интеграции ILV3-NTC.

Последовательность ILV3 (se) - кассета интеграции NTC: SEQ ID NO: 61

Рекомбинантные плазмиды

Конструирование плазмиды № 1

Подготовка вектора

Плазмиду #0 (pYESVIII, BRAIN Biotech AG) линейаризовали при помощи фермента PmeI, присутствующего в сайте множественного клонирования. Перед очисткой гидролизированный вектор дефосфорилировали.

Генерация вставки вектора

Матрица для ПЦР:

Геномная ДНК *S. pastorianus* WS34/78, штамм №1 (табл. 16)

Используемые праймеры:

CPA74: SEQ ID NO: 62

CPA75: SEQ ID NO: 63

CPA86: SEQ ID NO: 64

CPA87: SEQ ID NO: 65

Экспрессионную кассету (sc) нативного ILV5 амплифицировали из геномной ДНК WS34/78 с использованием аллель-специфических праймеров CPA74/75. Затем вставку вектора генерировали путем амплификации полученного продукта ПЦР с помощью праймеров CPA86/87.

ILV5-экспрессионный вектор (плазида № 1) собирали с помощью набора NEBuilder® HiFi для сборки DNA-конструкций и *E. coli* DH10β трансформировали продуктом реакции. После получения плазмиды экспрессионную кассету анализировали с помощью секвенирования ДНК по Сэнгеру.

Последовательность экспрессионной кассеты ILV5 (sc):

SEQ ID NO: 66

Пример 11. Дальнейшие адаптации числа копий генов в модельных пивных дрожжах WS34/78

Цель этого эксперимента была аналогична примеру 10, т.е. заключалась в создании дополнительно генетически модифицированных штаммов дрожжей WS34/78, чтобы отрегулировать число копий соответствующих генов для отражения генотипа ZDA1 и ZDA2.

ПЦР нашивных генов *Saccharomyces cerevisiae*

Гены ILV3, BAT1, BAT2 и ILV6 *S. cerevisiae* вместе с их нативными промоторными и терминаторными областями амплифицировали из лагерных дрожжей Weihenstephan 34/78 (W34/78) с использованием праймеров с SEQ ID NO: 67 по SEQ ID NO: 74 и ДНК-полимеразы Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs). Области для нацеливания на нативный промотор и терминатор были выбраны как примерно 1000 пар оснований, расположенных "выше" по отношению к стартовому кодону (промотор), и 400 пар оснований, расположенных "ниже" по отношению к стоп-кодону (терминатор), в соответствии с предыдущей литературой (Mumberg et al, 1995). Геномную ДНК, используемую в качестве матрицы для ПЦР-реакций, экстрагировали из дрожжей W34/78 с использованием набора MasterPure Yeast DNA Purification Kit, No MPY80200 от фирмы Lucigen.

Праймеры, используемые для амплификации расположенных "выше" и "ниже" желаемых генов *S. cerevisiae*:

ScILV3_F: SEQ ID NO: 67
 ScILV3_R: SEQ ID NO: 68
 ScBAT1_F: SEQ ID NO: 69
 ScBAT1_R: SEQ ID NO: 70
 ScBAT2_F: SEQ ID NO: 71
 ScBAT2_R: SEQ ID NO: 72
 ScILV6_F: SEQ ID NO: 73
 ScILV6_R: SEQ ID NO: 74

Клонирование фрагментов ПЦР в плазмидные векторы методом сборки Гибсона и трансформация в клетки *E.coli*

Чистые ПЦР-фрагменты клонировали в центромерный однокопийный вектор, содержащий маркер устойчивости kanMX G418. В некоторых случаях гены объединяли для создания плазмид, содержащих более одного гена. pSH67 от Euroscarf (http://www.euroscarf.de/plasmid_details.php?accno=P30673) линейаризовали с помощью PvuII-HF (New England BioLabs) при 37°C в течение 60 мин для удаления Cre-экспрессирующей конструкции. Затем линейаризованную плазмиду лигировали с использованием ДНК-лигазы T7 (New England BioLabs) при 25°C в течение ночи. Лигированной плазмидой трансформировали компетентные клетки NEB 5α *Escherichia coli* (New England BioLabs) и высевали на чашки с агаром с лизогенным бульоном (LB), содержащим ампициллин (100 мкг/мл). Затем эту плазмиду использовали в качестве матрицы для вставки интересующих генов.

Вектор, расщепленный PvuII-HF, и ПЦР-амплифицированные вставки собирали с использованием набора NEBuilder® HiFi для сборки ДНК-конструкций (New England BioLabs). Использовали соотношение вставки к вектору 3:1, и реакцию инкубировали при 50°C в течение 60 мин. Затем реакционной смесью трансформировали компетентные клетки NEB 5α *E.coli* (New England BioLabs) и высевали на чашки с LB-агаром, содержащим ампициллин (100 мкг/мл). Клоны выращивали на жидкой среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) и плазмиду экстрагировали с использованием набора Monarch Plasmid Mini-Prep Kit (New England BioLabs).

Однокопийные плазмиды, созданные в этом исследовании, представляли собой следующие:

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

Трансформация дрожжей с помощью векторов и сконструированные дрожжи

Weihenstephan 34/78 и штамм № 2 из примера 10 (Weihenstephan 34/78 с двумя делетированными копиями гена ILV2 *S. eubayanus*, также называемый WS34/78 [2x ILV2eu]:: Zeo R), трансформировали плазмидами посредством электропорации в соответствии с протоколом, описанным в работе Venatuil et al. 2010. Были внесены некоторые незначительные модификации: дрожжи выращивали при 25°C и восстанавливали в течение 2-3 ч после электропорации, и клетки высевали на чашки с агаром YPD, содержащим генетицин G418 (200 мкг/мл).

Дрожжи, полученные в этом исследовании, показаны в табл. 17 ниже.

Таблица 17. Дрожжи, полученные путем трансформации однокопийных плазмид

Название штамма дрожжей	Предшественник дрожжей	Вставленная плазмида
FGMO100	W34/78	pSH67-ScILV3-ScBAT2
FGMO101	W34/78	pSH67-ScILV6
FGMO102	W34/78	pSH67-ScBAT2
FGMO103	W34/78	pSH67-ScILV3
FGMO104	W34/78	pSH67-нет вставки (Пустая)
FGMO105	W34/78	pSH67-ScILV3-ScBAT1
FGMO0095	WS34/78 [2x ILV2eu]:: Zeo R	pSH67-ScILV6
FGMO0096	WS34/78 [2x ILV2eu]:: Zeo R	pSH67-ScILV3
FGMO0097	WS34/78 [2x ILV2eu]:: Zeo R	pSH67-ScILV3-ScBAT2
FGMO0098	WS34/78 [2x ILV2eu]:: Zeo R	pSH67-ScBAT2
FGMO0099	WS34/78 [2x ILV2eu]:: Zeo R	pSH67-ScILV3-ScBAT1

Пример 12. Оценка свойств ферментации модифицированных штаммов WS34/78.

Штаммы ферментировали в цилиндрических сосудах, как описано ранее. Клетки выращивали в течение ночи в 10 мл жидкой среды YPD, содержащей 25 мкг/мл гентамицина (G418), а затем переносили в 20 мл ранее описанного сула пилснер, содержащего 100 мкг/мл G418. Засев клеток проводили, как описано ранее, в суло пилснер, содержащее 100 мкг/мл G418. Измерения плато, диацетила и летучих веществ проводили на 3-й, 4-й и 5-й дни ферментации. На 5-й день брали образцы для анализа профилей углеводов и профилей сложных эфиров.

Генотипы протестированных штаммов дрожжей показаны в табл. 18 ниже.

Таблица 18. Генетически модифицированные дрожжи, созданные в примерах 10 и 11, протестированные в данном примере

Номер штамма	Характеристика устойчивости	Генотип	Источник
FGMO 0092	G418 устойчивый	WS34/78 Plasmid 0 (pYESVIII; нет вставки) контроль	WS34/78
FGMO 0093	G418 + Зеоцин устойчивый	2x ILV2eu KO:Зеоцин вставка, 1x ILV5ser pYESVIII копия	Штамм #2 из примера 10
FGMO 0094	G418 + Зеоцин + Нурсеотрицин устойчивый	2x ILV2eu KO:Зеоцин вставка, 1x ILV5ser pYESVIII копия, 1x ILV3eu вставка: KO PDC1	Штамм #2 из примера 10
FGMO 0095	G418 + Зеоцин устойчивый	$\Delta\Delta$ Seu ILV2 Sc ILV6-G418	Штамм #2 из примера 10

FGMO 0096	G418 + Зеоцин устойчивый	$\Delta\Delta$ Seu ILV2 Sc ILV3-G418	Штамм #2 из примера 10
FGMO 0100	G418 Устойчивый	WS34/78 Sc ILV3 - Sc BAT 2 - G418	WS34/78
FGMO 0101	G418 Устойчивый	WS34/78 Sc ILV 6 - G418	WS34/78
FGMO 0102	G418 Устойчивый	WS34/78 Sc BAT 2 - G418	WS34/78
FGMO 0103	G418 Устойчивый	WS34/78 Sc ILV 3 - G418	WS34/78
FGMO 0104	G418 Устойчивый	WS34/78 пустой вектор G418	WS34/78
FGMO 0105	G418 Устойчивый	WS34/78 Sc ILV 3 - fBAT 1 - G418	WS34/78

Результаты ферментации с помощью каждого штаммом дрожжей обобщены в табл. 19 и 20 ниже.

Таблица 19. Результаты ферментации с помощью генетически модифицированных дрожжей, созданных в примерах 10 и 11 (общий диацетил)

Номер штамма	Общий диацетил			Плато		
	День 3	День 4	День 5	День 3	День 4	День 5
FGMO0092	319	216	170	10	7,6	5,5
FGMO0093	209	140	94	8,9	6,4	4,8
FGMO0094	184	123	87	9,2	6,4	4,9
FGMO0095	315	191	153	8,9	7,1	6,2
FGMO0096	201	121	97	8,6	5,5	4,4
FGMO0100	329	187	142	7,9	5,1	3,4
FGMO0101	293	167	153	7,6	4,4	3,3
FGMO0102	370	244	269	8	5,1	4,4
FGMO0103	396	234	197	7,8	4,4	4
FGMO0104	265	180	167	7,4	4	3,4
FGMO0105	279	203	154	8,1	4,7	3,5

Таблица 20. Результаты ферментации с помощью генетически модифицированных дрожжей, созданных в примерах 10 и 11 (отношение пропанол/изобутанол). n.m. = не измерено

Номер штамма	Отношение пропанол/изобутанол		Плато		
	День 4	День 5	День 3	День 4	День 5
FGMO0092	1,9	1,6	10	7,6	5,5
FGMO0093	3,04	3,3	8,9	6,4	4,8
FGMO0094	2,92	n.m.	9,2	6,4	4,9
FGMO0095	2,97	2,77	8,9	7,1	6,2
FGMO0096	2,71	2,93	8,6	5,5	4,4
FGMO0100	1,55	1,44	7,9	5,1	3,4
FGMO0101	1,85	1,87	7,6	4,4	3,3
FGMO0102	1,32	1,37	8	5,1	4,4
FGMO0103	1,76	1,68	7,8	4,4	4
FGMO0104	1,69	1,64	7,4	4	3,4
FGMO0105	1,64	1,64	8,1	4,7	3,5

Следует отметить, что генетически сконструированные штаммы из этого примера ферментировали в присутствии антибиотиков, и поэтому вышеприведенные результаты могут немного отличаться от результатов, полученных в случае ферментации штаммов в промышленных условиях без антибиотиков. В частности, вероятно штаммы будут иметь более высокую скорость роста, и поэтому ферментация будет происходить быстрее. Точно так же ожидается, что уменьшение первоначально продуцированного ди-ацетила будет происходить быстрее.

Штаммом с самым низким количеством общего ди-ацетила в тестовом растворе на 5-й день являлся штамм с двумя делетированными копиями гена *ILV2*, дополнительной копией *ILV3*, интегрированной в геном, и дополнительной копией *ILV5*, экспрессируемой из однокопийной плазмиды (FGMO0094).

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:1	<i>ILV2</i> мишень-специфический прямой праймер <i>S. cerevisiae</i> и <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:2	<i>ILV2</i> мишень-специфический обратный праймер <i>S. cerevisiae</i> и <i>S.</i>

	<i>eubayanus</i>
SEQ ID NO:3	<i>S. cerevisiae</i> ILV2 аллель-специфический зонд
SEQ ID NO:4	<i>S. eubayanus</i> ILV2 аллель-специфический зонд
SEQ ID NO:5	ZDA1 ILV2
SEQ ID NO:6	ZDA1 ILV6 -tig00000158
SEQ ID NO:7	ZDA1 ILV6 -tig00002562
SEQ ID NO:8	ZDA1 ILV5 -tig00000010
SEQ ID NO:9	ZDA1 ILV5 -tig00052675
SEQ ID NO:10	ZDA1 ILV3 -tig00000103
SEQ ID NO:11	ZDA1 ILV3 -tig00002552
SEQ ID NO:12	ZDA1 ILV3 -tig00000090
SEQ ID NO:13	ZDA1 ILV3 -tig00000096
SEQ ID NO:14	ZDA1 BAT1 -tig00000105
SEQ ID NO:15	ZDA1 BAT1 -tig00000101
SEQ ID NO:16	ZDA1 BAT1 -tig00052676
SEQ ID NO:17	ZDA1 BAT2 -tig00000102
SEQ ID NO:18	ZDA1 BAT2 -tig00000090
SEQ ID NO:19	ZDA1 BAT2 -tig00002552
SEQ ID NO:20	ZDA2 ILV2
SEQ ID NO:21	ZDA2 ILV6 -tig00015333
SEQ ID NO:22	ZDA2 ILV6 -tig00000147
SEQ ID NO:23	ZDA2 ILV5 -tig00000655
SEQ ID NO:24	ZDA2 ILV5 -tig00000022
SEQ ID NO:25	ZDA2 ILV3 -tig00000088
SEQ ID NO:26	ZDA2 ILV3 -tig00000672
SEQ ID NO:27	ZDA2 ILV3 -tig00000669
SEQ ID NO:28	ZDA2 BAT1 -tig00000115
SEQ ID NO:29	ZDA2 BAT1 -tig00015328
SEQ ID NO:30	ZDA2 BAT2 -tig00000088
SEQ ID NO:31	ZDA2 BAT2 -tig00000669
SEQ ID NO:32	Эталонный ILV2 <i>S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:33	Эталонный ILV6 <i>S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:34	Эталонный ILV5 <i>S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:35	Эталонный ILV3 <i>S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:36	Эталонный BAT1 <i>S. cerevisiae</i>

SEQ ID NO:37	Эталонный BAT2 <i>S. cerevisiae</i>
SEQ ID NO:38	Эталонный ILV2 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:39	Эталонный ILV6 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:40	Эталонный ILV5 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:41	Эталонный ILV3 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:42	Эталонный BAT1 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:43	Эталонный BAT2 <i>S. eubayanus</i>
SEQ ID NO:44	CPA43
SEQ ID NO:45	CPA44
SEQ ID NO:46	CPA49
SEQ ID NO:47	CPA50
SEQ ID NO:48	CPA51
SEQ ID NO:49	CPA52
SEQ ID NO:50	ILV2 (se) нокаутная кассета
SEQ ID NO:51	CPA70
SEQ ID NO:52	CPA71
SEQ ID NO:53	CPA91
SEQ ID NO:54	CPA96
SEQ ID NO:55	CPA111
SEQ ID NO:56	CPA112
SEQ ID NO:57	CPA113
SEQ ID NO:58	CPA114
SEQ ID NO:59	CPA128
SEQ ID NO:60	CPA129
SEQ ID NO:61	ILV3 (se) NTC кассета интеграции
SEQ ID NO:62	CPA74
SEQ ID NO:63	CPA75
SEQ ID NO:64	CPA86
SEQ ID NO:65	CPA87
SEQ ID NO:66	ILV5 (se) кассета экспрессии
SEQ ID NO:67	ScILV3_F
SEQ ID NO:68	ScILV3_R
SEQ ID NO:69	ScBAT1_F
SEQ ID NO:70	ScBAT1_R
SEQ ID NO:71	ScBAT2_F
SEQ ID NO:72	ScBAT2_R
SEQ ID NO:73	ScILV6_F
SEQ ID NO:74	ScILV6_R

Список используемой литературы

Lorenzo Benatuil, Jennifer M. Perez, Jonathan Belk, Chung-Ming Hsieh, An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries, *Protein Engineering, Design and Selection*, Volume 23, Issue 4, April 2010, Pages 155–159, <https://doi.org/10.1093/protein/gzq002>

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

Denis E, Sanchez S, Mairey B et al. Extracting high molecular weight genomic DNA from *Saccharomyces cerevisiae*, *Protocol Exchange* DOI 10.1038/protex.2018.076

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

Gutierrez A, Boekhout T, Gojkovic Z, Katz M. Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages *J Inst Brew* 2018 DOI 10.1002/jib.512

Mumberg D, Müller R, Funk M

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

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм дрожжей, кодирующий в пределах своего генома:

а) не более двух функциональных генов, кодирующих ILV2, где каждый ген, кодирующий ILV2, кодирует ScILV2 с SEQ ID NO: 32 или SeILV2 с SEQ ID NO: 38, или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними; и

б) по меньшей мере пять функциональных генов, где каждый ген, кодирующий ILV3, кодирует ScILV3 с SEQ ID NO: 35 или SeILV3 с SEQ ID NO: 41, или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними.

2. Штамм дрожжей по п.1, где указанный штамм дрожжей кодирует в пределах своего генома по меньшей мере четыре функциональных гена, кодирующих ILV5, где каждый ген, кодирующий ILV5, кодирует ScILV5 с SEQ ID NO: 34 или SeILV5 с SEQ ID NO: 40, или функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними.

3. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где гены, кодирующие ILV2, ILV3 и/или ILV5, экспрессируются из их нативных промоторов.

4. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где гены, кодирующие ILV2, ILV3, ILV5, ILV6, BAT1 и/или BAT2, экспрессируются из их нативных промоторов.

5. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей не подвергался стадии генетического конструирования.

6. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей имеет не более 15 функциональных генов, кодирующих ILV3.

7. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей имеет не более 15 функциональных генов, кодирующих ILV5.

8. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей имеет не более четырех функциональных генов, кодирующих ILV6, где каждый ген, кодирующий ILV6, кодирует ScILV6 с SEQ ID NO: 33 или SeILV6 с SEQ ID NO: 39, или гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними.

9. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей имеет по меньшей мере три функциональных гена, где каждый ген, кодирующий BAT1, кодирует ScBAT1 с SEQ ID NO: 36 или SeBAT1 с SEQ ID NO: 42, или гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними.

10. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей имеет по меньшей мере четыре функциональных гена, где каждый ген, кодирующий BAT2, кодирует ScBAT2 с SEQ ID NO: 37 или SeBAT2 с SEQ ID NO: 43, или гомолог, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью последовательности с ними.

11. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где сумма функциональных генов в указанном штамме дрожжей, кодирующих ILV2 и ILV6, ниже, чем сумма функциональных генов, кодирующих ILV5 и ILV3.

12. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где отношение функциональных генов в указанном штамме дрожжей ILV5 и ILV3 против ILV2 составляет по меньшей мере 1.

13. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где отношение функциональных генов в указанном штамме дрожжей ILV5 и ILV3 против ILV2 и ILV6 составляет по меньшей мере 1.

14. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей несет мутацию в или делецию одного или нескольких генов ILV2 и/или указанный штамм дрожжей несет мутацию сдвига рамки считывания в одном или нескольких генах ILV2 и/или указанный штамм дрожжей несет мутацию, приводящую к снижению или отсутствию экспрессии одного или нескольких генов ILV2.

15. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать ферментированный тестовый раствор при инкубации в тестовом растворе, где тестовый раствор представляет собой экстракт солода и/или злаков, имеющий видимое содержание экстрактивных веществ по меньшей мере 10° Плато, где указанный ферментированный тестовый раствор содержит самое большее 60 ppb диацетила в самый ранний момент времени, когда видимое содержание экстрактивных веществ указанного тестового раствора не уменьшилось более чем на 0,50° Плато за предшествующие 24 ч, при этом указанная ферментация происходит при температуре не выше 18°C.

16. Штамм дрожжей по п.15, где указанный штамм дрожжей способен продуцировать по меньшей мере 4,0 мл/л этанола на °Плато, когда указанный штамм дрожжей инкубируют в указанном тестовом растворе.

17. Штамм дрожжей по любому из предшествующих пунктов, где указанный штамм дрожжей способен расти на среде с мелибиозой в качестве единственного источника углерода.

18. Штамм дрожжей по любому из пп.15-17, где указанный ферментированный водный экстракт содержит не более 60 ppb диацетила.

19. Штамм дрожжей по любому из пп.15-18, где указанный ферментированный водный экстракт содержит по меньшей мере 25 мг/л пропанола.

20. Штамм дрожжей по любому из пп.15-19, где указанный ферментированный водный экстракт содержит не более 8 мг/л изобутанола.

21. Штамм дрожжей по любому из пп.15-20, где указанный ферментированный водный экстракт имеет отношение пропанол:изобутанол, равное по меньшей мере 2,0.

22. Способ получения ферментированного водного экстракта, включающий следующие стадии:

i) обеспечение водного экстракта солода и/или злаков;

ii) обеспечение штамма дрожжей вида *Saccharomyces pastorianus*, где указанный штамм дрожжей соответствует любому из пп.1-21; и

iii) ферментацию водного экстракта, полученного на стадии i), с помощью указанного штамма дрожжей, обеспеченного на стадии ii), с получением таким образом ферментированного водного экстракта.

23. Способ приготовления напитка, включающий следующие стадии:

i) приготовление ферментированного водного экстракта по п.22 и

ii) переработку указанного ферментированного водного экстракта в напиток.

24. Способ по п.23, в котором стадии обработки включают одно или несколько из следующего:

iii) фильтрация,

iv) карбонизация,

v) созревание или

vii) розлив.

25. Напиток, приготовленный с помощью способа по любому из пп. 23-24, где указанный напиток содержит по меньшей мере 25 мг/л пропанола и/или не более 8 мг/л изобутанола.

26. Напиток по п.25, где указанный напиток содержит по меньшей мере 30 мг/л пропанола и/или не более 6 мг/л изобутанола.

27. Напиток по любому из пп.25, 26, где указанный напиток представляет собой пиво.

28. Напиток по любому из пп.25-27, где указанный напиток имеет отношение пропанол:изобутанол, равное по меньшей мере 3,0.

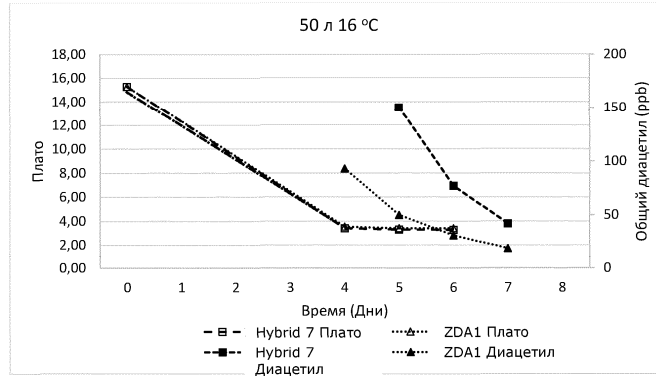
29. Напиток по любому из пп.25-28, где указанный напиток имеет отношение пропанол:изобутанол, равное по меньшей мере 4,0.

30. Напиток по любому из пп.25-29, где указанный напиток имеет отношение пропанол:изобутанол,

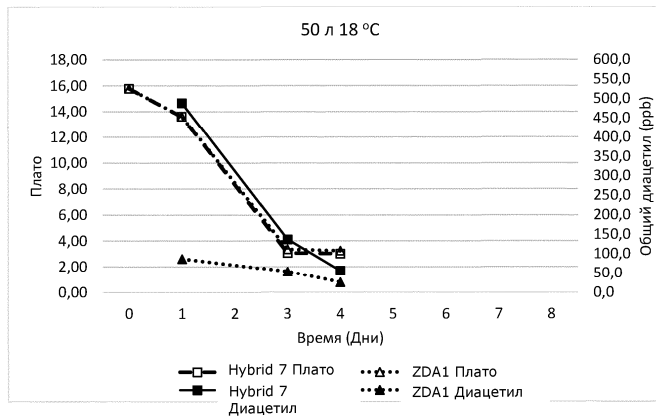
равное по меньшей мере 5,0.

31. Напиток по любому из пп.25-30, где указанный напиток имеет отношение пропанол:изобутанол, равное по меньшей мере 5,5.

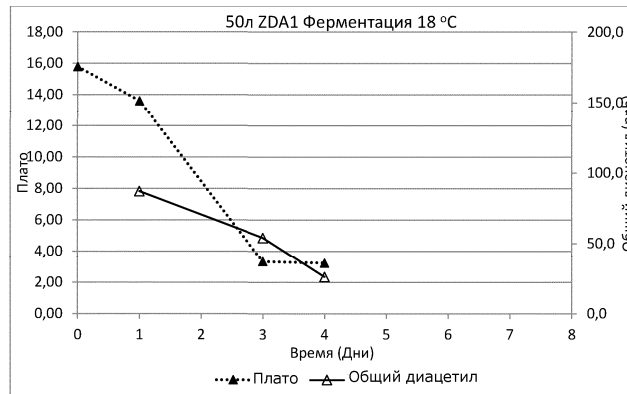
А)



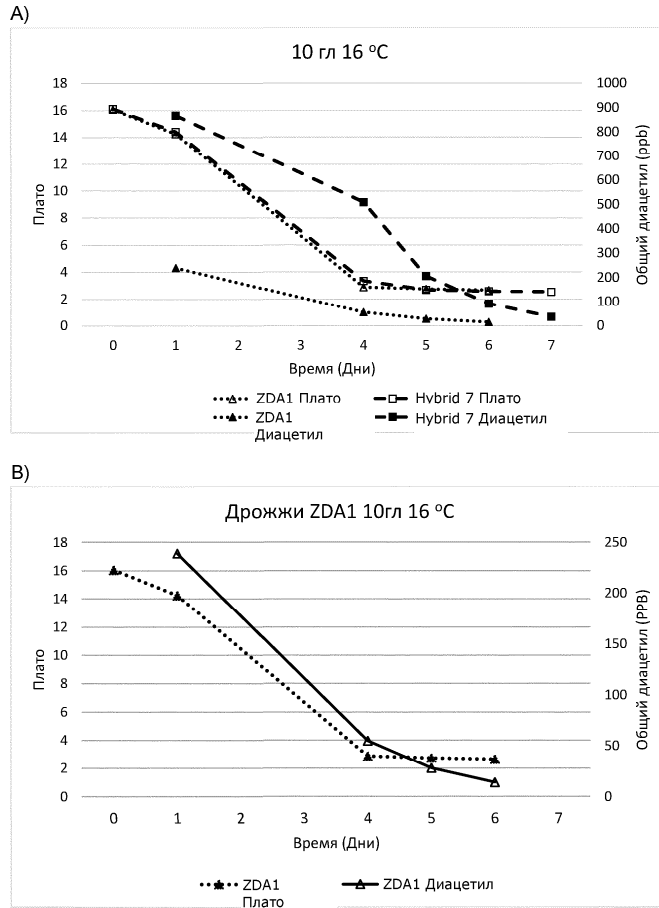
В)



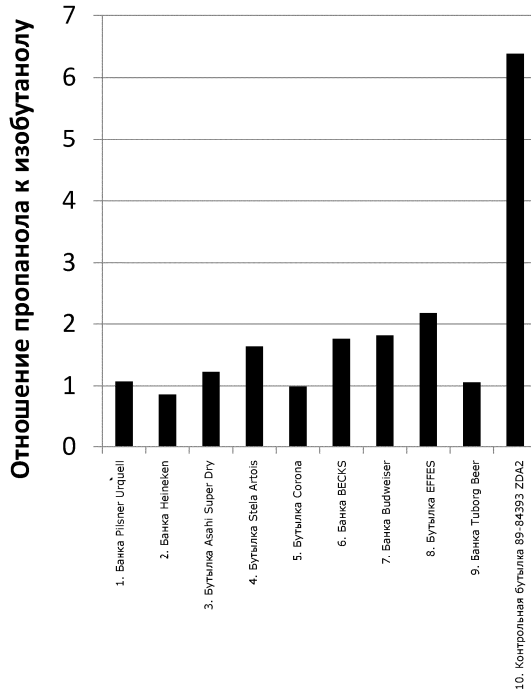
С)



Фиг. 1



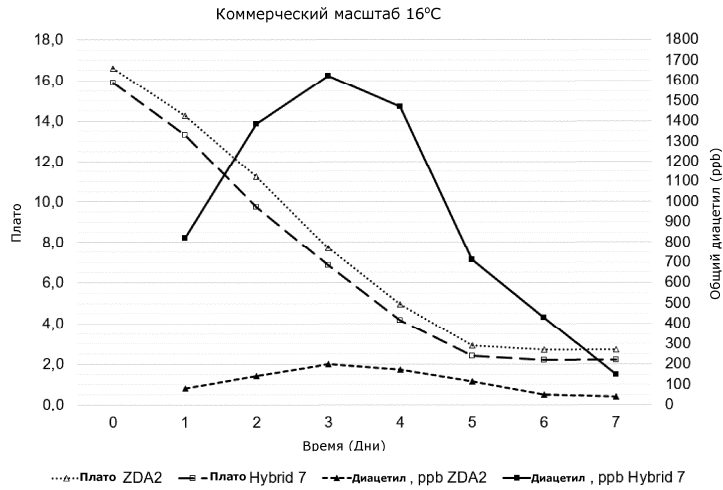
Фиг. 2



Фиг. 3

ZDA2-tig00000088_pilon_selection	GETEHGNWSRVVTDLN-
WS34-78-tig00000158_pilon_select	GETEHGNWSRVVTDLN-
ZDA1-tig00000090_pilon_selection	GETEHGNWSRVVTDLN-
ZDA3_tig00000808_selection	GETEHGNWSRVVTDLN-
ZDA1-tig00000102_pilon_selection	GETEHGNWSRVVTDLN-
BAT2_cer	GETEHGNWSRVVTDLN-
ZDA3_tig00020557_selection	GETEHGNWSRVVTDLN-
ZDA2-tig00000669_pilon_selection	GEVEHGNWSRVITDLN-
WS34-78-tig00000035_pilon_select	GEVEHGNWSRVITDLN-
Hybrid7-tig00000128_pilon_select	GEVEHGNWSRVITDLN-
ZDA1-tig00002552_pilon_selection	GEVEHGNWSRVITDLN-
ZDA3_tig00000210_selection	GEVEHGNWSRVITDLN-
BAT2_eub	GEVEHGNWSRVITDLNX
	** .*****:****

Фиг. 9D



Фиг. 10

