



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

**(45)** Дата публикации  
и выдачи патента: **2017.11.30**

**(21)** Номер заявки: **201170906**

**(22)** Дата подачи: **2009.12.28**

**(51)** Int. Cl. **A01H 5/10** (2006.01)  
**C12C 1/18** (2006.01)  
**C12C 7/00** (2006.01)  
**C12C 12/00** (2006.01)  
**C12N 15/01** (2006.01)

**(54) ЯЧМЕНЬ С УМЕНЬШЕННОЙ ЛИПОКСИГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

**(31)** **РА200801851**

**(32)** **2008.12.30**

**(33)** **DK**

**(43)** **2012.02.28**

**(86)** **PCT/DK2009/050355**

**(87)** **WO 2010/075860 2010.07.08**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**КАРЛСБЕРГ БРЮИРИЗ А/С (DK);**  
**ХЕЙНЕКЕН СЕПЛАЙ ЧЕЙН Б.В. (NL)**

**(72)** Изобретатель:  
**Скадхауге Биргитте, Лок Финн, Бреддам**  
**Клаус, Ольсен Оле, Бек Лене Мельскоу,**  
**Кнудсен Серен (DK)**

**(74)** Представитель:  
**Дементьев В.Н., Клюкин В.А., Угрюмов**  
**В.М., Лыу Т.Н., Гизатуллина Е.М.,**  
**Карпенко О.Ю. (RU)**

**(56)** US-A1-2005204437  
WO-A1-2004011591  
WO-A1-02053721  
HIROTA N. ET AL.: "Brewing performance of malted lipoxygenase-1 null barley and effect on the flavor stability of beer", CEREAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. MINNEAPOLIS, US, vol. 83, no. 3, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 250-254, XP009124704, ISSN: 0009-0352, the whole document  
HOTZEL HELMUT ET AL.: "Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients", EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY, vol. 209, no. 3-4, 1999, pages 192-196, XP002635202, ISSN: 1438-2377  
US-A1-2003167544  
US-A1-2007067871  
US-A1-2006005276  
HIROTA N. ET AL.: "Characterization of lipoxygenase-1 null mutants in barley", THEORETICAL AND APPLIED GENETICS; INTERNATIONAL JOURNAL OF PLANT

BREEDING RESEARCH, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. III, no. 8, November 2005 (2005-11-01), pages 1580-1584, XP019322107, ISSN: 1432-2242, the whole document

KURODA H. ET AL.: "Characterization of factors that transform linoleic acid into di- and trihydroxyoctadecenoic acids in mash", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 93, no. 1, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 73-77, XP002980834, ISSN: 1389-1723, the whole document

MECHELEN VAN J.R. ET AL.: "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TWO LIPOXYGENASES FROM BARLEY", PLANT MOLECULAR BIOLOGY, SPRINGER, DORDRECHT, NL, vol. 39, no. 6, 1 April 1999 (1999-04-01), pages 1283-1298, XP001015731, ISSN: 0167-4412, the whole document

RUTGERSSON A. ET AL.: "OPTIMIZATION OF TEMPERATURE, TIME, AND LACTIC ACID CONCENTRATION TO INACTIVATE LIPOXYGENASE AND LIPASE AND PRESERVE PHYTASE ACTIVITY IN BARLEY (CV. BLENHEIM) DURING SOAKING", CEREAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. MINNEAPOLIS, US, vol. 74, no. 6, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 727-732, XP000867116, ISSN: 0009-0352, the whole document

HUGUES MIREILLE ET AL.: "Two Lipoxygenases from Germinated Barley-Heat and Kilning Stability", JOURNAL OF FOOD SCIENCE, vol. 59, no. 4, 1994, pages 885-889, XP002552212, ISSN: 0022-1147, page 888-889

WAN HENG WANG ET AL.: "Molecular basis of a null mutation in soybean lipoxygenase 2: substitution of glutamine for an iron-ligand histidine", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 91, no. 13, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 5828-5832, XP002175448, ISSN: 0027-8424, the whole document

DROST B.W. ET AL.: "FLAVOR STABILITY", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS, AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS, ST PAUL, MN, US, vol. 48, no. 4, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 124-131, XP000926610, ISSN: 0361-0470, page 129, column 1, last paragraph - page 130, column 1, last paragraph

**(57)** Согласно этому изобретению обеспечен ячмень с полной потерей функциональных липоксигеназных ферментов LOX-1 и LOX-2 и полученные из него продукты растения, такие как солод, приготовленный с использованием зерен ячменя, дефектных в синтезе диоксигенирующих жирные кислоты ферментов LOX-1 и LOX-2. Указанные ферменты ответственны за основные активности, связанные с диоксигенированием линолевой кислоты до 9- и 13-гидропероксиоктадекадиеновой кислоты соответственно. 9-Гидропероксиоктадекадиеновая кислота представляет метаболит пути LOX, который посредством дополнительных ферментативных или спонтанных реакций может приводить к появлению транс-2-ноненаля (T2N). Это изобретение позволяет технологам по производству пива производить пиво, имеющее незначительные уровни затхлых T2N-специфических привкусов даже после продолжительного хранения этого напитка.

Все патентные и непатентные документы, цитируемые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки в их полном объеме.

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Данное изобретение относится к успехам в биотехнологии растений, позволяющим выявить растения ячменя и их продукты, которые являются дефектными в синтезе двух липоксигеназных (LOX) ферментов, LOX-1 и LOX-2, и, следовательно, предоставить новые исходные материалы для различных применений. Указанные исходные материалы, например, используемые в производстве напитков, расширяют область новых производственных возможностей для более определенных сохраняющих вкус сортов пива, которые накапливают удивительно низкие уровни придающего несвойственный пиву привкус соединения транс-2-ноненаля (T2N), с дополнительным преимуществом содержания только низких уровней потенциала T2N.

### **Уровень техники**

Большую часть пива получают на основе ячменя (*Hordeum vulgare*, L.), который является однодольным культурным растением, выращиваемым во многих частях мира. Он разводится не только вследствие его экономической важности в качестве источника промышленных продуктов, таких как пиво, но также в качестве источника корма для животных.

К сожалению, недоступны способы получения трансгенных растений ячменя, которые полностью лишены экспрессии конкретного гена и соответствующего белка. Обычно для ячменя применение антисмысловых способов может быть использовано для генерирования трансгенных растений, которые все еще экспрессируют некоторое количество этого белка (см., например, Robbins et al., 1998; Stahl et al., 2004; Hansen et al., 2007). Эффективные способы для получения специфических мутаций с использованием химерного комплекса РНК/ДНК или сайт-направленного мутагенеза в растениях ячменя также не были разработаны. Фактически, не был опубликован ни один пример успешного олигонуклеотид-направленного нацеливания на ген в ячмене. Iida и Terada (2005) отмечали, что олигонуклеотид-направленное нацеливание на ген прослеживалось в кукурузе, табаке и рисе, но не в ячмене, причем во всех случаях с использованием гена ALS в качестве мишени. Частью заключения этого исследования было то, что следует еще исследовать, может ли эта стратегия с подходящими модификациями быть применима к генам, другим, чем гены, непосредственно отобранные, такие как гены ALS. Нацеленный мутагенез, использующий нуклеазы с "цинковыми пальцами", представляет другой инструмент, который мог бы использоваться в будущем для исследования базовой биологии растений или для модификации культурных растений (Durai et al., 2005; Tzfira and White, 2005; Kumar et al., 2006). В этом случае также мутагенез не исследовался или не был с успехом применен в отношении ячменя.

Однако мутанты ячменя могут быть получены неспецифическим мутагенезом с использованием химической обработки или облучения, например, при помощи азидата натрия ( $\text{NaN}_3$ ; фиг. 1). Одним примером являются зерна ячменя, мутагенизированные  $\text{NaN}_3$  и подвергнутые скринингу на высокие уровни свободного фосфата с целью идентификации низкофитатных мутантов (Rasmussen and Hatzack, 1998); в целом, были идентифицированы 10 мутантов из 2000 подвергнутых скринингу зерен. Однако идентификация конкретного мутанта после обработки  $\text{NaN}_3$  требует эффективного способа скрининга и далеко не всегда является успешной.

В 1970 году молекула, придающая привкус картона пиву, была выделена и идентифицирована как T2N, летучий  $\text{C}_9$ -алкеналь (Jamieson and Gheluwe, 1970). Поскольку уровень порога вкусового ощущения в отношении T2N у людей является крайне низким, ранее определяемым как приблизительно 0,7 нМ или 0,1 частей на миллиард (биллионных частей) (б.д., ppb) (Meilgaard, 1975), продукты даже с незначительными уровнями этого альдегида считаются подвергнутыми старению вследствие несвойственного этому продукту привкуса. Однако уровень T2N является обычно очень низким в свежем пиве (Lermusieau et al., 1999), так что предполагалось, что во время хранения свободный T2N мог выделяться из аддуктов T2N (Nyborg et al., 1999). Эта точка зрения подтверждалась следующим наблюдением, что потенциал T2N в сусле коррелирует с образованием T2N после хранения продукта (Kuroda et al., 2005).

Зерно ячменя содержит три фермента LOX, известных как LOX-1, LOX-2 и LOX-3 (van Mechelen et al., 1999). LOX-1 катализирует образование 9-гидропероксиоктадекадиеновой кислоты (9-HPODE; см. фиг. 2 в отношении частичного обзора LOX-пути) предшественника как T2N, так и тригидроксиоктадеценовых кислот (сокращенно THA) из линолевой кислоты. LOX-2 катализирует в основном превращение линолевой кислоты в 13-HPODE, которая дополнительно метаболизируется в гексаналь,  $\text{C}_6$ -альдегид с порогом вкусового ощущения ~0,4 миллионных частей (м.д., ppm) (Meilgaard, supra). Действие LOX-3, по-видимому, не относится к данному изобретению по двум причинам: уровень соответствующего гена в зерне ячменя является очень низким и специфичность продукта LOX-3 остается неясной.

В поддержку вышеупомянутых данных, несколько сообщений отмечали, что T2N образуется через биохимический путь, включающий в себя превращение линолевой кислоты в 9-HPODE, сначала посредством действия LOX-1 и затем расщеплением 9-HPODE посредством действия 9-гидропероксидлиазы (см., например, Kuroda et al., 2003, 2005; Noordermeer et al., 2001).

По-видимому, не существует корреляции между общей активностью LOX в солоде и потенциалом ноненаля в сусле. Однако были высказаны предположения о существенной корреляции между активно-

стью LOX-1 и потенциалом T2N сусла, прежде всего, поскольку активность LOX-2 считалась стоящей ниже относительно образования потенциала T2N в сусле (Kuroda et al., 2005).

На фиг. 2, как упоминалось выше, показана часть пути LOX, здесь сосредоточенная на биохимических реакциях из линолевой кислоты в T2N. Основная активность фермента LOX-1 относится к превращению линолевой кислоты в 9-HPODE, которая является стоящим ниже по ходу реакции метаболитом биохимического пути, ведущего к образованию T2N. В отличие от этого, основная активность LOX-2 относится к превращению линолевой кислоты в 13-HPODE, которая отделяется от вышеупомянутого биохимического пути к T2N. Примечательно, что ферменты LOX-1 и LOX-2 могут использовать линоленовую кислоту в качестве субстрата, но эта активность находится вне объема данного документа, так как соответствующие пути не приводят к образованию T2N.

Предполагается, что LOX-1 способствует главной активности LOX в солоде (см., например, Kuroda et al., 2003).

Были получены несколько различных растений ячменя, которые характеризуются уменьшениями или отсутствием активности LOX-1. Например, зерна ячменя и растения ячменя, имеющие низкую активность LOX-1, были описаны в заявке PCT WO 02/053721, Douma, A.C. et al. В WO 2005/087934, Breddam, K. et al., внимание было сосредоточено на двух разных мутантах ячменя, дефектных в активности LOX-1 - сплайсинговом мутанте и мутанте с преждевременным стоп-кодоном трансляции. Они были идентифицированы после размножения и скрининга мутированных растений, как показано на фиг. 1. Хотя вышеупомянутые мутанты идентифицировали скринингом  $\text{NaN}_3$ -мутагенизированного ячменя, Hirota, N. et al., описывали в EP 1609866 растение ячменя без активности LOX-1, которое было идентифицировано скринингом коллекции местных сортов.

Известны несколько примеров мутированных растений, которые синтезируют низкие уровни LOX. Однако не было описано ни одно растение ячменя, дефектное в отношении активностей как LOX-1, так и LOX-2. Способы для возможности генетической манипуляции растений часто являются специфическими в отношении конкретного типа растения, и, следовательно, несмотря на то, что известно, что некоторые растения риса, растения сои или растения *Arabidopsis* содержат низкие уровни LOX, способы получения таких растений не могут быть использованы в генерировании растений ячменя с низкой активностью LOX или без активности LOX. Кроме того, мутанты LOX одного вида растения могут иметь отличающиеся свойства в сравнении с мутантами LOX другого вида растения.

### Сущность изобретения

Сусло является комплексной ключевой жидкостью в производстве напитков на основе солода, таких как пиво (см. фиг. 3, которая обеспечивает схему всего процесса приготовления пива). Сусло, приготовленное из растений ячменя с дефицитом активности LOX-1, действительно характеризуется содержанием существенных уровней потенциала T2N, хотя указанный уровень является более низким, чем уровень в сусле, приготовленном из ячменя дикого типа. Поскольку указанный потенциал в сусле коррелирует с T2N, образованным в пиве после хранения (Kuroda et al., 2005), существует, следовательно, потребность в растениях ячменя, применимых в производстве сусла с существенно уменьшенным уровнем потенциала T2N.

Были описаны способы уменьшения активности LOX-1 тепловой обработкой. Однако тепловая обработка обычно предпринималась во время получения солода и/или приготовления сусла, и, следовательно, продукты активности LOX могли накапливаться в ячмене до проведения этой тепловой обработки. Анализ ячменя выявил, что существенные количества продуктов активности LOX присутствовали в ячмене, даже перед приготовлением солода (Wackerbauer and Meyna, 2002).

Данное изобретение обеспечивает растения ячменя с дефицитом активностей LOX-1 и LOX-2 и раскрывает, что указанные растения ячменя имеют несколько значительных, неожиданных преимуществ. Как упоминалось здесь выше, Kuroda et al. (supra) описывали отсутствие корреляции между активностью LOX в солоде и потенциалом T2N в сусле и относили это к присутствию активности LOX-2. В соответствии с этим Kuroda et al. (2005) предполагал незначительную роль LOX-2 в отношении образования потенциала T2N.

Исследователи пивоварения неправильно истолковывали образование свободного T2N и потенциала T2N. Поэтому является неожиданным и возможно ошеломляющим, когда данное изобретение обеспечивает экспериментальное доказательство для раскрытия преимущественного эффекта использования растений ячменя с дефицитом активности как LOX-1, так и LOX-2 для получения сусла, которое обнаруживает очень низкие уровни потенциала T2N. Было также обнаружено, что уровень свободного T2N в сусле, приготовленном из растений ячменя с дефицитом активности как LOX-1, так и LOX-2, был более низким, чем в сусле, приготовленном из null-LOX-1-ячменя.

Одной целью данного изобретения является обеспечение напитков, приготовленных из растения ячменя или его части, где указанный напиток содержит очень низкие уровни потенциала T2N и где указанное растение ячменя или его часть содержит первую мутацию, которая приводит к полной потере функции активности LOX-1, например полной потере функционального фермента LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-2, например полной потере активного фермента LOX-2.

Это изобретение нацелено также на обеспечение растений ячменя, применимых в приготовлении напитков этого изобретения. Таким образом, это изобретение описывает генерирование растений ячменя или их частей, содержащих первую мутацию, которая приводит к полной потере функции активности LOX-1, например полной потере функционального фермента LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-2, например полной потере активного фермента LOX-2.

Кроме того, это изобретение обеспечивает продукты растения, содержащие переработанное растение ячменя или его часть, где указанное растение содержит первую мутацию, которая приводит к полной потере функции активности LOX-1, например полной потере функционального фермента LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-2, например полной потере активного фермента LOX-2. Без ограничений, вышеупомянутые продукты растения могут быть, например, композицией солода или композицией суслу, или напитком (таким как напиток на основе солода, например пиво, или неалкогольные напитки на основе солода), или напитком на основе ячменя, или напитком на основе смеси солода и ячменя и необязательно других ингредиентов. Продукты растения могут быть также ячменными сиропами, солодовыми сиропами, ячменными экстрактами и солодовыми экстрактами.

Кроме того, это изобретение относится также к способам получения напитка, характеризующегося очень низким уровнем потенциала T2N, предусматривающим следующие стадии:

(i) приготовление композиции, содержащей растение ячменя или его части, содержащие первую мутацию, которая приводит к полной потере функции активности LOX-1, например полной потере функционального фермента LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функционального LOX-2, например полной потере активного фермента LOX-2;

(ii) переработка композиции (i) в напиток;

с получением посредством этого напитка, характеризующегося очень низким уровнем потенциала T2N.

Это изобретение относится также к растениям ячменя, которые, помимо содержания первой мутации, приводящей к полной потере функции активности LOX-1, и второй мутации, приводящей к полной потере функции активности LOX-2, также содержат одну или несколько дополнительных полезных мутаций.

### Описание фигур

Фиг. 1 показывает один пример того, как могут быть размножены  $\text{NaN}_3$ -мутагенизированные зерна ячменя. Зерна генерации M0 растут до растений, которые развивают зерна генерации M1. Они могут быть посеяны для развития в растения генерации M2. Затем растения M2 растут и образуют зерна генерации M3. Зерна генерации M3 могут проращиваться, например, для анализа колеоптилей проросших растений M3. Дополнительно, цветки, полученные из зерен растений M3, могут быть использованы в скрещиваниях с линиями или культиварами ячменя для получения растений генерации M4. Сходная фигура представлена на фиг. 1A в заявке на патент PCT WO 2005/087934, Breddam, K. et al.

Фиг. 2 показывает схематическую иллюстрацию биохимического пути для превращения и деградации линолевой кислоты до T2N. LOX-1 сначала катализирует превращение линолевой кислоты в 9-HPODE, которая ферментативно деградируется до цис-ноненаля. Это соединение подвергается спонтанной химической изомеризации до T2N. LOX-2 сначала катализирует превращение линолевой кислоты в 13-HPODE, которая может быть превращена в 2-E-гексаналь (не показано).

Фиг. 3 показывает упрощенное схематическое представление предпочтительного способа приготовления пива, предусматривающего замачивание зерна ячменя (1), получение солода (соложение) (2), печную сушку (3), измельчение высушенного солода (4), затираание (5), фильтрование (6), кипячение суслу в присутствии добавленных высушенных шишек хмеля (7), ферментацию в присутствии дрожжей (8), выдержку (созревание) пива (9), фильтрование пива (10), затаривание, например затаривание в бутылки, банки для пива или т.п. (11) и этикетирование (прикрепление ярлыка) (12). Эти отдельные процессы могут быть сгруппированы в секции, предусматривающие получение солода (соложение) (1-3), приготовление суслу (4-7), ферментацию (8-9) и получение готового пива (10-12). Хотя проиллюстрирован предпочтительный способ, могут быть рассмотрены другие способы, которые лишены некоторых из описанных стадий (может быть, например, опущено фильтрование или добавление высушенных шишек хмеля, или могут быть добавлены дополнительные стадии, такие как добавление добавок, сахаров, сиропов или карбоната).

Фиг. 4 показывает результаты сравнения общих активностей LOX в проросших зернах генерации M3 (A), генерации M4 (B) и генерации M5 (C). Указанные активности измеряли в экстрактах зародышей, которые выделяли из проросших зерен двойного null-LOX-мутанта A689, null-LOX-1-мутанта D112 и null-LOX-1-линии скрещивания Ca211901. Аликвоты инактивированных тепловой обработкой экстрактов тех же самых проб служили в качестве экспериментальных контролей [в C: null-LOX-1 исходный мутант D112 (\*), null-LOX-1 линия скрещивания Ca211901 (\*\*)]. Показаны также генотипы LOX-1 и LOX-2 анализированных проб растений (wt: дикий тип).

Фиг. 5 показывает хроматограммы ВЭЖХ-анализов, используемых для анализа на образование 9- и 13-HPODE в 48-часовых проращиваемых зародышах ячменя. Эти HPODE детектировали измерением оптической плотности при 234 нм, причем результаты представлены в виде относительных единиц оптической плотности (AU). Пики профилей элюции, которые соответствуют 9- и 13-HPODE, указаны стрел-

ками.

(А) Хроматограмма стандартов 9- и 13-НРОДЕ.

(В) Хроматограмма НРОДЕ, образованных в экстрактах, приготовленных из проросших зародышей null-LOX-1-мутанта D112.

(С) Хроматограмма НРОДЕ, образованных в экстрактах, приготовленных из проросших зародышей двойного null-LOX-мутанта A689, генерации M4.

Фиг. 6 показывает хроматограммы ВЭЖХ-анализов, используемых для анализа на образование 9- и 13-НРОДЕ в 72-часовых микроосоложенных зернах. Эти НРОДЕ детектировали измерением оптической плотности при 234 нм, причем результаты представлены в виде относительных единиц оптической плотности (AU). Пики профилей элюции, которые соответствуют 9- и 13-НРОДЕ, указаны стрелками.

(А) Хроматограмма 9- и 13-НРОДЕ, образованных в сорте Barke дикого типа.

(В) Хроматограмма НРОДЕ, образованных в экстрактах зародышей null-LOX-1-мутанта D112.

(С) Хроматограмма НРОДЕ, образованных в экстрактах двойного null-LOX-мутанта A689, генерации M5.

Фиг. 7 показывает уровни свободного T2N, образованного в микроосоложенных пробах ячменя культивара Power дикого типа, null-LOX-1-мутанта D112, и трех потенциальных двойных null-LOX-линий мутанта A689, генерации M5. Включены также генотипы LOX-1 и LOX-2 анализируемых проб ячменя (wt: дикий тип).

Фиг. 8 показывает уровни свободного T2N, образованного в пробах прокипяченного сусла, полученного из микроосоложенных зерен культивара Power дикого типа, null-LOX-1-мутанта D112, и двойного null-LOX-мутанта A689, генерации M5. Показаны также генотипы LOX-1 и LOX-2 анализируемых проб ячменя (wt: дикий тип).

Фиг. 9 показывает уровни предшественников T2N в пробах прокипяченного сусла, полученного из микроосоложенных зерен культивара Power дикого типа, null-LOX-1-мутанта D112, и двойного null-LOX-мутанта A689, генерации M5.

Фиг. 10 показывает уровни предшественников T2N в пиве, полученном в большом эксперименте с объемом 200 л, с использованием культивара Power дикого типа, null-LOX-1-мутанта D112, и двойного null-LOX-мутанта A689 M5. Показаны также генотипы LOX-1 и LOX-2 используемых солодов (wt: дикий тип).

Фиг. 11 показывает сравнение уровней свободного T2N в аликвотах указанных проб, взятых из больших прокипяченных сусел 200 л, полученных варкой пива из ячменя или обычным соложением и затиранием. Показаны также генотипы LOX-1 и LOX-2 используемых исходных материалов (wt: дикий тип).

Фиг. 12 показывает сравнение уровней предшественников T2N в указанных аликвотах проб, взятых из больших кипяченных сусел 200 л (ср. фиг. 11), полученных либо варкой пива из ячменя, либо с использованием обычного соложения и затирания. Показаны также генотипы LOX-1 и LOX-2 используемых исходных материалов (wt: дикий тип).

Фиг. 13 показывает аспекты развития T2N в пиве из крупномасштабных (200 л) испытаний варки пива с использованием указанного культивара ячменя и мутантов в качестве исходных материалов (сырья).

(А) Анализы только пива, полученного варкой из ячменя, сфокусированные на развитии свободного T2N во время искусственного старения. Уровень порога вкусового ощущения T2N при 50 тысячных долях (т.д., ppt) указан горизонтальной пунктирной линией. В отдельном эксперименте сравнивали уровни предшественников T2N в пробах свежего пива из ячменя и пробах обычного пива.

(В), (С) Уровни свободного T2N в пробах свежего пива (белые столбцы) в сравнении с уровнями спустя две недели при 37°C (черные столбцы). Показаны также генотипы LOX-1 и LOX-2 используемых исходных материалов (wt: дикий тип).

Фиг. 14 показывает сравнение уровней ТНА и отношений как в пиве, сваренном из ячменя (А), так и в пиве, полученном с использованием обычного солода (В). 9,12,13- и 9,10,13-ТНА генерируются частично неизвестными реакциями пути LOX-1 и LOX-2 соответственно.

Фиг. 15 показывает иллюстрацию относительно развития с течением времени "бумажного" привкуса (А) и привкуса "старости" (В) пива, полученного варкой пива из ячменя в масштабе 200 л, с использованием исходных материалов культивара Power (черные столбцы), null-LOX-1 (серые столбцы) и двойного null-LOX (белые столбцы). Специализированная дегустационная комиссия по сенсорной оценке качества пива оценивала эти типы пива с использованием шкалы от 0 (без привкуса) до 5 (крайняя степень привкуса).

Фиг. 16 показывает, как развивается пена в сваренных из ячменя типах пива (А) и в типах пива на основе солода (В). В обоих экспериментах коммерческое пиво лагер служило в качестве эталона (толстая пунктирная линия), в сравнении с пивом, полученным с использованием в качестве исходных материалов культивара Power (тонкая пунктирная линия), null-LOX-1- (тонкая непрерывная линия) и двойного null-LOX-мутанта (толстая непрерывная линия).

Фиг. 17 показывает карту организации геномного гена ячменя для LOX-2, фокусируясь на области, охватывающей стартовый кодон (ATG) и стоп-кодон (TAA). Было обнаружено, что эта последовательность из 3229 п.н. (bp) состоит из 6 экзонов (черные боксы) и 5 интронов (линии). Мутация, идентифицированная в гене LOX-2 двойного null-LOX-мутанта A689, указана вертикальной стрелкой. Следует отметить, что двойной null-LOX-мутант A689 содержит также преждевременный стоп-кодон трансляции в гене для LOX-1 (ср. мутант D112, иллюстрированный на фиг. 15 патента США № 7420105).

Фиг. 18 показывает, каким образом анализ генотипа может быть использован для идентификации null-LOX-мутантов. Внимание сосредоточивается на детектировании с использованием SNP двойного null-LOX-растения ячменя, т.е. пути для достижения объединенного детектирования мутации G→A в положении 3474 гена LOX-1 и мутации G→A в положении 2689 гена LOX-2.

(А) Диаграмма электрофореза в агарозном геле ПЦР-фрагментов, амплифицированных из указанной матричной ДНК с использованием указанных пар праймеров, т.е. ген LOX-2 дикого типа может быть амплифицирован с использованием праймеров FL1035 и FL1039, тогда как мутантный ген null-LOX-2 может быть амплифицирован с использованием праймеров FL1034 и FL1039.

(В) Диаграмма для иллюстрации, каким образом ПЦР с парой праймеров FL820 и FL823 (содержащих 3'-основание, комплементарное null-LOX-1-специфической мутации, показанной звездочкой) и парой праймеров FL1034 (содержащих 3'-основание, комплементарное null-LOX-2-мутации, иллюстрируемой звездочкой) и FL1039 могут генерировать ПЦР-продукты 166 п.н. и 200 п.н., соответственно, при условии присутствия указанных null-LOX-мутаций.

(С) Изображение результата после электрофореза в агарозном геле маркерной ДНК (дорожки 1 и 4) и изображение ПЦР-амплифицированной ДНК двойного null-LOX-мутанта A689 с использованием вышеуказанных комбинаций праймеров для детектирования null-LOX-1- и null-LOX-2-мутаций (дорожка 2). Реакции ПЦР ячменя дикого типа не давали соответствующих продуктов ПЦР (дорожка 3).

Фиг. 19 показывает пример анализа с использованием SNP растений-потомков из скрещиваний с двойным null-LOX-ячменем.

(А) Схематическое представление с использованием комбинаций праймеров, детализированных в подписи к фиг. 18, представленной здесь выше, т.е. праймеров для детектирования на основе ПЦР null-LOX-1- и null-LOX-2-мутаций. Первая дорожка слева с распределением полос "а", как отмечено под дорожкой, не содержит специфического ПЦР-продукта для присутствия этих двух мутаций [т.е. обе области матрицы имели последовательности дикого типа (W)], тогда как следующая дорожка с распределением полос "b" ясно показывает ПЦР-продукт, полученный из null-LOX-1-мутантного растения (M). Третья дорожка с распределением полос "с" получена из null-LOX-2-растения, и растение в четвертой дорожке с распределением полос "d" является двойным null-LOX растением.

(В) Электрофорез в агарозном геле дикого типа, генотипов ячменя null-LOX-1-, null-LOX-2- и двойного null-LOX-генотипов ячменя. Анализ распределений полос, в соответствии с анализом, описанным выше в (А), выявил, что дорожки 2, 6, 10, 12, 18 и 22 содержали амплифицированные продукты из растений, несущих null-LOX-1 мутацию (отмеченную "b" под этими дорожками), тогда как дорожки 1, 3, 9, 11, 19, 21 и 23 содержали продукты из растений, несущих null-LOX-2-мутацию (отмеченную "с" под этими дорожками). Дорожки 7, 15 и 17 содержали ПЦР-продукты из растений с двойной null-LOX-мутацией, несущих объединенные LOX-1- и LOX-2-мутации генов (отмеченные "d" под этими дорожками). И дорожки 4, 5, 8, 13, 14, 16 и 20 не содержали продуктов амплификации из растений, не несущих ни одного из null-LOX-аллелей (отмеченные "а" под этими дорожками), т.е. эти растения были растениями дикого типа относительно испытываемых последовательностей. Маркерная ДНК разделяется в дорожке, отмеченной "MW".

### Подробное описание изобретения

Определения.

В этом описании фигуры и таблицы, которые следуют далее, используют ряд терминов. Для обеспечения описаний и пунктов формулы изобретения, включающих объем, который должен придаваться такими терминами, обеспечены следующие определения:

В данном контексте термин "в единственном числе" может обозначать один или несколько, в зависимости от контекста, в котором он используется.

Термин "агрономический признак" описывает фенотипический или генетический признак растения, который способствует производительности или экономической ценности указанного растения. Такие признаки включают в себя устойчивость к болезням, устойчивость к насекомым, устойчивость к вирусам, устойчивость к нематодам, засухоустойчивость, высокую солеустойчивость, урожай, высоту растений, дни до созревания, сортировку по качеству зерна (т.е. фракционирование по размеру зерна), содержание азота в зерне и т.п.

Под "антисмысловой нуклеотидной последовательностью" имеют в виду последовательность, которая находится в обратной ориентации относительно нормальной кодирующей 5'-3'-ориентации этой нуклеотидной последовательности. При присутствии в растении эта антисмысловая ДНК-последовательность предпочтительно уменьшает нормальную экспрессию этой нуклеотидной последо-

вательности для эндогенного гена и может нарушать продуцирование соответствующего нативного белка. В растениях ячменя экспрессия антисмысловых нуклеотидов обычно только уменьшает экспрессию, но не предотвращает экспрессию указанного нативного белка.

Термин "ячмень" в ссылке на процесс приготовления пива и напитков на основе ячменя, в частности, при использовании для описания процесса получения солода означает зерна ячменя. Во всех других случаях, если нет других указаний, "ячмень" обозначает растение ячменя (*Hordeum vulgare*, L.), в том числе любую селекционную линию или культивар или сорт, тогда как часть растения ячменя может быть любой частью растения ячменя, например любой тканью или любыми клетками.

Под термином "устойчивость к болезням" имеется в виду, что эти растения избегают симптомов болезни, которые являются результатом взаимодействий растение-патоген. Таким путем осуществляется предотвращение вызывания болезней и ассоциированных с болезнями симптомов патогенами.

Альтернативно, симптомы болезни, вызываемые этим патогеном, минимизируются или уменьшаются или даже предотвращаются.

В данном контексте термин "двойная null-LOX-мутация" относится к полной потере функции активности LOX-1 и полной потере функции активности LOX-2. Таким образом, "двойная null-LOX-мутация" может характеризоваться полной потерей функционального LOX-1-фермента и полной потерей функционального LOX-2-фермента. Таким образом, "растение ячменя с двойной null-LOX-мутацией" является растением ячменя, содержащим первую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-2. Таким образом, "растение ячменя с двойной null-LOX-мутацией" может характеризоваться полной потерей функционального фермента LOX-1 и полной потерей функционального фермента LOX-2. Подобным образом, "зерна с двойной null-LOX-мутацией" являются зернами, содержащими первую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-2, и т.д. Таким образом, "зерна с двойной null-LOX-мутацией" могут характеризоваться полной потерей функционального фермента LOX-1 и полной потерей функционального фермента LOX-2.

"Злаковое" растение определяется здесь как член семейства растений Graminae, культивируемый, прежде всего, для получения крахмалсодержащих семян или зерен. Злаковые растения включают в себя, но не ограничиваются ими, ячмень (*Hordeum*), пшеницу (*Triticum*), рис (*Oryza*), кукурузу (*Zea*), рожь (*Secale*), овес (*Avena*), сорго (*Sorghum*) и Тритикале, гибрид рожь-пшеница.

Под "кодирующей" или "кодируемой" в контексте описываемой нуклеиновой кислоты имеют в виду содержание информации для трансляции в указанный белок. Нуклеиновая кислота или полинуклеотид, кодирующие белок, могут содержать нетранслируемые последовательности, например интроны, в транслируемых областях этой нуклеиновой кислоты или могут быть лишены таких промежуточных нетранслируемых последовательностей, например в кДНК. Информация, при помощи которой кодируется белок, описывается с использованием кодонов.

В применении здесь "экспрессия" в контексте нуклеиновых кислот должна пониматься как транскрипция и накопление смысловой мРНК или антисмысловой РНК, происходящих из фрагмента нуклеиновой кислоты. Термин "экспрессия", используемый в контексте белков, относится к трансляции мРНК в полипептид.

Термин "ген" означает сегмент ДНК, участвующий в продуцировании полипептидной цепи; он включает области, предшествующие кодирующей области и следующие за кодирующей областью (промотор и терминатор). Кроме того, гены растений обычно состоят из экзонов, прерываемых интронами. После транскрипции в РНК интроны удаляются сплайсингом для генерирования зрелой мессенджер-РНК (мРНК). "Сайты сплайсинга" между экзонами и интронами обычно определяются консенсусными последовательностями, действующими в качестве сигналов сплайсинга для процесса сплайсинга, состоящего из делеции интрона из первичного РНК-транскрипта, и соединения или слияния концов оставшейся РНК на любой стороне вырезанного интрона. В некоторых случаях альтернативные или отличающиеся паттерны сплайсинга могут генерировать различные белки из одного и того же отрезка ДНК. Нативный ген может называться "эндогенным геном".

В данном контексте "гетерологичный" в ссылке на нуклеиновую кислоту обозначает нуклеиновую кислоту, которая происходит из чужеродного вида, или, если она происходит из того же самого вида, является существенно модифицированной относительно ее нативной формы по составу и/или геномному локусу преднамеренным вмешательством человека.

Термин "прорастание" обозначает в данном контексте начало или возобновление роста зерном ячменя в различных композициях, таких как обычная почва, обнаруживаемая в природе. Таким образом, прорастающий зародыш является зародышем, подвергаемым прорастанию. Прорастание может происходить также в почве вегетационных сосудов, помещенных в камеры для выращивания и т.п., или, например, происходит на влажной фильтровальной бумаге, помещенной в стандартные лабораторные чашки, или во время соложения (приготовления солода) (например, в замочных танках или в аппаратах для проращивания (солодорастильных аппаратах) заводов по приготовлению солода). Проращивание обычно включает в себя гидратацию зерен, набухание зерен и индуцирование роста зародыша. Факторы окру-

жающей среды, влияющие на прорастание, включают в себя влажность, температуру и уровни кислорода. Наблюдается развитие корней и побегов.

В данном контексте термин "изолирован (выделен)" обозначает, что материал удален из его исходной среды. Например, природно-встречающийся полинуклеотид или полипептид, присутствующие в живом организме, не являются изолированными, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенный от некоторых или всех сосуществующих материалов в природной системе, является изолированным (выделенным). Такие полинуклеотиды могли бы быть частью вектора и/или такие полинуклеотиды или полипептиды могли бы быть частью композиции и все еще быть изолированными, так как такой вектор или такая композиция не является частью природного окружения.

Термин "зерно" включает в себя зерновку злаков, также называемую внутренним семенем, нижней цветковой чешуей и верхней цветковой чешуей. В большинстве сортов ячменя нижняя чешуя и верхняя чешуя прикреплены к зерновке и являются частью зерна после обмолота. Однако существуют также сорта голозерного ячменя. В них зерновка не содержит нижней чешуи и верхней чешуи и высвобождается при обмолоте, как в случае пшеницы. Термины "зерновки" и "зерно" используются здесь взаимозаменяемо.

"Развитие зерна" относится к периоду, начинающемуся с оплодотворения яйцеклетки клеткой пыльцы. Во время оплодотворения метаболические запасы, например, сахара, олигосахариды, крахмал, фенольные соединения, аминокислоты и белки депонируются, с нацеливанием на вакуоль или без нацеливания на вакуоль, в различные ткани в эндосперме зерна (семени), семенной оболочке (тесте), алевро-не и щитке, приводя к увеличению зерна (семени), наливу зерна (семени)? и процесс заканчивается обезвоживанием зерна (семени).

Термин "полная потеря функции" относится к отсутствию конкретной ферментативной активности. Таким образом, растение ячменя с "полной потерей функции" активности LOX-1 и LOX-2 является растениями ячменя без детектируемых активностей LOX-1 и LOX-2. В контексте данного изобретения активности, LOX-1 и LOX-2 определяют процедурой анализа, определяющей образование 9-HPODE и 13-HPODE из линолевой кислоты, даже хотя LOX-1 и LOX-2 могут иметь и другие активности. Предпочтительно образование 9-HPODE и 13-HPODE из линолевой кислоты определяют, как описано в примере 4 здесь ниже. Эта активность должна определяться с использованием экстрактов белка прорастающих зародышей. В контексте данного изобретения генерирование пика хроматограммы, соответствующего менее чем 5%, предпочтительно менее чем 3% пика 9-HPODE стандарта, показанного на фиг. 5А, и/или пика, соответствующего менее чем 5%, предпочтительно менее чем 3% пика 13-HPODE стандарта, показанного на фиг. 5А, при использовании линолевой кислоты в качестве субстрата, рассматривается как недетектируемая активность LOX-1 и LOX-2, при использовании анализа, описанного в примере 4. Молекулярные подходы к получению полной потери функции активности LOX предусматривают генерирование мутаций, которые либо вызывают полное отсутствие транскриптов для указанного фермента, полное отсутствие соответствующего кодируемого фермента, либо мутаций, которые полностью инактивируют этот кодируемый фермент.

Термин "активность LOX-1" относится к ферментативной активности фермента LOX-1 ячменя. Конкретно, в контексте данного изобретения "активность LOX-1" является катализируемым ферментом диоксигенированием линолевой кислоты в 9-HPODE и в гораздо меньшей степени в 13-HPODE. Даже хотя фермент LOX-1 способен катализировать другие реакции, для цели определения активности LOX-1 в соответствии с данным изобретением следует рассматривать только активности образования 9- и 13-HPODE. Фиг. 2 изображает биохимический путь, при котором линолевая кислота превращается в 9-HPODE.

Термин "активность LOX-2" относится к ферментативной активности фермента LOX-2 ячменя. Конкретно, в контексте данного изобретения "активность LOX-2" является катализируемым ферментом диоксигенированием линолевой кислоты в 13-HPODE и в гораздо меньшей степени в 9-HPODE. Даже хотя фермент LOX-2 способен катализировать другие реакции, для цели определения активности LOX-2 в соответствии с данным изобретением следует рассматривать только активности образования 13- и 9-HPODE. Фиг. 2 изображает биохимический путь, при котором линолевая кислота превращается в 13-HPODE.

Термин "солодовый напиток" или термин "напиток на основе солода" относится к напиткам, приготовленным с использованием солода, предпочтительно напиткам, приготовленным способом, предусматривающим стадию инкубирования солода с горячей водой. Солодовый напиток может быть, например, пивом или мальтинами.

Термин "ферментированный солодовый напиток" относится к солодовым напиткам, которые были ферментированы, т.е. инкубированы с дрожжами.

"Соложение" является особой формой прорастания зерен ячменя, имеющей место при контролируемых условиях среды, включающих замочные танки и солодорастильные аппараты завода по приготовлению солода. В соответствии со способом данного изобретения приготовление солода начинается во время замачивания и/или после того, как зерна ячменя были замочены. Этот способ приготовления солода может быть остановлен высушиванием зерен ячменя, например, в способе с использованием печной

сушки. В случае когда солод не был подвергнут печной сушке, он называется "свежепроросшим (зеленым) солодом".

Считается, что композиция, приготовленная из ячменя с двойной null-LOX-мутацией, содержит солод с двойной null-LOX-мутацией, такой как чистый солод с null-LOX-мутацией или любая смесь солода, содержащая солод с двойной null-LOX-мутацией. Солод может быть переработан, например, размалыванием и, следовательно, называться "размолотым солодом" или "солодовой мукой".

"Затирание" является инкубацией размолотого солода в воде. Затирание предпочтительно выполняют при конкретной температуре и в конкретном объеме воды. Температура и объем воды являются важными, так как они влияют на скорость уменьшения активности ферментов, происходящих из этого солода, и, следовательно, особенно на величину гидролиза крахмала, который может иметь место; может быть также важным действие протеаз. Затирание может происходить в присутствии добавок, под которыми имеется в виду любой источник углеводов, отличный от солода, такой как, но не только, ячмень (в том числе ячмень с двойной null-LOX-мутацией), сиропы из ячменя, или кукурузы, или риса в виде либо целых зерен, либо переработанных продуктов, таких как крупки или крахмал. Все из вышеупомянутых добавок могут быть использованы преимущественно в качестве дополнительного источника экстракта (сиропы обычно вводят во время кипячения сусла). Эти требования в отношении переработки добавки на пивоваренном заводе зависят от состояния и типа используемой добавки и, в частности, от температур клейстеризации и разжижения крахмала. Если температура клейстеризации выше, чем температура для обычного осахаривания солода, то крахмал клейстеризуют и разжижают перед добавлением к затору.

"Мутации" включают делеции, инсерции, замены, трансверсии и точечные мутации в кодирующих и не кодирующих областях гена. Делеции могут быть делециями всего гена или только части этого гена, где не кодирующей областью предпочтительно является либо область промотора, либо область терминатора, либо интроны. Точечные мутации могут относиться к изменениям одного основания или пары оснований и могут приводить к стоп-кодонам, мутациям "сдвига рамки" или заменам аминокислот. Соматические мутации являются мутациями, которые встречаются только в определенных клетках или тканях растения и не наследуются в следующем поколении. Мутации зародышевой линии могут быть обнаружены в любой клетке растения и являются наследуемыми. Со ссылкой на фиг. 1 здесь, которая дает общее представление, каким образом зерна мутированного ячменя могут размножаться в программе селекции, зерна генерации М3 и их непосредственно размноженные зерна, или любой последующей генерации, в том числе их растения, могут быть названы "исходными мутантами". Далее, все еще со ссылкой на фиг. 1 здесь, термин "генеалогическая линия" относится к зернам генерации М4 и любой последующей генерации, в том числе их растениям, которые могут быть результатом скрещивания с растением-культураром или быть результатом скрещивания с другой генеалогической линией с отдельным, специфическим признаком.

Термин "null-LOX" относится к присутствию мутации в LOX-кодирующем гене, вызывающей полную потерю функции кодируемого фермента LOX (либо LOX-1, либо LOX-2). Мутации, которые генерируют кодоны преждевременной терминации (нонсенс-кодоны) в гене, кодирующем LOX, представляют только один механизм, при помощи которого может быть получена полная потеря функции активности LOX. Молекулярные подходы к получению полной потери функции фермента LOX предусматривают генерирование мутаций, которые вызывают полное отсутствие транскриптов для указанного фермента, или мутаций, которые вызывают полную инактивацию этого кодируемого фермента. "null-LOX" со ссылкой на растение относится к растению, имеющему полную потерю функции описанного фермента LOX.

"Функционально связанные" является термином, используемым для ссылки на ассоциацию двух или более фрагментов нуклеиновой кислоты на едином полинуклеотиде, так что на функцию одного из них влияет другой фрагмент. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, когда он способен влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности, т.е. эта кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем этого промотора. Кодирующие последовательности могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями в смысловой или антисмысловой ориентации.

"ПЦР" или "полимеразная цепная реакция" хорошо известна квалифицированным в данной области специалистам в качестве способа, используемого для амплификации конкретных ДНК-сегментов (патенты США № 4683195 и 4800159, Mullis, K.B. et al.).

"Растение" или "растительный материал" включает клетки растений, протопласты растений и культуры клеток тканей растений, из которых могут быть регенерированы растения ячменя, в том числе каллусы растений, и клетки растений, которые являются интактными в растениях, или части растений, такие как зародыши, пыльца, семяпочки, цветки, зерна, листья, корни, кончики корней, пыльники или любая часть или любой продукт растения.

Под термином "продукт растения" имеется в виду продукт, полученный из переработки растения или части растения. Таким образом, указанный продукт растения может быть, например, солодом, суслом, ферментированным или неферментированным напитком, кормовым или пищевым продуктом.

В этом контексте "рекомбинантный" при ссылке на белок является белком, который происходит из

чужеродного вида или, если он происходит из того же самого вида, является модифицированным из его нативной формы в композиции преднамеренным вмешательством человека.

"Дегустационная комиссия специалистов по оценке качества пива" в контексте данного описания является комиссией специалистов, хорошо обученных дегустации и описанию привкусов пива, со специальным фокусированием на альдегидах, "бумажном" привкусе и привкусе "старости". Хотя существует ряд аналитических инструментов для оценивания компонентов привкуса, относительное значение влияющих на вкус компонентов трудно оценивать аналитически. Однако такие комплексные свойства могут быть оценены специалистами по оценке вкуса. Их непрерывная тренировка включает испытание качества и оценивание проб стандартного пива.

Под термином "сайт сплайсинга" имеются в виду связи между экзонами и интронами гена. Так, сайт сплайсинга может быть границей, идущей от экзона к интрону (называемой "донорным сайтом сплайсинга") или границей, отделяющей интрон от экзона (называемой "акцепторным сайтом"). Сайт сплайсинга в растениях обычно содержит консенсусные последовательности. 5'-конец интрона обычно состоит из консервативного динуклеотида GT (GU в мРНК), а 3'-конец интрона обычно состоит из консервативного динуклеотида AG. Таким образом, 5'-сайт сплайсинга содержит 5'-конец интрона, а 3'-сайт сплайсинга содержит 3'-конец интрона. Предпочтительно в контексте данного изобретения сайт сплайсинга интрона является либо 5'-сайтом сплайсинга, состоящим из наиболее 5' (левых)-динуклеотидов интрона (который обычно является GT), или 3'-сайтом сплайсинга, состоящим из наиболее 3' (правых)-динуклеотидов этого интрона (который обычно является AG).

Если нет других указаний, "T2N" обозначает транс-2-ноненаль (T2N) в свободной форме. T2N называют иногда 2-Е-ноненалем.

Под термином "потенциал T2N" описаны химические вещества, которые способны высвобождать T2N или превращаться в T2N в одной или нескольких реакциях. В данном контексте потенциал T2N определяется как концентрация T2N, высвобождаемого в раствор, например, сусло или пиво, во время инкубирования в течение 2 ч при 100°C, pH 4,0. Практически, определяют начальную концентрацию T2N, после чего этот раствор инкубируют в течение 2 ч при 100°C, pH 4,0, с последующим определением концентрации T2N. Различие между начальной и конечной концентрацией T2N называют потенциалом T2N. Тепловая, кислотная обработка вызывает высвобождение T2N из потенциала T2N, например, из "аддуктов T2N", где этот последний термин используется для описания T2N, конъюгированного с одним или несколькими веществами, включающими, но не ограничивающимися ими, белок (белки), сульфит, остаток клеток, клеточные стенки и т.п. Обычно аддукты T2N *per se* не воспринимаются людьми в качестве привкусов. Однако T2N, высвобождаемый из указанных аддуктов T2N, может приводить к появлению привкуса.

"Культура ткани" обозначает композицию, содержащую изолированные клетки одного и того же или разных типов, или коллекцию таких клеток, организованных в части растения, в том числе, например, протопласты, каллусы, зародыши, пыльцу, пыльники и т.п.

"Трансформация" обозначает введение ДНК в организм таким образом, что эта ДНК поддерживает либо в виде внехромосомного элемента (без интеграции и стабильного наследования), либо в виде хромосомного интегранта (с генетически стабильным наследованием). Если нет другого указания, способом, используемым здесь для трансформации *E.coli*, был способ на основе  $\text{CaCl}_2$  (Sambrook and Russell, *supra*). Для трансформации ячменя может выполняться *Agrobacterium*-опосредуемая трансформация преимущественно, как описано либо Tingay et al. (1997), либо Wang et al. (2001), за исключением того, что в качестве хозяина могут быть использованы альтернативные культивары.

"Трансген" является геном, который был введен в геном процедурой трансформации.

В данном контексте "трансгенная" включает ссылку на клетку, которая была модифицирована введением гетерологичной нуклеиновой кислоты, или на клетку, которая произведена из модифицированной таким образом клетки. Так, например, трансгенные клетки экспрессируют гены, которые не обнаруживаются в идентичной форме в нативной форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые в противном случае ненормально экспрессируются, недостаточно экспрессируются или вообще не экспрессируются, в результате преднамеренного вмешательства человека. Термин "трансгенные" в данном контексте в ссылке на растения, в частности растения ячменя, не включает изменение клетки способами традиционной селекции растений, например мутагенезом на основе  $\text{NaN}_3$  или природно-встречающимися событиями без преднамеренного вмешательства человека.

"Дикий ячмень", *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*, рассматривается в качестве предшественника (прародителя) современных культивируемых форм ячменя. Предполагается, что транзиция ячменя из дикого в культивируемое состояние совпадает с окультуриванием этого растения в "местные сорта ячменя". Они являются генетически более близкородственными с современными культиварами, чем с диким ячменем.

Термин ячмень "дикого типа" относится к растению ячменя, генерированному рутинным образом. Предпочтительно этот термин относится к растению ячменя, из которого были произведены растения ячменя данного изобретения, т.е. исходные растения. Зерна ячменя дикого типа обычно доступны, например, из производящих семена сельскохозяйственных хозяйств в виде "культиваров" или "сортов", т.е.

тех генетически сходных зерен, которые находятся в списке национальных организаций селекции растений. Несмотря на доступность нескольких null-LOX-1-культуров ячменя (например, культуров Chamoni и Chartmay), но для цели лучшего понимания данного изобретения, все null-LOX-1-мутантные, null-LOX-2-мутантные растения и растения с двойной null-LOX-мутацией считаются здесь мутантными растениями, а не растениями дикого типа. Обозначения "культур" и "сорт" используются здесь взаимозаменяемо.

Под термином "сусло" имеется в виду жидкий экстракт солода, такого как размолотый солод, или зеленый солод, или размолотый зеленый солод. В пивоварении с использованием ячменя сусло может быть также приготовлено инкубированием экстракта неосоложенного ячменя со смесью ферментов, которая гидролизует компоненты ячменя. Кроме указанных полученных из солода или ячменя экстрактов, этот жидкий экстракт может быть приготовлен из солода и дополнительных компонентов, таких как дополнительный крахмалсодержащий материал, частично превращенный в ферментируемые сахара. Это сусло обычно получают затиранием, с последующим необязательным "промыыванием дробины", в процессе экстракции остаточных сахаров и других соединений из истощенных зерен после затирания с горячей водой. Промывание дробины обычно проводят в фильтрационном чане, затормоном фильтре или другом аппарате для получения возможности отделения экстрагированной воды от истощенных зерен. Сусло, полученное после затирания, обычно называют "первым суслом", тогда как сусло, полученное после промывания дробины, обычно называют "вторым суслом". Если не указано, термин "сусло" может быть использован для первого сусла, второго сусла или комбинации обоих. Во время получения пива сусло обычно кипятят вместе с высушенными шишками хмеля. Сусло, которое не кипятилось с высушенными шишками хмеля, может также называться "несброженным (сладким) суслом", тогда как сусло, прокипяченное с высушенными шишками хмеля, может называться "прокипяченным суслом".

Растение ячменя.

Ячмень относится к семейству растений. "Дикий ячмень", *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*, считается предшественником (прародителем) современных культивируемых форм ячменя. Предполагается, что транзигция ячменя из дикого в культивируемое состояние совпадает с радикальным изменением частот встречаемости аллелей в многочисленных локусах. Редкие аллели и новые мутационные события были положительно селектированы фермерами, которые быстро установили новые признаки в окультуренных популяциях растений, называемых "местными сортами ячменя". Они являются генетически более близкородственными с современными культиварами, чем с диким ячменем. До позднего XIX столетия местные сорта ячменя существовали в виде гетерогенных смесей инбредных линий и гибридных сегрегатов, включающих малое число растений, происходящих из случайных скрещиваний в более ранних генерациях. Большинство этих местных сортов были заменены в продвинутых сельских хозяйствах чистотеллинейными культиварами. Промежуточные или высокие уровни генетического разнообразия характеризуют оставшиеся местные сорта. Первоначально сорта "современного ячменя" представляли селекционные сорта из местных сортов. Позднее их получали из последовательных циклов скрещиваний между установленными чистыми линиями, такими как линии различного географического происхождения. В конечном счете результатом было заметное сужение генетической основы во многих, возможно всех, продвинутых сельских хозяйствах. В сравнении с местными сортами современные культивары ячменя имеют многочисленные улучшенные свойства (Nevo, 1992; von Bothmer et al., 1992), например одно или несколько, но без ограничения, из следующих:

- (i) покрытые или голые зерна;
- (ii) покой семян;
- (iii) устойчивость к болезням;
- (iv) устойчивость к условиям окружающей среды (например, засухе или pH почвы);
- (v) соотношение лизина и других аминокислот;
- (vi) содержание белка;
- (vii) содержание азота;
- (viii) углеводный состав;
- (ix) содержание и состав гордеинов;
- (x) содержание (1-3,1-4)- $\beta$ -глюкана и арабиноксилана;
- (xi) урожай;
- (xii) неподвижность соломы;
- (xiii) высота растения.

В данном изобретении термин "растение ячменя" включает любое растение ячменя. Таким образом, это изобретение относится к любому растению ячменя, содержащему первую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-2. Таким образом, это изобретение относится к любому растению ячменя, содержащему первую мутацию, которая приводит к полной потере функционального фермента LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функционального фермента LOX-2.

Однако предпочтительными растениями ячменя для применения с данным изобретением являются современные культивары или чистые линии ячменя. Культивар ячменя, который должен быть использо-

ван с данным изобретением, может, например, быть выбран из группы, состоящей из Sebastian, Celeste, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Harrington, Klages, Manley, Schooner, Stirling, Clipper, Franklin, Alexis, Blenheim, Ariel, Lenka, Maresi, Steffi, Gimpel, Cheri, Krona, Camargue, Chariot, Derkado, Prisma, Union, Beka, Kym, Asahi 5, KOU A, Swan Hals, Kanto Nakate Gold, Hakata № 2, Kirin - choku № 1, Kanto late Variety Gold, Fuji Nijo, New Golden, Satukio Nijo, Seijo № 17, Akagi Nijo, Azuma Golden, Amagi Nijpo, Nishino Gold, Misato golden, Haruna Nijo, Scarlett и Jersey, предпочтительно из группы, состоящей из Haruna Nijo, Sebastian, Celeste, Lux, Prestige, Saloon, Neruda и Power, предпочтительно из группы, состоящей из Harrington, Klages, Manley, Schooner, Stirling, Clipper, Franklin, Alexis, Blenheim, Ariel, Lenka, Maresi, Steffi, Gimpel, Cheri, Krona, Camargue, Chariot, Derkado, Prisma, Union, Beka, Kym, Asahi 5, KOU A, Swan Hals, Kanto Nakate Gold, Hakata № 2, Kirin - choku № 1, Kanto late Variety Gold, Fuji Nijo, New Golden, Satukio Nijo, Seijo № 17, Akagi Nijo, Azuma Golden, Amagi Nijpo, Nishino Gold, Misato golden, Haruna Nijo, Scarlett и Jersey, предпочтительно из группы, состоящей из Haruna Nijo, Sebastian, Tangent, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Power, Quench, NFC Tipple, Barke, Class и Vintage.

В одном варианте осуществления этого изобретения растение ячменя является, соответственно, современным культиваром ячменя (предпочтительно культиваром, выбранным из группы культиваров ячменя, описанных здесь выше), содержащим первую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-1, такой как полная потеря функционального фермента LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-2, такой как полная потеря функционального фермента LOX-2. В этом варианте осуществления предпочтительно, чтобы это растение ячменя не было местным сортом ячменя.

Это растение ячменя может быть в любой подходящей форме. Например, растение ячменя в соответствии с этим изобретением может быть жизнеспособным растением ячменя, высушенным растением, гомогенизированным растением или размолотым зерном ячменя. Это растение может быть зрелым растением, зародышем, проросшим зерном, осоложенным зерном, размолотым осоложенным зерном или т.п.

Части растений ячменя могут быть любой подходящей частью этого растения, такой как зерна, зародыши, листья, стебли, корни, цветки или их фракции. Фракция может быть, например, сегментом зерна, зародыша, листа, стебля, корня или цветка. Части растений ячменя могут быть также фракцией гомогената или фракцией размолотого растения или зерна ячменя.

В одном варианте осуществления этого изобретения части растений ячменя могут быть клетками указанного растения ячменя, предпочтительно жизнеспособными клетками, которые могут быть размножены *in vitro* в культурах ткани. В частности, указанными клетками в одном варианте могут быть клетки, которые не способны созревать в целое растение ячменя, т.е. клетки, которые не являются репродуктивным материалом.

Потеря функции активности LOX.

Данное изобретение относится к растениям ячменя, или их части, или их продуктам из растений, имеющим первую и вторую мутацию, причем эта первая мутация приводит к полной потере функции активности LOX-1, а эта вторая мутация приводит к полной потере функции активности LOX-2. Так, например, первая мутация приводит к полной потере функционального фермента LOX-1, а вторая мутация приводит к полной потере функционального фермента LOX-2.

Полная потеря функции активности LOX-1 (такая как полная потеря функционального фермента LOX-1), и полная потеря функции активности LOX-2 (такая как полная потеря функционального фермента LOX-2), могут независимо быть основаны на различных механизмах. Например, полная потеря функции одной или обеих из активности LOX-1 и активности LOX-2 может быть вызвана дисфункцией белков в растении ячменя, т.е. дисфункцией белка LOX-1 и/или LOX-2, например мутированного белка LOX-1 без детектируемой 9-HPODE-образующей активности (например, определяемой, как описано в примере 4) и/или мутированного белка LOX-2 без детектируемой 13-HPODE-образующей активности (например, определяемой, как описано в примере 4).

Полная потеря функции одной или обеих из активности LOX-1 и активности LOX-2 может быть вызвана потерей белка LOX-1 и/или LOX-2. Очевидно, что потеря белка LOX-1 будет приводить к потере функционального фермента LOX-1 и что потеря белка LOX-2 будет приводить к полной потере функционального фермента LOX-2. Таким образом, это растение ячменя может предпочтительно не содержать белка LOX-1 и/или LOX-2 или содержать только очень мало, более предпочтительно не содержать детектируемого белка LOX-1 и/или LOX-2. Белок LOX-1 и/или LOX-2 может быть детектирован любым известным подходящим способом, известным квалифицированному в данной области специалисту. Однако предпочтительно этот белок (эти белки) детектируют способами, в которых белок LOX-1 детектируют специфическими антителами к LOX-1 и LOX-2, такими как поликлональные антитела к LOX-1 и LOX-2. Указанные способы могут быть, например, Вестерн-блоттингом или ELISA. Указанные антитела могут быть моноклональными или поликлональными. Однако предпочтительно указанные антитела имеют поликлональную природу, узнавая несколько различных эпитопов в белке LOX-1 и LOX-2 соответственно. Белок LOX-1 и/или LOX-2 может быть также детектирован опосредованно, например, способами, определяющими активность LOX-1, или способами, определяющими активность LOX-2. В од-

ном предпочтительном варианте осуществления этого изобретения белок LOX-1 детектируют с использованием способов, описанных в общих чертах в примере 4 международной заявки на патент WO 2005/087934. Белок LOX-2 может быть детектирован сходным образом с использованием антител, связывающихся с LOX-2.

Полная потеря функции одной или обеих из активности LOX-1 и активности LOX-2 может быть также результатом отсутствия экспрессии или очень низкой экспрессии, предпочтительно отсутствием экспрессии транскрипта LOX-1 и/или транскрипта LOX-2. Квалифицированному специалисту будет понятно, что отсутствие транскрипта LOX-1 или LOX-2 также будет приводить к отсутствию транслированного белка LOX-1 или LOX-2 соответственно. Альтернативно, полная потеря функции одной или обеих из активности LOX-1 и активности LOX-2 (например, общая потеря функциональных ферментов LOX-1 и LOX-2) может быть также результатом экспрессии aberrантного транскрипта LOX-1 и/или aberrантного транскрипта LOX-2. Aberrантный транскрипт LOX-1 и/или LOX-2 может быть вызван aberrантным сплайсингом этого транскрипта, например, вследствие мутации в сайте сплайсинга. Таким образом, растения ячменя этого изобретения могут нести мутацию в сайте сплайсинга, таком как 5'-сайт сплайсинга или 3'-сайт сплайсинга, например, в одном или двух наиболее 5'(левых)-нуклеотидах интрона или в одном или двух наиболее 3'(правых)-нуклеотидах интрона. Один пример мутанта с aberrантным сплайсингом транскрипта LOX-1 описан как мутант A618 в WO 2005/087934. Экспрессия транскриптов, кодирующих LOX-1 или LOX-2, может быть, например, детектирована Нозерн-блоттингом или ОТ-ПЦР-экспериментами.

Полная потеря функциональных ферментов LOX-1 и LOX-2 растений ячменя данного изобретения обусловлена мутациями. Таким образом, растения ячменя данного изобретения обычно несут мутацию в гене LOX-1. Указанная мутация может находиться в регуляторных областях, например в промоторе или интронах, или указанная мутация может находиться в кодирующей области. Подобным образом, растения ячменя данного изобретения обычно несут мутацию в гене LOX-2. Указанная мутация может находиться в регуляторных областях, например в промоторе или интронах, или указанная мутация может находиться в кодирующей области. Таким образом, причина полной потери функциональных ферментов LOX-1 и/или LOX-2 может быть также детектирована идентификацией мутаций в гене, кодирующем LOX-1, или в гене, кодирующем LOX-2. Мутации в гене, кодирующем LOX-1, могут быть, например, детектированы секвенированием указанного гена. Предпочтительно после идентификации мутации полную потерю функции подтверждают тестированием на активности LOX-1 и/или LOX-2.

Термин "белок LOX-1" охватывает полноразмерный белок LOX-1 ячменя, представленный в SEQ ID NO: 3 WO 2005/087934 или в SEQ ID NO: 7 WO 2005/087934, или его функциональный гомолог. Активный центр LOX-1 расположен в С-концевой части этого фермента. В частности, ожидается, что составляющие эту область аминокислотные остатки 520-862 или их части являются релевантными в отношении активности LOX-1. Таким образом, в одном варианте осуществления null-LOX-ячмень предпочтительно содержит ген, который кодирует мутированную форму LOX-1, лишенную нескольких или всех из аминокислот 520-862 LOX-1. Указанный мутированный LOX-1 может быть также лишен других аминокислотных остатков, которые присутствуют в LOX-1 дикого типа.

Соответственно, ячмень с двумя null-LOX-мутациями этого изобретения может содержать укороченную форму LOX-1, которая является нефункциональной, например, укороченную на N- или С-конце форму. Предпочтительно указанная укороченная форма содержит не более 800, более предпочтительно не более 750, даже более предпочтительно не более 700, еще более предпочтительно не более 690, даже более предпочтительно не более 680, еще более предпочтительно не более 670 последовательных аминокислот LOX-1, например не более 665, например не более 650, например не более 600, например не более 550, например не более 500, например не более 450, например не более 425, например не более 399 последовательных аминокислот LOX-1 SEQ ID NO: 3 WO 2005/087934. Предпочтительно указанная укороченная форма содержит только N-концевой фрагмент LOX-1, предпочтительно самое большее 800, более предпочтительно самое большее 750, даже более предпочтительно самое большее 700, еще более предпочтительно самое большее 690, даже более предпочтительно самое большее 680, еще более предпочтительно самое большее 670, даже более предпочтительно самое большее 665 N-концевых аминокислот SEQ ID NO: 3 WO 2005/087934, например не более 665, например не более 650, например не более 600, например самое большее 550, например самое большее 500, например самое большее 450, например самое большее 425, например самое большее 399 N-концевых аминокислот SEQ ID NO: 3 WO 2005/087934.

В одном очень предпочтительном варианте осуществления эта укороченная форма может состоять из аминокислот 1-665 SEQ ID NO: 3 WO 2005/087934.

В одном предпочтительном варианте осуществления этого изобретения растение ячменя этого изобретения содержит LOX-1-кодирующий ген, который транскрибируется в мРНК, которая содержит нонсенс-кодон или стоп-кодон выше по ходу транскрипции (слева) от стоп-кодона мРНК LOX-1 дикого типа. Такой нонсенс-кодон называют здесь преждевременным нонсенс-кодоном. Предпочтительно все LOX-1-кодирующие гены, транскрибируемые в мРНК указанного растения, содержат преждевременный нонсенс-кодон или стоп-кодон. Этот нонсенс-кодон или стоп-кодон расположен предпочтительно самое большее при 800, более предпочтительно самое большее при 750, даже более предпочтительно самое

большее при 700, еще более предпочтительно самое большее при 690, даже более предпочтительно самое большее при 680, еще более предпочтительно самое большее при 670, даже более предпочтительно самое большее при 665 кодонах ниже по ходу транскрипции (справа) от стартового кодона. Эта последовательность геномной ДНК дикого типа, кодирующая LOX-1, представлена в SEQ ID NO: 1 WO 2005/087934 или SEQ ID NO: 5 WO 2005/087934.

В одном предпочтительном варианте осуществления растение ячменя этого изобретения содержит ген, кодирующий LOX-1, где пре-мРНК, транскрибируемая из указанного гена, содержит последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 2 WO 2005/087934.

В одном очень предпочтительном варианте осуществления ген, кодирующий мутантный LOX-1 растения ячменя с двумя null-LOX-мутациями этого изобретения, содержит нонсенс-мутацию, причем указанная мутация соответствует замене G→A в положении 3574 SEQ ID NO: 1 WO 2005/087934.

Термин "белок LOX-2" охватывает полноразмерный белок LOX-2 ячменя, представленный в SEQ ID NO: 5 данной публикации, или его функциональный гомолог. Активный центр LOX-2 расположен в С-концевой части LOX-2. В частности, ожидается, что составляющие эту область аминокислотные остатки 515-717, или их части, являются релевантными в отношении активности LOX-2. На основании исследования кристаллической структуры LOX-1 сои, ожидаемые участки последовательности щели активного центра фермента LOX-2 ячменя представлены аминокислотными остатками 515-525 и 707-717. Транслированный мутированный белок LOX-2, т.е. укороченная на С-конце форма LOX-2 двойного null-LOX-мутанта ячменя A689, содержит максимально 684 остатка и, следовательно, будет лишена участка второй последовательности щели активного центра, делая его неактивным. Согласно одному варианту осуществления этого изобретения ячмень с двойной null-LOX-мутацией этого изобретения предпочтительно содержит ген, кодирующий мутантную форму LOX-2, которая лишена нескольких или всех из аминокислот 515-717 LOX-2, предпочтительно лишена нескольких или всех аминокислот 707-717, даже более предпочтительно лишена всех аминокислот 707-717. Указанный мутантный LOX-2 может быть также лишен других аминокислотных остатков, которые присутствуют в LOX-2 дикого типа.

Таким образом, ячмень с двойной null-LOX-мутацией может содержать укороченную форму LOX-2, которая является нефункциональной, такую как укороченная на N-конце или на С-конце форма. Предпочтительно указанная укороченная форма содержит не более 800, более предпочтительно не более 750, даже более предпочтительно не более 725, еще более предпочтительно не более 700, даже более предпочтительно не более 690, еще более предпочтительно не более 684 последовательных аминокислот LOX-2 SEQ ID NO: 5 данной публикации. Предпочтительно указанная укороченная форма содержит только N-концевой фрагмент LOX-2. Таким образом, предпочтительно указанная укороченная форма содержит самое большее 800, более предпочтительно самое большее 750, даже более предпочтительно самое большее 725, еще более предпочтительно самое большее 700, даже более предпочтительно самое большее 690, еще более предпочтительно самое большее 684 N-концевых аминокислот SEQ ID NO: 5 данной публикации.

В одном очень предпочтительном варианте осуществления эта укороченная форма может состоять из аминокислот 1-684 SEQ ID NO: 5 данной публикации.

В одном предпочтительном варианте осуществления этого изобретения растение ячменя этого изобретения содержит ген, транскрибируемый в мРНК LOX-2, где указанная мРНК содержит нонсенс-кодон или стоп-кодон выше по ходу транскрипции (слева) от стоп-кодона мРНК LOX-2 дикого типа. Такой нонсенс-кодон называют здесь преждевременным нонсенс-кодоном.

Предпочтительно все LOX-2-кодирующие гены указанного растения, транскрибируемые в мРНК указанного растения, содержат преждевременный нонсенс-кодон или стоп-кодон. Этот нонсенс-кодон или стоп-кодон расположен предпочтительно самое большее при 800, более предпочтительно самое большее при 750, даже более предпочтительно самое большее при 725, еще более предпочтительно самое большее при 700, даже более предпочтительно самое большее при 690, еще более предпочтительно самое большее при 684 кодонах ниже по ходу транскрипции (справа) от стартового кодона. Эта последовательность геномной ДНК дикого типа, кодирующая LOX-2, представлена в SEQ ID NO: 1 данной публикации.

В одном очень предпочтительном варианте осуществления этого изобретения ген, кодирующий мутированный LOX-2 растения ячменя с двумя null-LOX-мутациями, содержит нонсенс-мутацию, причем указанная мутация соответствует замене G→A в положении 2689 SEQ ID NO: 1.

Растение ячменя в соответствии с этим изобретением может быть получено любым подходящим способом, известным квалифицированному специалисту, предпочтительно одним из способов, описанным в общих чертах здесь ниже в разделе "Получение ячменя с двойной null-LOX-мутацией".

В одном варианте осуществления этого изобретения предпочтительно, чтобы растение ячменя с двойной null-LOX-мутацией согласно данному изобретению имело физиологию роста растения и развитие семян, сходные с физиологией роста и развитием семян ячменя дикого типа. Таким образом, предпочтительно, чтобы растение ячменя с null-LOX-мутацией было сходным с ячменем дикого типа в отношении высоты растений, количества побегов на одно растение, начала цветения и/или количества семян

на колос.

Предпочтительно также, чтобы растение ячменя с двойной null-LOX-мутацией было сходным с ячменем дикого типа, в частности сходным с культиваром Barke в отношении высоты растения, даты колошения, устойчивости к болезням, полегания, раскрытия колосьев, времени созревания и урожая. В данном контексте термин "сходные" должен пониматься как те же самые  $\pm 10\%$  в случае чисел. Эти параметры могут быть определены, как описано здесь далее в примере 5.

В одном очень предпочтительном варианте осуществления этого изобретения растением ячменя является растение ячменя, семена которого были депонированы 4 декабря 2008 года под названием "Barley, Hordeum vulgare L.; Line A689" American Type Culture Collection (ATCC), Patent Depository, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, United States (номер депозита PTA-9640). Таким образом, растение ячменя данного изобретения может быть линией A689 (ATCC Patent Deposit Designation: PTA-9640) или любым растением ячменя, являющимся потомком этой линии.

Получение мутантов ячменя.

Растение ячменя в соответствии с этим изобретением может быть получено любым подходящим способом, известным лицу с квалификацией в данной области. Предпочтительно растения ячменя этого изобретения получают способом, предусматривающим стадии мутагенизации растений ячменя или их частей, например, зерен ячменя, характеризующихся полной потерей функции активности LOX-1, такой как полная потеря функционального фермента LOX-1, и полной потерей функции активности LOX-2, такой как полная потеря функционального фермента LOX-2. В одном предпочтительном варианте осуществления растение ячменя может быть получено способом, предусматривающим мутагенизацию растения ячменя или его частей, например, зерен ячменя, где указанные растения ячменя несут мутацию, вызывающую полную потерю функционального фермента LOX-1. Такие растения ячменя описаны, например, в международной заявке на патент WO 2005/087934.

В одном представляющем интерес аспекте данное изобретение относится к новому и очень эффективному способу скрининга, который позволяет выполнять идентификацию растения ячменя, несущего мутацию, которая вызывает полную потерю активности LOX-2. Этот новый воспроизводимый способ скрининга делает возможной идентификацию растений ячменя с отсутствием активности LOX-2 или с очень низкой активностью LOX-2. Этот новый способ скрининга предусматривает применение проросших зародышей в качестве исходного материала. Интересно, что авторы этого изобретения обнаружили, что применение зрелых зародышей в качестве исходного материала для скрининга на активность LOX-2 является менее предпочтительным, основанным на скрининге такого большого количества зрелых зародышей, как 21000, которые не обнаруживали null-LOX-2-мутанта ячменя (ячменя с одной мутацией).

Таким образом, одним важным признаком этого нового способа скрининга является использование проросших зародышей в качестве исходного материала для детектирования активности LOX-2.

Таким образом, одной целью данного изобретения является обеспечение способов получения растений ячменя с двойной null-LOX-мутацией, предусматривающих следующих стадий:

(i) обеспечение растения ячменя или его частей с полной потерей функции активности LOX-1, например полной потерей функционального фермента LOX-1; и

(ii) мутагенизация указанного растения ячменя, и/или клеток ячменя, и/или ткани ячменя, и/или зерен ячменя, и/или зародышей ячменя из указанного растения ячменя с получением посредством этого генерации M0 ячменя; и

(iii) размножение указанных растений, зерен и/или зародышей ячменя в течение по меньшей мере 2 генераций с получением посредством этого генерации Mx растений ячменя, где x является целым числом  $\geq 2$ ; и

(iv) получение зародышей из растений ячменя Mx; и

(v) проращивание указанных зародышей; и

(vi) определение активностей LOX-1 и LOX-2 в указанных проросших зародышах, или их частях; и

(vii) отбор растений с полной потерей активности LOX-1 и активности LOX-2 в этих проросших зародышах; и

(viii) анализ на мутацию в гене LOX-1 и гене LOX-2; и

(ix) отбор растений, несущих мутацию в гене LOX-1 и гене LOX-2,

с получением посредством этого растения ячменя, несущего мутации в генах LOX-1 и LOX-2, вызывающие полную потерю активности LOX-1 и полную потерю активности LOX-2.

Вышеуказанным растением ячменя с полной потерей активности LOX-1 может быть, например, любое из растений ячменя с полной потерей активности LOX-1, описанных в WO 2005/087934, предпочтительно мутант D112 или потомство растений этого мутанта.

Стадия (ii) в вышеуказанном перечне может включать в себя мутагенизацию живого материала, выбранного из группы, состоящей из растений ячменя, клеток ячменя, ткани ячменя, зерен ячменя и зародышей ячменя, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из растения ячменя, зерен ячменя и зародышей ячменя, более предпочтительно зерен ячменя.

Мутагенез может выполняться любым подходящим способом. В одном варианте осуществления мутагенез выполняют инкубированием растения ячменя или его части, например, зерен ячменя или отдельных клеток из ячменя, с мутагенизирующим агентом. Указанный агент известен квалифицированному в данной области специалисту, включающий, например, но не только, азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ), этилметансульфонат (EMS), азидоглицерин (AG, 3-азидо-1,2-пропандиол), метилнитрозомочевину (MNU) и малеиновый гидразид (MH).

В другом варианте осуществления мутагенез выполняют облучением, например УФ, растения ячменя или его части, такой как зерно. В предпочтительных вариантах осуществления этого изобретения мутагенез выполняют в соответствии с любым из способов, описанных в общих чертах здесь ниже в разделе "Химический мутагенез". Неограничивающий пример протокола подходящего мутагенеза представлен в примере 2.

Предпочтительно мутагенез выполняют таким образом, что ожидаемая частота встречаемости желаемых мутантов равна по меньшей мере 0,5, например 0,5-5, например 0,9-2,3 на 10000 зерен, при скрининге ячменя генерации M3. В предпочтительном варианте осуществления мутагенез выполняют на зернах ячменя. Эти зерна, подвергнутые действию мутагена, называют генерацией M0 (см. также фиг. 1).

Активность LOX может быть определена в пробе из прорастающего зародыша ячменя, предпочтительно в жидком экстракте из прорастающего зародыша ячменя. Указанная проба, такая как указанный экстракт, может быть приготовлена из любой подходящей части указанного прорастающего зародыша. Обычно проба ячменя должна быть гомогенизирована с использованием любого подходящего способа перед приготовлением экстракта указанной пробы и определением активности LOX-2. В частности, готовят экстракт белка из прорастающего зародыша или его части и определяют активность LOX с использованием указанного экстракта белка. Гомогенизация может, например, выполняться с использованием механических сил, например, встряхиванием или перемешиванием, например, встряхиванием в присутствии бусин, таких как стеклянные бусины или бусины из стекольного песка.

В одном предпочтительном варианте осуществления прорастающий зародыш является генерацией M<sub>x</sub>, где x является целым числом  $\geq 2$ ; предпочтительно x является целым числом в диапазоне 2-10, более предпочтительно в диапазоне 3-8. В одном очень предпочтительном варианте осуществления активность LOX определяют в прорастающих зародышах генерации M3 или пробе, полученной из таких зародышей. В этом варианте осуществления предпочтительно зерна мутагенизированного ячменя генерации M0 выращивают для получения растений ячменя, которые скрещивают для получения зерен генерации M1. Эту процедуру повторяют, пока зерна генерации M3 являются доступными (см. также фиг. 1).

Определение активности LOX может проводиться с использованием любого подходящего анализа, предпочтительно одним из способов, описанных в общих чертах здесь далее. В частности, этот анализ предпочтительно обеспечивает данные по диоксигенированию линолевой кислоты в 9-HPODE и 13-HPODE ферментами LOX-1 и LOX-2. Таким образом, обычно анализ будет включать следующие стадии:

(i) обеспечение экстракта белка, приготовленного из прорастающего зародыша ячменя или его части; и

(ii) обеспечение линолевой кислоты; и

(iii) инкубирование указанного экстракта белка с указанной линолевой кислотой; и

(iv) детектирование диоксигенирования линолевой кислоты в 9-HPODE и 13-HPODE.

Стадия (iv) этого способа предпочтительно предусматривает определение уровня 9-HPODE и 13-HPODE в указанных прорастающих зародышах, предпочтительно в экстракте белка из указанных прорастающих зародышей. Эта стадия может предусматривать прямое или не прямое определение уровня 9-HPODE и 13-HPODE. Может быть определен общий уровень всех HPODE, в этом случае предпочтительно выполняют специфические измерения 9-HPODE и 13-HPODE для подтверждения. Одним способом мог бы быть, например, способ, в котором экстракты белка из прорастающих зародышей инкубируют с линолевой кислотой в качестве субстрата для образования 9-HPODE и 13-HPODE. Затем указанные HPODE могут быть детектированы различными способами. Один способ может предусматривать генерирование детектируемого соединения, такого как краситель. Например, этот способ может быть окислительным связыванием 3-диметиламинобензойной кислоты и 3-метил-2-бензотиазолинонгидазона в присутствии гемоглобина, катализируемым образуемыми HPODE, с образованием красителя индамина, который может быть измерен при  $A_{595}$  с использованием спектрофотометра. Один пример такого способа описан в примерах 1 и 2 далее здесь. С использованием этого анализа считывание абсорбции, меньшее 0,2  $A_{595}$ -единиц, считается показателем отсутствия активностей LOX-1 и LOX-2. Однако более точным способом для определения активностей LOX-1 и LOX-2 является инкубирование экстракта белка из прорастающих зародышей с линолевой кислотой с последующим определением содержаний 9-HPODE и 13-HPODE. Содержания 9-HPODE и 13-HPODE могут быть определены, например, с использованием анализа на основе ВЭЖХ.

Диоксигенирование линолевой кислоты с образованием 9-HPODE и 13-HPODE может измеряться прямо или опосредованно. С данным изобретением может быть использован любой подходящий способ детектирования. В одном варианте осуществления этого изобретения детектируют гидропероксиды линолевой кислоты. 9-HPODE и 13-HPODE могут быть детектированы непосредственно, например, хрома-

тографическими способами, такими как ВЭЖХ, как описано в примере 4.

Данное изобретение раскрывает, что некоторые аспекты процедуры для экстракции белка из прорастающих зародышей имеют большое значение. Так, белок предпочтительно экстрагируют с использованием кислотного буфера, предпочтительно буфера с pH в диапазоне 2-6, более предпочтительно в диапазоне 3-5, даже более предпочтительно в диапазоне 3,5-5, еще более предпочтительно в диапазоне 4-5, даже более предпочтительно pH 4,5. Буфер, используемый для экстракции, предпочтительно готовят на основе органической кислоты, более предпочтительно он является буфером на основе молочной кислоты. Наиболее предпочтительно этот экстракт белка готовят с использованием содержащего 100 mM молочную кислоту буфера.

Некоторые варианты данного изобретения описывают способы для детектирования null-LOX-1- и null-LOX2-растений, которые предусматривают реакцию 9-HPODE и 13-HPODE с красителем, например 3-метил-2-бензотиазолинонгидазоном. Предпочтительно указанный краситель, например 3-метилбензотиазолинонгидазон, добавляют к экстракту белка после добавления линолевой кислоты. Предпочтительно этот краситель добавляют в течение по меньшей мере 1 мин, более предпочтительно по меньшей мере 5 мин, даже более предпочтительно в течение 10 мин, например диапазоне 1-60 мин, например в диапазоне 5-30 мин, например в диапазоне 10-20 мин, после контактирования этого экстракта белка с линолевой кислотой.

Предпочтительные способы для отбора растений ячменя в соответствии с этим изобретением подробно описаны здесь далее в примере 2.

Процедура отбора может быть приспособлена для процедур анализа на основе микротитрационных планшетов или других известных повторяющихся высокопроизводительных форматов анализов для позволения быстрого скрининга многочисленных проб. Предпочтительно по меньшей мере 5000, например по меньшей мере 7500, например по меньшей мере 10000, например по меньшей мере 15000, например по меньшей мере 20000, например по меньшей мере 25000, мутагенизированных растений ячменя анализируют на активности LOX-1 и LOX-2.

Определение мутации в гене, кодирующем LOX-1, может выполняться несколькими различными способами. Например, ген LOX-1 может быть секвенирован полностью или частично, и эта последовательность может сравниваться с SEQ ID NO: 1 WO 2005/087934 или SEQ ID NO: 5 WO 2005/087934. При поиске на специфическую мутацию может быть применен SNP-анализ. Квалифицированный специалист сможет сконструировать применимые праймеры для детектирования конкретной специфической мутации, такой как мутация, приводящая к преждевременному стоп-кодону в кодирующей последовательности для LOX-1 (например, любому из преждевременных стоп-кодонов, описанных здесь выше). Один пример того, как можно выполнять SNP-анализ, описан в примере 10 здесь ниже, с праймерами, которые применимы для детектирования мутации G→A в положении нуклеотида 3474 гена LOX-1.

Определение мутации в гене, кодирующем LOX-2, может выполняться несколькими различными способами. Например, ген LOX-2 может быть секвенирован полностью или частично, и эта последовательность может сравниваться с SEQ ID NO: 1 данной публикации. При поиске на специфическую мутацию может быть применен SNP-анализ. Квалифицированный специалист сможет сконструировать применимые праймеры для детектирования конкретной специфической мутации, такой как мутация, приводящая к преждевременному стоп-кодону в LOX-2-кодирующей последовательности (например, любому из преждевременных стоп-кодонов, описанных здесь выше). Один пример того, как можно выполнять SNP-анализ, описан в примере 10 здесь ниже, с праймерами, которые применимы для детектирования мутации G→A в положении нуклеотида 2689 гена LOX-2.

В данное изобретение включено также то, что стадии (viii) и (ix) способа получения растения ячменя с двойной null-LOX-мутацией, как подробно описано в этом разделе выше, могут выполняться перед стадиями (vi) и (vii), и в этом случае этот способ будет содержать стадии (i), (ii), (iii), (iv), (v), (viii), (ix), (vi) и (vii) в этом порядке. В частности, это могло бы иметь место при поиске на специфическую мутацию, например, в растениях-потомках уже идентифицированных растений ячменя с двойной null-LOX-мутацией.

После идентификации растения ячменя с двойной null-LOX-мутацией, которое содержит конкретную мутацию в гене LOX-1 и конкретную мутацию в гене LOX-2 (такую как любая из вышеуказанных мутаций), дополнительные растения ячменя с идентичными мутациями могут быть генерированы общепринятыми способами размножения, такими как способы, хорошо известные квалифицированному в данной области специалисту. Например, указанное растение ячменя с двойной null-LOX-мутацией может быть обратно скрещено с другим культиваром ячменя.

После отбора применимых растений ячменя с общей потерей функций LOX-1 и LOX-2 могут выполняться необязательно один или несколько дополнительных скринингов. Например, отобранные мутанты могут быть дополнительно размножены, и растения новых генераций могут быть тестированы на полную потерю функциональных ферментов LOX-1 и LOX-2.

После отбора применимых растений ячменя они могут быть подвергнуты размножению, например, общепринятому размножению. Способы размножения описаны здесь ниже в разделе "Размножение рас-

тений".

Продукты из растений.

Данное изобретение относится к напиткам или другим продуктам из растений с низкими уровнями потенциала T2N, полученным из растений ячменя с двойной null-LOX-мутацией или их частей.

Таким образом, данное изобретение относится к продуктам растительного происхождения (продуктам из растений), которые могут быть композициями, содержащими вышеописанные растения ячменя, или их части, или композициям, полученным из указанных растений ячменя, или их частей, таким как продукты растений, полученные из указанных растений ячменя, или их частей. Поскольку указанные растения ячменя лишены активностей LOX-1 и LOX-2, эти композиции обычно содержат очень низкие уровни потенциала T2N. Примеры применимых композиций, содержащих растения ячменя или приготовленные из растений ячменя, имеющих первую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-1, такой как полная потеря функционального фермента LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-2, такой как полная потеря функционального фермента LOX-2, описаны здесь ниже.

Указанные композиции предпочтительно содержат:

(i) менее 60%, даже более предпочтительно менее 50%, еще более предпочтительно менее 40%, например менее 30%, предпочтительно менее 20%, более предпочтительно менее 10% свободного T2N; и/или

(ii) менее 60%, даже более предпочтительно менее 50%, еще более предпочтительно менее 40%, например менее 30%, предпочтительно менее 25% потенциала T2N, в сравнении со сходной композицией, приготовленной таким же образом из растений ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power.

Конкретное уменьшение T2N может различаться в зависимости от типа этой композиции. Вышеупомянутые уменьшения T2N являются особенно релевантными для композиций, когда эта композиция выбрана из группы, состоящей из солода, сула и выдержанных напитков.

Кроме того, указанные композиции предпочтительно содержат:

(i) менее 80%, предпочтительно менее 70%, даже более предпочтительно менее 60%, например менее 50% свободного T2N; и/или

(ii) менее 80%, предпочтительно менее 70%, даже более предпочтительно менее 60%, например менее 50% потенциала T2N, в сравнении со сходной композицией, приготовленной таким же образом из мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934.

Данное изобретение относится в одном аспекте к зернам ячменя, имеющим первую мутацию, которая приводит к полной потере функции активности LOX-1 (например, полной потере функционального фермента LOX-1), и вторую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-2 (например, полной потере функционального фермента LOX-2). Данное изобретение относится также к композициям, содержащим указанные зерна, и композициям, приготовленным из указанных зерен, а также продуктам растительного происхождения, приготовленным из таких зерен.

Было описано, что активность липоксигеназ в зернах ячменя может быть уменьшена процессом вымачивания, в котором ячмень может быть подвергнут высоким температурам и/или обработке молочной кислотой. Такая обработка может иметь другие побочные эффекты, такие как уменьшение желаемых ферментативных активностей, например, активности фитазы. Кроме того, такая обработка уменьшает активность липоксигеназы только с момента, когда предпринимается тепловая обработка, и, следовательно, она не влияет на предшествующее накопление продуктов липоксигеназы.

Таким образом, в одном варианте продукты растительного происхождения в соответствии с этим изобретением готовят с использованием способа, в котором зерна ячменя не подвергают вымачиванию при температуре по меньшей мере 70°C. Предпочтительно также эти продукты растительного происхождения в соответствии с этим изобретением готовят с использованием способа, в котором зерна ячменя не подвергают вымачиванию при температуре по меньшей мере 57°C в присутствии молочной кислоты.

В одном аспекте это изобретение относится к композициям солода, приготовленным из зерен с двойной null-LOX-мутацией посредством соложения. Под термином "соложение" следует понимать проращивание замоченных зерен ячменя, происходящее при контролируемых условиях окружающей среды (например, как иллюстрировано на фиг. 3, стадии 2 и 3).

Указанные композиции солода предпочтительно содержат менее 30%, более предпочтительно менее 20%, даже более предпочтительно менее 10% свободного T2N в сравнении с композицией солода, полученной таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. Более предпочтительно указанные композиции солода содержат менее 60%, более предпочтительно менее 50% свободного T2N в сравнении с композицией солода, полученной таким же образом из null-LOX-1-мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934. Кроме того, указанные композиции солода предпочтительно содержат менее 60%, предпочтительно менее 50%, более предпочтительно менее 40%, даже более предпочтительно менее 30%, более предпочтительно менее 20%, даже более предпочтительно менее 10% потенциала T2N в сравнении с композицией солода, полученной таким же образом из ячменя

дикого типа, предпочтительно из культивара Power. Более предпочтительно указанные композиции солода содержат менее 60%, более предпочтительно 50% потенциала T2N в сравнении с композицией, полученной таким же образом из null-LOX-1 мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934. Соложение является процессом контролируемого замачивания и прорастивания, с последующей сушкой зерна ячменя, предпочтительно печной сушкой зерна ячменя. Перед сушкой замоченные и прорастающие зерна ячменя называют "зеленым солодом", который может также представлять продукт растительного происхождения (продукт растения) в соответствии с данным изобретением. Эта последовательность событий является важной для синтеза многочисленных ферментов, которые вызывают модификацию зерна, процессы, которые главным образом деполимеризуют клеточные стенки мертвого эндосперма для мобилизации нутриентов зерна и активации других деполимераз. В следующем затем процессе сушки продуцируются вкус и цвет вследствие химических реакций побурения. Хотя первичным применением солода является применение для производства напитков, он может быть также использован в других промышленных процессах, например, в качестве источника ферментов в хлебопекарной промышленности или в качестве ароматизатора и красителя в пищевой промышленности, такого как солод или солодовая мука, или непосредственно в виде солодового сиропа и т.д.

В одном аспекте данное изобретение относится к способам получения указанной композиции солода. Эти способы предусматривают предпочтительно следующие стадии:

- (i) обеспечение зерен ячменя с двойной null-LOX-мутацией;
- (ii) замачивание указанных зерен;
- (iii) прорастание замоченных зерен при заранее заданных условиях;
- (iv) сушка указанных прорастающих зерен;

с получением посредством этого композиции солода с полной потерей активности LOX-1 и активности LOX-2.

Например, этот солод может быть получен любым из способов, описанных Briggs et al. (1981) и Hough et al. (1982). Однако с данным изобретением может быть использован любой другой подходящий способ получения солода, такой как способы получения солодов специального ассортимента, в том числе, но не только, способы обжаривания солода. Неограничивающие примеры описаны в примерах 6 и 8.

Солод может быть дополнительно обработан, например, измельчением (помолом). Таким образом, продукт растительного происхождения в соответствии с этим изобретением может быть любым типом солода, таким как необработанный солод или измельченный солод или солодовая мука. Измельченный солод и его мука содержат химические компоненты солода и мертвых клеток, которые лишены способности повторного прорастания.

В другом аспекте продукты растительного происхождения в соответствии с этим изобретением содержат сироп, такой как сироп ячменя или сироп солода ячменя или даже состоят из такого сиропа. Продукт растительного происхождения может быть также экстрактом ячменя или солода.

В другом аспекте это изобретение относится к типам продуктов растений, которые являются композициями сусла, приготовленными из композиций солода, произведенных из зерен с двойной null-LOX-мутацией. Указанные солоды могут быть приготовлены только из зерен с двойной null-LOX-мутацией или из смесей, содержащих также другие зерна. Это изобретение относится также к композициям сусла, приготовленным с использованием ячменя с двойной null-LOX-мутацией или его частей, отдельно или в смеси с другими компонентами.

Указанные композиции сусла предпочтительно содержат менее 30%, более предпочтительно менее 20%, даже более предпочтительно менее 10% свободного T2N в сравнении с композицией сусла, приготовленной таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. Более предпочтительно указанные композиции сусла содержат менее 60%, более предпочтительно менее 50% свободного T2N в сравнении с композицией сусла, приготовленной таким же образом из мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934. Кроме того, указанные композиции сусла предпочтительно содержат менее 40%, более предпочтительно менее 30%, даже более предпочтительно менее 25% потенциала T2N в сравнении с композицией сусла, приготовленной таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. Более предпочтительно указанные композиции сусла содержат менее 60%, более предпочтительно менее 50% потенциала T2N в сравнении с композицией сусла, приготовленной таким же образом из мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934.

Указанное сусло может быть первым, и/или вторым, и/или последующими суслами. Эта композиция сусла может быть несброженным (сладким) суслом, прокипяченным суслом или их смесью. Эта композиция сусла может быть также ячменным суслом. Обычно композиция сусла имеет высокое содержание аминокислот и ферментируемых углеводов, причем последние являются в основном мальтозой. На фиг. 3 стадии 4-6 иллюстрируют обычный способ приготовления сусла из солода. Обычно сусло готовят объединением и инкубированием солода и воды, т.е. в процессе затирания. Во время затирания эта композиция солод/жидкость может быть дополнена дополнительными богатыми углеводами добавками, например, добавками (адъюнктами) из размолотого ячменя, размолотой кукурузы или размолотого риса. Неосоложенные зерновые добавки обычно содержат мало или не содержат активных ферментов, что делает важным дополнение ферментами солода или экзогенными ферментами для обеспечения ферментов,

необходимых для превращения сахара.

Обычно приготовление сусла начинается помолом солода, так чтобы вода могла иметь доступ к частицам зерен в фазе затирания. Указанное затирание является, по существу, продолжением процесса соложения, с ферментативной деполимеризацией субстратов. Во время затирания измельченный солод инкубируют с жидкой фракцией, такой как вода. Температуру инкубации обычно либо поддерживают постоянной (изотермическое затирание), либо постепенно увеличивают. В любом случае растворимые вещества, продуцируемые в соложении и затирании, высвобождаются в указанную жидкую фракцию. Последующее фильтрование производит разделение сусла и оставшихся твердых частиц, которые называют также "добиной". Указанное сусло может также называться "первым суслом". После промывания дробины и фильтрования может быть получено "второе сусло". Последующие сусла могут быть получены повторением этой процедуры. Неограничивающие примеры процедур, подходящих для приготовления сусла, описаны Briggs et al. (supra) и Hough et al. (supra).

Было описано, что липоксигеназная активность может быть уменьшена тепловой обработкой этих ферментов. Было описано, что сусло может быть обработано нагреванием для уменьшения липоксигеназной активности и/или что затирание выполняют при высоких температурах. Однако, кроме уменьшения липоксигеназной активности, тепловая обработка может иметь другие, вредные действия, такие как уменьшение других ферментативных активностей. Кроме того, тепловая обработка уменьшает липоксигеназную активность только с момента, когда предпринимается тепловая обработка, и, следовательно, она не влияет на предшествующее накапливание липоксигеназных продуктов.

Таким образом, в одном варианте осуществления сусло в соответствии с этим изобретением готовят с использованием способа, в котором начальная температура затирания не превышает 70°C, предпочтительно не превышает 69°C, так, например, начальная температура затирания может находиться в диапазоне 50-69°C, таком как диапазон 55-69°C, например в диапазоне 55-65°C. Предпочтительно сусло в соответствии с этим изобретением не подвергают температурам 70° или более высоким температурам в течение более 25 мин, предпочтительно не более 20 мин, более предпочтительно не более 15 мин во время затирания. Если температуры затирания являются слишком высокими, это будет влиять на ферментативную активность в заторе и может уменьшать, или даже устранять, желаемые ферментативные активности, что будет приводить к измененному качеству этого сусла.

Первое, второе и последующие сусла могут быть объединены и после этого подвергнуты кипячению. Это непрокипяченное сусло, либо чистое первое сусло, либо объединенное сусло, называют также "сладким суслом"; после кипячения оно может называться "прокипяченным суслом". Если это сусло должно использоваться в производстве пива, перед кипячением часто добавляют высушенные шишки хмеля.

Композиция сусла может быть также приготовлена инкубированием растений ячменя с двойной null-LOX-мутацией или их частей, таких как неосоложенные зерна ячменя с двойной null-LOX-мутацией, в частности размолотые, неосоложенные зерна ячменя с двойной null-LOX-мутацией или их части, с одним или несколькими подходящими ферментами, такими как композиции ферментов или композиции смесей ферментов, например, Cereflo, Ultraflo или Ondea Pro (Novozymes). Способ получения напитка из приготовленного таким образом сусла может также называться "варкой пива из ячменя", а его композиция сусла может называться "ячменным суслом", или "сваренным из ячменя суслом". Композиция сусла может быть также приготовлена с использованием смеси солода и неосоложенных растений ячменя, или их частей, или только из неосоложенного ячменя, необязательно дополненного одним или несколькими подходящими ферментами во время указанного приготовления, в частности амилазами, глюканазами [предпочтительно (1-4)- и/или (1-3,1-4)-β-глюканазой], и/или ксиланазой (такой как арабиноксалаза), и/или протеазами, или смесями ферментов, содержащими один или несколько из вышеупомянутых ферментов, например, добавлением смеси ферментов Ondea Pro (Novozymes).

В одном конкретном варианте осуществления этого изобретения композиция сусла по данному изобретению является ячменным суслом, таким как прокипяченное ячменное сусло, т.е. суслом, приготовленным инкубированием неосоложенных (и предпочтительно размолотых) зерен ячменя с двойной null-LOX-мутацией с водой, предпочтительно затиранием и промыванием дробины. Такое ячменное сусло характеризуется чрезвычайно низкими уровнями T2N и потенциала T2N. Так, указанное ячменное сусло предпочтительно содержит менее 50%, более предпочтительно менее 40%, даже более предпочтительно менее 30% свободного T2N в сравнении с композицией ячменного сусла, приготовленного таким же образом из ячменя дикого вида, предпочтительно из культивара Power. Более предпочтительно указанные композиции сусла содержат менее 70%, более предпочтительно менее 60% свободного T2N в сравнении с композицией сусла, приготовленного таким же образом из мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934. Кроме того, указанное ячменное сусло предпочтительно содержит самое большее 0,15 ppb свободного T2N, когда указанное сусло доведено до °p (градуса плотности Плато) в диапазоне 13-16, предпочтительно в диапазоне 14-15, более предпочтительно до 14,5°p. Кроме того, указанное ячменное сусло предпочтительно содержит менее 50%, более предпочтительно менее 40%, даже более предпочтительно менее 30% потенциала T2N в сравнении с композицией ячменного сусла, приготовленного таким же образом из ячменя дикого вида, предпочтительно из культивара Power. Указанное ячменное сусло

предпочтительно содержит менее 50%, более предпочтительно менее 40%, даже более предпочтительно менее 30% предшественника T2N в сравнении с композицией ячменного сусла, приготовленного таким же образом из ячменя дикого вида, предпочтительно из культивара Power.

Данное изобретение относится также к продуктам растительного происхождения, которые могут быть пищевыми композициями, кормовыми композициями и композициями ароматичных сырьевых материалов, которые содержат растения ячменя с двойной null-LOX-мутацией или их части. Пищевые композиции, например, могут быть, но не ограничиваются ими, соложенными или неосоложенными зернами ячменя, ячменной мукой, хлебом, дробленой ячменной крупой, зерновыми смесями, содержащими ячмень, полезными для здоровья продуктами, такими как напитки, содержащие ячмень, ячменные сиропы, и композиции зерновых хлопьев, размолотого или экструдированного ячменя. Кормовые композиции включают, например, композиции, содержащие зерна ячменя и/или ячменные мучки. Композиции ароматичного сырьевого материала описаны здесь ниже.

Это изобретение относится также к смесям композиций этого изобретения. Например, это изобретение в одном аспекте относится к композиции, приготовленной с использованием смеси:

(i) композиции, содержащей растение ячменя или его часть, содержащую первую мутацию, которая приводит к полной потере функции активности LOX-1, например полной потере функционального фермента LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функции активности LOX-2, например полной потере активного фермента LOX-2; и

(ii) композиции солода, приготовленной из зерен с двойной null-LOX-мутацией.

В предпочтительном аспекте данное изобретение относится к напиткам, более предпочтительно солодовым напиткам, даже более предпочтительно ферментированным напиткам, таким как ферментированные солодовые напитки, предпочтительно алкогольным напиткам, таким как пиво, имеющим стабильные органолептические качества, где указанный напиток приготовлен с использованием ячменя с двойной null-LOX-мутацией или его частей. Таким образом, в одном предпочтительном варианте осуществления этого изобретения этот напиток предпочтительно готовят ферментацией ячменя с двойной null-LOX-мутацией или его частей, или их экстрактов, например, ферментацией сусла из солода с двойной null-LOX-мутацией, отдельно или в комбинации с другими ингредиентами.

Однако в других вариантах осуществления этого изобретения этот напиток является неферментированным напитком, например, суслом, полученным из солода ячменя с двойной null-LOX-мутацией. В данное изобретение включено также то, что указанный напиток может быть приготовлен из неосоложенных растений ячменя, или их частей.

Этот напиток может быть также неалкогольным напитком, таким как безалкогольное пиво или другие типы неалкогольных напитков, такие как безалкогольные солодовые напитки, такие как мальтина.

Однако предпочтительно указанный напиток готовят из композиции солода, полученного из зерен ячменя с двойной null-LOX-мутацией. Более предпочтительно указанным напитком является пиво. Этот напиток может быть любым типом пива, известным лицу с квалификацией в данной области. В одном варианте осуществления это пиво является, например, пивом лагер. Это пиво предпочтительно варят с использованием композиции солода, содержащей проросший ячмень с двойной null-LOX-мутацией, более предпочтительно указанное пиво варят с использованием композиции солода, приготовленной исключительно из проросшего ячменя с двойной null-LOX-мутацией. Однако эта композиция солода может также содержать другие компоненты, например, другие проросшие или непроросшие зерновые растения, такие как ячмень дикого типа, null-LOX-ячмень, пшеница и/или рожь, или непроросшие исходные материалы, которые содержат сахара, или композиции, полученные из осоложенных или неосоложенных исходных материалов, в том числе композиции сиропа. Однако предпочтительно весь ячмень, такой как весь осоложенный и/или неосоложенный ячмень, и/или проросший, и/или непроросший ячмень, используемый для приготовления указанного пива, является предпочтительно ячменем с двойной null-LOX-мутацией.

В предпочтительном варианте осуществления напиток по этому изобретению является пивом, которое было получено из сусла, приготовленного из высушенного печной сушкой солода, предпочтительно затиранием и, необязательно, промыванием дробины. Такое пиво может также называться здесь "осоложенным". Однако напиток по этому изобретению может быть также получен из ячменного сусла. Такое пиво называют "ячменным пивом".

В одном предпочтительном варианте осуществления напиток по этому изобретению содержит менее 50%, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 35%, например менее 30% потенциала T2N в сравнении с потенциалом T2N напитка, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. Напиток по этому изобретению предпочтительно содержит также менее 70%, предпочтительно менее 60%, например, менее 50% потенциала T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из null-LOX-мутанта ячменя, предпочтительно из мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934. Напитки по этому изобретению предпочтительно содержат также самое большее 2 б.д., более предпочтительно самое большее 1,5 б.д., например самое большее 1 б.д. потенциала T2N, если °р в исходном экстракте, на котором основан этот напиток, доводят до величины в диапазоне 10-12°р, более предпочтительно до 11°р.

В одном предпочтительном варианте осуществления напитков по этому изобретению содержит менее 50%, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 35%, например менее 30% предшественника T2N в сравнении с предшественником T2N напитка, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. Напиток по этому изобретению также содержит предпочтительно менее 70%, предпочтительно менее 60%, например менее 50% предшественника T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934. Напитки по этому изобретению предпочтительно содержат также самое большее 2 б.д., более предпочтительно самое большее 1,5 б.д., например самое большее 1 б.д. потенциала T2N, если °р в исходном экстракте, на котором основан этот напиток, доводят до величины в диапазоне 10-12°р, более предпочтительно до 11°р.

В одном конкретном варианте осуществления этого изобретения этот напиток является ячменным пивом, которое содержит менее 50%, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 35% потенциала T2N в сравнении с потенциалом T2N ячменного пива, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. В этом варианте осуществления указанное ячменное пиво по этому изобретению содержит также предпочтительно менее 50%, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 35% предшественника T2N в сравнении с предшественниками T2N ячменного пива, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. В этом варианте осуществления ячменное пиво по этому изобретению содержит также предпочтительно самое большее 2 б.д., более предпочтительно самое большее 1,5 б.д., например самое большее 1,2 б.д. потенциала T2N. Кроме того, в этом варианте осуществления ячменное пиво по этому изобретению содержит также предпочтительно самое большее 2 б.д., более предпочтительно самое большее 1,5 б.д., даже более предпочтительно самое большее 1,2 б.д. предшественника T2N, если °р в исходном экстракте, на котором основан этот напиток, доводят до величины в диапазоне 10-12°р, более предпочтительно до 11°р.

В другом конкретном варианте осуществления этого изобретения этот напиток является пивом, полученным из солода, где указанное пиво содержит менее 50%, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 30% потенциала T2N в сравнении с потенциалом T2N пива, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. В этом варианте осуществления указанное пиво по этому изобретению содержит также предпочтительно менее 50%, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 30% предшественника T2N в сравнении с предшественниками T2N пива, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. В этом варианте осуществления пиво по этому изобретению также содержит предпочтительно самое большее 2 б.д., более предпочтительно самое большее 1,5 б.д., даже более предпочтительно самое большее 1 б.д. потенциала T2N. Кроме того, в этом варианте осуществления ячменное пиво по этому изобретению содержит также предпочтительно самое большее 2 б.д., более предпочтительно самое большее 1,5 б.д., даже более предпочтительно самое большее 1 б.д. предшественника T2N, если °р в исходном экстракте, на котором основан этот напиток, доводят до величины в диапазоне 10-12°р, более предпочтительно до 11°р.

Термин "органолептические качества" обозначает качества, воспринимаемые обонятельными и вкусовыми ощущениями. Их анализирует, например, обученная специализированная дегустационная комиссия. Предпочтительно эта дегустационная комиссия обучена конкретно узнаванию альдегидных привкусов, таких как привкус T2N. Обычно эта дегустационная комиссия будет состоять из 3-30 членов, например из 5-15 членов, предпочтительно из 8-12 членов. Эта дегустационная комиссия может оценивать присутствие различных привкусов, таких как бумажный привкус, привкус окисленного продукта, привкус старости и привкус хлеба. Что касается данного изобретения, предпочтительно, чтобы были уменьшены, в частности, бумажный привкус и/или привкус старости. Способ определения "органолептических качеств" напитка описан в примере 6 в международной заявке на патент WO 2005/087934. Другой предпочтительный способ определения "органолептических качеств" напитка описан в примерах 8 и 9 здесь далее. В предпочтительных вариантах осуществления стабильные органолептические качества являются, по меньшей мере частично, результатом низких уровней T2N или потенциала T2N.

Предпочтительно напитки по этому изобретению характеризуются наличием меньшего бумажного привкуса в сравнении со сходным напитком, приготовленным таким же образом из растения ячменя, содержащего активность LOX-1 и LOX-2, после хранения в течение по меньшей мере 10 месяцев в диапазоне 15-25°C, например около 20°C. Предпочтительно указанный бумажный привкус равен менее 90%, более предпочтительно менее 80%, например менее 70% согласно оценке обученной дегустационной комиссии.

Предпочтительно также напитки данного изобретения имеют уменьшенный бумажный привкус в сравнении с подобным напитком, приготовленным из ячменя дикого типа, после хранения при повышенных температурах. При определении свойства "бумажного привкуса" обученной специализированной дегустационной комиссией, как описано выше, и оценивании по шкале 0-5, где 0 обозначает отсутствие, а 5 обозначает крайнюю степень привкуса. Предпочтительно, чтобы напитки этого изобретения имели одну или более, предпочтительно по меньшей мере две, например по меньшей мере три, например, из

всех следующих оценок в отношении бумажного привкуса:

(i) оценку в отношении бумажного привкуса по меньшей мере на 0,5, предпочтительно по меньшей мере на 0,7, более предпочтительно по меньшей мере на 1,0 более низкую, чем эта оценка в отношении бумажного привкуса напитка, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power после инкубирования при 37°C в течение одной недели;

(ii) оценку в отношении бумажного привкуса по меньшей мере на 0,5, предпочтительно по меньшей мере на 0,7, более предпочтительно по меньшей мере на 1,0 более низкую, чем эта оценка в отношении бумажного привкуса напитка, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power после инкубирования при 37°C в течение двух недель;

(iii) оценку в отношении бумажного привкуса по меньшей мере на 0,5, предпочтительно по меньшей мере на 0,7, более предпочтительно по меньшей мере на 1,0 более низкую, чем эта оценка в отношении бумажного привкуса напитка, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power после инкубирования при 37°C в течение трех недель;

(iv) оценку в отношении бумажного привкуса самое большее 90%, предпочтительно самое большее 80%, более предпочтительно самое большее 70%, даже более предпочтительно самое большее 60%, еще более предпочтительно самое большее 50% оценки в отношении бумажного привкуса напитка, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power после инкубирования при 37°C в течение одной недели;

(v) оценку в отношении бумажного привкуса самое большее 90%, предпочтительно самое большее 80%, более предпочтительно самое большее 70%, даже более предпочтительно самое большее 60%, еще более предпочтительно самое большее 50% оценки в отношении бумажного привкуса напитка, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power после инкубирования при 37°C в течение двух недель;

(vi) оценку в отношении бумажного привкуса самое большее 90%, предпочтительно самое большее 80%, более предпочтительно самое большее 70%, даже более предпочтительно самое большее 60%, еще более предпочтительно самое большее 50% оценки в отношении бумажного привкуса напитка, приготовленного таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power после инкубирования при 37°C в течение трех недель.

Говорят, что напиток имеет "стабильные органолептические качества", когда указанный напиток содержит очень низкие уровни свободного T2N, даже после хранения. Таким образом, одной целью данного изобретения является обеспечение напитков (таких как пиво со стабильными органолептическими качествами), приготовленных с использованием растений ячменя с двойной null-LOX-мутацией. Такие напитки предпочтительно содержат очень низкие уровни потенциала T2N, предпочтительно менее 50%, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 35%, например менее 30%, например менее 20%, например менее 10% потенциала T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power, после хранения в течение по меньшей мере 1 недели, предпочтительно по меньшей мере 2 недель, более предпочтительно по меньшей мере 3 недель, даже более предпочтительно в течение по меньшей мере 4 недель, например в диапазоне 1-3 месяцев, например в диапазоне 3-6 месяцев, например в диапазоне 6-12 месяцев, например в течение более одного года.

Кроме того, напитки по этому изобретению предпочтительно содержат очень низкие уровни T2N, предпочтительно менее 50%, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 35%, даже более предпочтительно менее 30%, например менее 25% свободного T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power, после хранения в течение по меньшей мере 1 недели, предпочтительно по меньшей мере 2 недель, более предпочтительно по меньшей мере 3 недель, даже более предпочтительно в течение по меньшей мере 4 недель при температуре 30-40°C, предпочтительно при 37°C, например, в диапазоне 1-3 месяцев, например в диапазоне 3-6 месяцев, например в диапазоне 6-12 месяцев, например в течение более одного года при температуре в диапазоне 20-30°C.

В частности, напитки по этому изобретению предпочтительно содержат очень низкие уровни T2N, предпочтительно менее 50%, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 35% свободного T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power, после хранения в течение 2 недель при 37°C. Напитки по этому изобретению содержат также предпочтительно менее 50 т.д., даже более предпочтительно менее 40 т.д., даже более предпочтительно менее 30 т.д. свободного T2N после хранения в течение 2 недель при 37°C. Предпочтительно указанное хранение выполняют в присутствии уровня сульфита, не превышающего 10 м.д., предпочтительно уровня сульфита в диапазоне 1-10 м.д., более предпочтительно в диапазоне 1-8 м.д., более предпочтительно в диапазоне 2-6 м.д., еще более предпочтительно в диапазоне 3-5 м.д., например 4 м.д. сульфита.

Напитки по этому изобретению предпочтительно также содержат менее 80%, предпочтительно менее 75%, например менее 60% свободного T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из null-LOX-1-ячменем, предпочтительно из мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934,

после хранения в течение 2 недель при 37°C. Предпочтительно указанное хранение выполняют в присутствии уровня сульфита, не превышающего 10 м.д., предпочтительно уровня сульфита в диапазоне 1-10 м.д., более предпочтительно в диапазоне 1-8 м.д., более предпочтительно в диапазоне 2-6 м.д., еще более предпочтительно в диапазоне 2-4 м.д.

Эти напитки (такие как пиво, например, ячменное пиво) по этому изобретению особенно предпочтительно также содержат очень низкие уровни T2N, предпочтительно менее 50%, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 35%, даже более предпочтительно менее 30%, еще более предпочтительно менее 25% свободного T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power, после хранения в течение 8 недель при 37°C. Кроме того, эти напитки (такие как пиво, например, ячменное пиво) предпочтительно содержат самое большее 50 т.д., даже более предпочтительно самое большее 40 т.д., еще более предпочтительно самое большее 30 т.д., даже более предпочтительно самое большее 20 т.д. свободного T2N после хранения в течение 8 месяцев при 37°C. Предпочтительно указанное хранение выполняют в присутствии уровня сульфита, не превышающего 10 м.д., предпочтительно уровня сульфита в диапазоне 1-10 м.д., более предпочтительно в диапазоне 1-8 м.д., более предпочтительно в диапазоне 1-6 м.д., еще более предпочтительно в диапазоне 2-4 м.д., например 3 м.д. сульфита.

Напитки по этому изобретению предпочтительно также содержат менее 70%, предпочтительно менее 60%, даже более предпочтительно менее 55% свободного T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из null-LOX-1-ячменя, предпочтительно из мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934, после хранения в течение 8 недель при 37°C. Предпочтительно указанное хранение выполняют в присутствии уровня сульфита, не превышающего 10 м.д., предпочтительно уровня сульфита в диапазоне 1-10 м.д., более предпочтительно в диапазоне 1-8 м.д., более предпочтительно в диапазоне 2-6 м.д., еще более предпочтительно в диапазоне 2-4 м.д.

Кроме того, одной целью данного изобретения является обеспечение напитков, таких как пиво, произведенное с использованием растения ячменя с двойной null-LOX-мутацией, предпочтительно содержащих менее 70%, предпочтительно менее 60%, например менее 50% T2N и/или потенциала T2N, более предпочтительно менее 70%, предпочтительно менее 60%, например менее 50% свободного T2N, в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из мутанта ячменя D112, как описано в WO 2005/087934, после хранения в течение по меньшей мере 1 недели, предпочтительно по меньшей мере 2 недель, более предпочтительно по меньшей мере 3 недель, даже более предпочтительно в течение по меньшей мере 4 недель при температуре в диапазоне 30-40°C, предпочтительно при 37°C, например в диапазоне 1-3 месяцев, например в диапазоне 3-6 месяцев, например в диапазоне 6-12 месяцев, например в течение более одного года при температуре в диапазоне 20-30°C.

В частности, напитки (такие как пиво, например, ячменное пиво) по этому изобретению предпочтительно содержат очень низкие уровни T2N, предпочтительно 70%, предпочтительно менее 60%, более предпочтительно менее 55%, даже более предпочтительно менее 52% свободного T2N, в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power, после хранения в течение 8 недель при 37°C. Предпочтительно указанное хранение выполняют в присутствии уровня сульфита, не превышающего 10 м.д., предпочтительно уровня сульфита в диапазоне 1-10 м.д., более предпочтительно в диапазоне 1-8 м.д., более предпочтительно в диапазоне 1-6 м.д., еще более предпочтительно в диапазоне 2-4 м.д., например, 3 м.д. сульфита.

Предпочтительно напиток по этому изобретению содержит также в диапазоне 1-10 миллионных долей (м.д.) сульфита, более предпочтительно в диапазоне 2-8 м.д., более предпочтительно в диапазоне 3-7 м.д., еще более предпочтительно в диапазоне 4-6 м.д. сульфита. Напитки по этому изобретению предпочтительно содержат самое большее 0,07, предпочтительно самое большее 0,06, более предпочтительно самое большее 0,05, даже более предпочтительно самое большее 0,04, например, самое большее 0,03 б.д. свободного T2N после хранения в течение по меньшей мере 1 недели, предпочтительно по меньшей мере 2 недель, более предпочтительно по меньшей мере 3 недель, даже более предпочтительно в течение по меньшей мере 4 недель, например в диапазоне 1-3 месяцев, например в диапазоне 3-6 месяцев, например в диапазоне 6-12 месяцев, например в течение более одного года после хранения при температуре в диапазоне 15°C-40°C, предпочтительно в диапазоне 30°C-37°C, более предпочтительно при 37°C. В одном предпочтительном варианте осуществления этого изобретения напитки по этому изобретению содержат самое большее 0,03 б.д., предпочтительно самое большее 0,025 б.д., более самое большее 0,02 б.д. (биллионных долей) свободного T2N после хранения в течение 4 недель при 37°C в присутствии сульфита в диапазоне 4-6 м.д.

Напитки со стабильными органолептическими качествами по этому изобретению предпочтительно содержат низкие уровни потенциала T2N, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 30%, даже более предпочтительно менее 25% потенциала T2N в сравнении со сходным напитком, приготовленным таким же образом из растения ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power.

В одном варианте осуществления это изобретение относится к напиткам, таким как пиво, с низкими уровнями тригидроксиктадеценовых кислот (также называемых ТНА), в частности, к напиткам с низкими уровнями 9,12,13-ТНА и 9,10,13-ТНА. ТНА отличаются горьким вкусом (Baur and Grosch, 1977;

Baur et al., 1977) и, следовательно, считаются нежелательными.

Желательно также, чтобы уровень 9,12,13-ТНА и 9,10,13-ТНА был таким низким, как это только возможно, предпочтительно более низким чем 1,3 м.д., например более низким чем 1 м.д. Однако общая концентрация 9,12,13-ТНА и 9,10,13-ТНА в полученном из солода напитке, таком как пиво, зависит также от количества солода, используемого для получения указанного конкретного напитка. Таким образом, обычно крепкое пиво будет содержать больше 9,12,13-ТНА и 9,10,13-ТНА, чем более легкое, что делает более высокий общий уровень 9,12,13-ТНА и 9,10,13-ТНА приемлемым в более крепком пиве. Таким образом, напиток по этому изобретению содержит предпочтительно более низкий уровень 9,12,13-ТНА и 9,10,13-ТНА, чем напиток, приготовленный таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. В частности, напиток по этому изобретению предпочтительно имеет уровень 9,12,13 ТНА, который равен самое большее 50%, предпочтительно самое большее 40%, более предпочтительно самое большее 30% в сравнении с этим уровнем в напитке, приготовленном таким же образом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. Кроме того, напиток по этому изобретению предпочтительно имеет уровень 9,10,13 ТНА, который равен самое большее 70%, предпочтительно самое большее 60% в сравнении с этим уровнем напитка, приготовленного тем же самым способом из ячменя дикого типа, предпочтительно из культивара Power. Такие напитки могут быть получены с использованием ячменя с двойной null-LOX-мутацией.

В одном варианте осуществления этого изобретения эти напитки имеют улучшенное качество пены. Это имеет значение, когда этот напиток является пивом. Таким образом, одной целью этого изобретения является обеспечение напитков, таких как пиво, с превосходным качеством пены. Предпочтительно напитки этого изобретения производят на 10% больше, предпочтительно по меньшей мере на 20% больше, еще более предпочтительно по меньшей мере на 25% больше пены за 60-80 мин, предпочтительно за 80 мин, в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из ячменя дикого типа, из культивара Power. Указанное образование пены определяют, как описано в примере 9 здесь ниже.

Это изобретение относится также к способам получения указанного напитка. Эти способы предпочтительно предусматривают следующие стадии:

- (i) обеспечение композиции солода, содержащей проросшие зерна с двойной null-LOX-мутацией;
- (ii) переработка указанной композиции солода в напиток,

с получением посредством этого напитка с более стабильными органолептическими качествами.

В одном предпочтительном варианте осуществления этот напиток является пивом. В этом случае стадия переработки предпочтительно предусматривает приготовление сусла из указанной композиции солода, например, любым из описанных здесь выше способов, и ферментирование указанного сусла.

В общих чертах, алкогольные напитки, такие как пиво, могут быть приготовлены из осоложенных и/или неосоложенных зерен ячменя. Солод, наряду с высушенными шишками хмеля и дрожжами, способствует вкусу и цвету пива. Кроме того, солод функционирует в качестве источника ферментируемого сахара и ферментов. Схематическое представление общего процесса получения пива показано на фиг. 3, тогда как подробные описания примеров подходящих способов для получения солода и пивоварения могут быть найдены, например, в публикациях Briggs et al. (1981) и Hough et al. (1982). Многочисленные, регулярно модернизируемые способы для анализов ячменя, солода и продуктов пива являются доступными, но не ограничиваются ими, например, в American Association of Cereal Chemists (1995), American Society of Brewing Chemists (1992), European Brewery Convention (1998) и Institute of Brewing (1997). Общепризнанным является то, что для конкретной варки пива используют многочисленные специфические процедуры, с наиболее важными вариациями, относящимися к предпочтениям местных потребителей. Любой такой способ приготовления пива может быть использован с данным изобретением. Неограничивающие примеры описаны в примерах 8 и 9.

Композиция солода вышеописанного напитка, такого как пиво, солодовые напитки или неферментированное сусло, может быть получена, например, любым из описанных здесь выше способов.

Сусло может быть приготовлено из указанной композиции солода, как описано здесь выше.

Первая стадия получения пива из сусла предпочтительно включает в себя кипячение указанного сусла. Во время кипячения могут быть добавлены другие ингредиенты, например, высушенные шишки хмеля, которые обеспечивают типичные горькие и ароматичные характеристики пива. Кипячение сусла вызывает также агрегацию между полифенолами и денатурированными белками, которые в основном осаждаются во время следующей фазы охлаждения сусла. После охлаждения сусло переносят в ферментационные чаны, содержащие дрожжи. Предпочтительно указанными дрожжами являются хлебопекарные дрожжи, *Saccharomyces carlsbergensis*. Это сусло будет ферментироваться в течение любого подходящего периода времени, обычно в диапазоне 1-100 дней. Во время ферментационного процесса, продолжающегося несколько дней, сахар превращается в спирт и CO<sub>2</sub> одновременно с развитием некоторых вкусовых веществ.

Затем это пиво может дополнительно обрабатываться, например охлаждаться. Оно может быть отфильтровано и/или выдержано в лаггер-танке, в процессе, который развивает приятный запах и менее дрожжевой вкус. Могут быть также добавлены добавки. Кроме того, может быть добавлен CO<sub>2</sub>. Наконец, пиво может быть пастеризовано и/или отфильтровано перед упаковкой (например, посредством розлива

в бутылки или в банки для пива).

Несмотря на успехи в области производства пива, было бы предпочтительным уменьшение уровней T2N и потенциала T2N в пиве. Таким образом, остается потребность в новых исходных материалах, в частности ячменя и солода, которые способствуют уменьшению привкусов в готовом пиве. Таким образом, одной целью данного изобретения является обеспечение таких растений ячменя и солода.

Доступны различные способы для определения, получено ли растение ячменя или продукт растения из растения ячменя, несущего мутации в генах для LOX-1 и LOX-2, вызывающие полную потерю функционального фермента LOX-1 и полную потерю функционального фермента LOX-2. Продукты растений будут обычно содержать, по меньшей мере, некоторое количество геномной ДНК из растения, используемого для их получения. Так, солод будет содержать большие количества геномной ДНК, но даже экстракты ячменя и солода, такие как сусло, могут содержать геномную ДНК или ее фрагменты из указанного ячменя или солода. Напитки на основе ячменя, такие как пиво, также могут содержать геномную ДНК или ее фрагменты из указанного растения. Посредством анализа ДНК в продукте растения можно установить, несет ли растение, из которого получен продукт растения, мутации в генах LOX-1 и LOX-2, вызывающие полную потерю функционального фермента LOX-1 и полную потерю функционального фермента LOX-2. Указанные мутации могли бы быть, например, любой из мутаций в генах LOX-1 и LOX-2, описанных здесь выше в разделе "Потеря функции активности LOX". Геномная ДНК может быть анализирована любым применимым способом, таким как секвенирование, или способами на основе амплификации, в том числе способами на основе ПЦР. Если предполагаются конкретные мутации в гене LOX-1 и/или гене LOX-2, то может быть использован анализ полиморфизмов, например, SNP-анализ. Такой анализ может выполняться, как описано здесь ниже в примере 10. Квалифицированный специалист будет способен адаптировать специфический SNP-анализ, описанный в этих примерах, для применения с другими мутациями или другим исходным материалом.

Если вышеупомянутые продукты растительного происхождения получают только из растений ячменя, несущих мутации в генах для LOX-1 и LOX-2, вызывающих полную потерю функционального фермента LOX-1 и полную потерю функционального фермента LOX-2, то присутствие vs. отсутствия мРНК LOX-1 и мРНК LOX-2 и/или белка LOX-1 и белка LOX-2 ячменя может быть также показателем того, получен ли указанный продукт растения из растения ячменя с двойной null-LOX-мутацией. Испытание этого продукта растения может также выполняться с использованием Вестерн-анализа или другого анализа белков или при помощи ОТ-ПЦР, или с использованием Нозерн-блот-анализа, или при помощи других анализов мРНК. Такие анализы особенно применимы, когда продуктом растения является солод.

Химический мутагенез.

Для генерирования растений ячменя с двойной null-LOX-мутацией по этому изобретению, т.е. растений, содержащих первую мутацию, которая приводит к полной потере функционального фермента LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функционального фермента LOX-2, готовят очень большое количество мутантов ячменя любым подходящим способом мутагенеза, например с использованием химического мутагенеза зерен ячменя. Известно, что этот способ вводит мутации случайным образом. Мутагенез ячменя может выполняться с использованием любого мутагенизирующего химиката. Однако его выполняют предпочтительно обработкой зерен, давая выживающим зернам прорастать, с последующим анализом растений-потомков. Генерация растений, вырастающих из этих мутагенизированных зерен, называемая M0, содержит гетерозиготные химеры для любой конкретной мутации. Растения-потомки, собранные после самоопыления, называют генерацией M1, в которой конкретная мутация расщепляется в соответствующие гетерозиготы и гомозиготы (см. фиг. 1).

Обработка зерен  $\text{NaN}_3$  не является эквивалентной обработке отдельной клетки, так как эти зерна после обработки будут содержать некоторое количество немутантных клеток и разнообразие клеток, имеющих ДНК-мутации. Поскольку мутации в ряде поколений клеток, которые не приводят к зародышевой линии, будут потеряны, задачей является нацеливание мутагена на небольшое количество клеток, которые развиваются в репродуктивные ткани, которые способствуют развитию генерации M1.

Для оценивания общей эффективности мутаций можно подсчитать альбино-химеры и альбино-растения в генерациях M0 и M1. Оценивание количества мутантов как функции выживающих растений дает приближенную оценку эффективности мутаций, тогда как оценивание количества мутантов как функции обработанных семян измеряет комбинацию как эффективности мутации, так и убивания зерен.

Примечательно, что клетки имеют механизмы гарантии качества фактически в каждой стадии экспрессии генов, возможно, для смягчения эффектов повреждающих мутаций. Одним хорошо исследованным примером в эукариотах является нонсенс-опосредуемый распад мРНК, называемый NMD, который предотвращает синтез потенциально вредных, преждевременно укороченных белков (Maquat and Carmichael, 2001; Wu et al., 2007). В NMD, кодон терминации идентифицирован как преждевременный по его положению относительно расположенных ниже (справа) по ходу транскрипции от дестабилизирующих элементов. Мутации, которые генерируют кодоны преждевременной терминации (нонсенс) (PTC), иногда увеличивают уровни альтернативно сплайсированных транскриптов, которые пропускают агрессивные мутации, сохраняя тем самым потенциально функцию белка (Mendell and Dietz, 2001).

### Селекция растений.

В одном варианте осуществления этого изобретения целью является обеспечение агрономически применимых растений ячменя, содержащих признак двойной LOX-мутации. Развитие сельскохозяйственной культуры часто является продолжительным и трудным процессом, который начинается с введения этого нового признака. Однако на основании видения перспективы селекционера, эта стадия почти всегда приводит к растению, которое имеет менее желательный общий профиль агрономических признаков, чем профиль существующих коммерческих сортов.

Кроме признака двойной null-LOX-мутации, имеются дополнительные факторы, которые также могут рассматриваться в области генерирования коммерческого сорта пивоваренного ячменя, например урожай и размер зерен, и другие параметры, которые связаны с производительностью соложения или производительностью варки пива. Поскольку было показано, что многие, если не все, релевантные признаки находятся под генетическим контролем, данное изобретение обеспечивает также современные, гомозиготные, высокоурожайные пивоваренные культивары, которые могут быть получены из скрещиваний с растениями ячменя с двойной null-LOX-мутацией, которые описаны в данной публикации. Зерна таких растений ячменя обеспечивают новый исходный материал, имеющий низкую способность генерирования потенциала T2N, т.е. солод, полученный из таких зерен, предпочтительно имеет менее 50% потенциала T2N в сравнении с солодом, получаемым из null-LOX-1-мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934. Квалифицированный селекционер, выводящий сорта ячменя, будет способен селекционировать и развивать растения ячменя, которые после скрещиваний с ячменем с двойной null-LOX-мутацией будут приводить к лучшим культиварам. Альтернативно, селекционер ячменя может использовать растения данного изобретения для дальнейшего мутагенеза для генерирования культиваров, происходящих из ячменя с двойной null-LOX-мутацией.

Одним способом для гарантии, что признак двойной null-LOX-мутации сохраняется в линиях-потомках, является SNP-анализ гена LOX-1 и гена LOX-2. Предпочтительно определяют также активности LOX-1 и LOX-2.

Растения ячменя по данному изобретению могут вводиться в любую подходящую программу селекции.

Другой целью данного изобретения является обеспечение сельскохозяйственных элитных растений ячменя, содержащих признак двойной null-LOX-мутации. Таким образом, это изобретение относится также к способам получения нового растения ячменя с двойной null-LOX-мутацией скрещиванием первого родительского (исходного) растения со вторым родительским (исходным) растением, где это первое или второе растение является ячменем с двойной null-LOX-мутацией. Дополнительно, как первое, так и второе родительские растения могут происходить из сорта ячменя с двойной null-LOX-мутацией. Таким образом, любые такие способы, использующие сорт ячменя с двойной null-LOX-мутацией, являются частью этого изобретения: самоопыление, обратное скрещивание, скрещивание с популяциями и т.п. Все растения, произведенные с использованием сорта ячменя с двойной null-LOX-мутацией в качестве родителя, находятся в объеме этого изобретения, в том числе растения, развитые из сортов, полученных из сорта ячменя с двойной null-LOX-мутацией. Ячмень с двойной null-LOX-мутацией может быть также использован для генетической трансформации в таких случаях, в которых экзогенную ДНК вводят в растение и экспрессируют в растении или ткани растения с двойной null-LOX-мутацией.

Способы обратного скрещивания могут быть использованы с данным изобретением для введения в другой культивар признака двойной null-LOX-мутации мутированного растения ячменя, например культивар Scarlett или культивар Jersey, оба из которых являются современными, высокоурожайными культиварами ячменя с высокопроизводительным соложением. В одном стандартном протоколе обратного скрещивания, исходный представляющий интерес сорт, т.е. родительское растение, с которым гибрид скрещивается вновь, скрещивают со вторым сортом (не повторяющимся родительским растением), несущим представляющие интерес мутантные гены LOX, которые подлежат переносу. Затем полученные из этого скрещивания растения-потомки с двойной null-LOX-мутацией скрещивают с повторяющимся родительским растением, причем этот процесс повторяют, пока не получают растение ячменя, в котором, по существу, все из характеристик, указанных этим повторяющимся родителем, обнаруживаются в генерируемом растении, наряду с признаком двойной null-LOX-мутации неповторяющегося родительского растения. В конце концов, последнее генерированное, полученное обратным скрещиванием растение самоопыляют с получением растения-потомка с двойной null-LOX-мутацией чистотипного разведения.

Один путь ускорения этого процесса разведения растений предусматривает начальное размножение генерируемых мутантов с использованием культуры ткани и способов регенерации. Таким образом, другим аспектом данного изобретения является обеспечение клеток, которые после роста и дифференцировки продуцируют растения ячменя, имеющие признак двойной null-LOX-мутации. Например, селекция может включать традиционные скрещивания, получение фертильных полученных из пыльников растений или использование культуры микроспор.

### Продукты LOX-пути.

В различных вариантах осуществления данное изобретение относится к растениям ячменя и их продуктам, содержащим низкие уровни потенциала T2N. Ферменты LOX катализируют диоксигенирование полиненасыщенных жирных кислот системой цис-1, цис-4-пентадиена. В ячмене C<sub>18</sub> полиненасыщенные жирные кислоты линолевая кислота (18:2<sup>Δ9, 12</sup>) и α-линоленовая кислота (18:3<sup>Δ9, 12, 15</sup>) являются основными субстратами LOX. Липоксигеназный путь метаболизма жирных кислот инициируется добавлением молекулярного кислорода в положении C-9 (в основном катализируемым LOX-1) или положении C-13 (в основном катализируемым LOX-2) ацильной цепи, с получением соответствующих 9- и 13-НРОДЕ [9- и 13-гидропероксиоктадекатриеновые кислоты (НРОТЕ) являются продуктами, когда субстратом является α-линоленовая кислота, но НРОТЕ не функционируют в качестве предшественников для T2N]. В гидропероксидлиазном ответвлении пути LOX как 9-, так и 13-НРОДЕ могут расщепляться до оксокислот и альдегидов с короткой цепью (см. фиг. 2). В частности, 9-НРОДЕ может расщепляться с образованием цис-ноненаля, который превращается в T2N, тогда как 13-НРОДЕ является предшественником 2-Е-гексеналя. Таким образом, не ожидалось, что 13-НРОДЕ, главный продукт LOX-2-катализируемого диоксигенирования линолевой кислоты, является компонентом, расположенным выше по ходу реакции, в пути, приводящем к образованию затхлого привкуса T2N.

Понятно, что данное изобретение охватывает влияние на продуцирование ниже по ходу процесса метаболитов катализа LOX-1 и LOX-2, которые не продуцируются в качестве прямого продукта катализируемой LOX-1 и LOX-2 реакцией, но являются результатом последующей серии реакций. Они включают в себя спонтанные, индуцируемые факторами или катализируемые ферментами изомеризации и превращения. Таким образом, продуцирование этих образующихся ниже по ходу процесса метаболитов могло бы изменяться модуляцией экспрессии других компонентов этого пути, например гидропероксидлиазы (HPL).

### Потенциал T2N.

Важной целью данного изобретения является уменьшение или элиминация потенциала T2N. Таким образом, целью данного изобретения является уменьшение образования предшественников T2N и альдегидных аддуктов. Хотя несколько химических реакций, относящихся к приобретению затхлости пива, являются неясными, генерирование свободного T2N из потенциала T2N признается главной причиной развития затхлого привкуса в пивных продуктах (Kuroda et al., supra). Таким образом, целью данного изобретения является обеспечение напитков с низким уровнем потенциала T2N, а также напитков с низким уровнем предшественников T2N.

Большая часть потенциала T2N переносится из сусла в готовое пиво, в которое может высвободиться свободный T2N (Liegeois et al., 2002), причем условия кислотности и температуры, являются важными факторами в этом процессе. Со ссылкой на данное изобретение потенциал T2N определяется, как описано здесь выше в определениях. Во избежание путаницы значение "потенциала T2N" в данном контексте является таким, как описано здесь выше в определениях. Химические вещества, которые имеют способность высвобождения T2N или превращения в T2N, называются здесь "предшественниками T2N", и предшественники T2N, определяемые или измеряемые альтернативными способами, другими, чем способ определения потенциала T2N, называются "предшественниками T2N".

Предшественники T2N могут быть, в частности, определены обработкой пробы сначала таким образом, что, по существу, все (предпочтительно все) из ее химических веществ, которые способны высвобождать T2N или превращаться в T2N, действительно высвобождают T2N и/или превращаются в T2N соответственно. После этого определяют уровень T2N.

Зерна ячменя данного изобретения не содержат активности LOX-1 и LOX-2. Интересно, что такие зерна ячменя содержат очень малый потенциал T2N.

Таким образом, пиво, полученное с использованием зерен ячменя с двойной null-LOX-мутацией, имеет не только очень низкий уровень T2N, но также очень низкий уровень потенциала T2N. В объеме данного изобретения находятся зерна ячменя с двойной null-LOX-мутацией, которые дают полученные из пива продукты, которые содержат очень низкие уровни потенциала T2N, предпочтительно менее 40%, более предпочтительно менее 30%, даже более предпочтительно менее 25% уровня потенциала сходного полученного из пива продукта, получаемого тем же самым образом из ячменя дикого типа (предпочтительно культивара Power). Таким образом, указанный полученный из пива продукт предпочтительно содержит менее 60%, более предпочтительно менее 50% потенциала T2N сходного полученного из пива продукта, полученного таким же образом из мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934.

Продукты растения, полученные из зерен ячменя с двойной null-LOX-мутацией, также предпочтительно имеют очень низкий уровень предшественников T2N. В объеме данного изобретения находятся продукты растительного происхождения, приготовленные из зерен ячменя с двойной null-LOX-мутацией, причем указанные продукты растительного происхождения содержат менее 40%, более предпочтительно менее 30%, даже более предпочтительно менее 25% уровня предшественников T2N сходного продукта растительного происхождения, полученного тем же самым образом из ячменя дикого типа (предпочтительно культивара Power). Таким образом, указанный продукт растительного происхождения

предпочтительно содержит менее 60%, более предпочтительно менее 50% предшественников T2N сходного продукта растительного происхождения, полученного таким же образом из мутанта ячменя D112, описанного в WO 2005/087934.

Следует отметить, что измеренные величины T2N часто являются более высокими в пробах и в продуктах микроосоложенного исходного материала, чем величины T2N из исходного материала, полученного в большем масштабе, например в экспериментальной пробе соложения большого масштаба (30 кг). Однако относительные экспериментальные величины T2N между экспериментами большого и малого масштаба являются в общем сходными.

Подобным образом, следует отметить, что измеренные потенциалы T2N (и предшественники T2N) часто являются более высокими в пробах и в продуктах микроосоложенного исходного материала, чем потенциалы T2N (и предшественники T2N) из исходного материала, полученного в большем масштабе, например в экспериментальной пробе соложения большого масштаба (30 кг). Однако относительные экспериментальные величины потенциалов T2N между экспериментами большого и малого масштаба являются в общем сходными.

### Примеры

Приведенные здесь примеры иллюстрируют предпочтительные варианты этого изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие в отношении этого изобретения.

Если нет других указаний, базовые молекулярно-биологические способы выполняли для манипуляции нуклеиновыми кислотами и бактериями, как описано в Sambrook and Russel (2001).

#### Пример 1.

Скрининг на низкую активность LOX-2 в мутированных, зрелых зародышах мутированной null-LOX-популяции, генерации M3.

LOX-1 и LOX-2, оба, синтезируют в созревающем зародыше ячменя (причем LOX-1 является преобладающим ферментом), а также в прорастающем зародыше (с равными уровнями обоих ферментов). Для определения активностей LOX в тысячах проб наиболее удобными были бы анализы, использующие экстракты зародышей ячменя. И в анализах на уровни LOX-2 было бы очень удобно проводить скрининг зерен мутагенизированного null-LOX-1-ячменя (ср. WO 2005/087934).

Зерна собирали из растений ячменя null-LOX-1-мутанта D112 (описанного в WO 2005/087934 и депонированного ATCC под номером PTA-5487) и инкубировали с мутагеном  $\text{NaN}_3$  для индукции точечных мутаций в геномной ДНК ячменя. Экспериментальные схемы соответствовали рекомендациям, обеспеченным Kleinhofs et al. (supra).

Затем мутированные зерна генерации M1 размножали в полевых участках на протяжении двух последующих генераций с получением в конечном счете высокой доли гомозиготных растений генерации M3 для целей скрининга (см. фиг. 1 в отношении описания процедуры). Ожидалось, что мутированные зерна генерации M3 содержат мутации генов с частотой 0,9-2,3 на 10000 зерен (Kleinhofs et al., supra).

Было обнаружено, что активность LOX-2 в зрелых зародышах null-LOX-1-мутанта была низкой, как измерено общепринятым анализом LOX-1. Здесь исходные растворы реакционной смеси комбинируют одновременно с экстрактом (как описано в WO 2005/087934). В этой заявке подробно описан способ, который улучшает чувствительность анализа, в котором были изменены как условия экстракции ферментов, так и смешивание исходных растворов реакционной смеси.

Что касается экстракции LOX, авторы данного изобретения обнаружили неожиданно, что использование в качестве буфера 100 мМ молочной кислоты, pH 4,5, вызывало значимо уменьшенный уровень фона потребляющей HPODE активности, делая возможным накопление HPODE в этом буфере для анализа. Кроме того, авторы этого изобретения обнаружили, что этот анализ мог быть дополнительно улучшен позволением минорной фракции образованных HPODE активировать LOX-2 посредством окисления  $\text{Fe}^{++} \rightarrow \text{Fe}^{+++}$  его связанных атомов железа перед добавлением остальных реагентов анализа, с образованием в конечном счете синего индаминового красителя.

Вкратце, фермент LOX-2 экстрагировали из выделенных зрелых зародышей с использованием 200 мкл буфера для экстракции (100 мМ молочная кислота, pH 4,5). Экстракцию выполняли в 96-луночных планшетах, в которых каждая лунка на 1,2 мл содержала круглую стеклянную бусину с диаметром 5 мм. Эти планшеты инкубировали на льду в течение 10 мин перед переносом в лабораторную мельницу MM 300 (Retsch), электронно приспособленную для встряхивания при частоте  $27 \text{ c}^{-1}$  в течение 35 с. Затем этот планшет центрифугировали при 4000 об/мин в центрифуге Allegra 6R Centrifuge (Beckman-Coulter) в течение 10 мин при 4°C для осаждения нерастворимого материала и после этого хранили на льду в течение максимально 2 ч перед дальнейшей обработкой. Этот 96-луночный планшет переносили в автоматизированную лабораторную рабочую станцию Biomek 2000 (Beckman-Coulter) для дополнительного пипетирования. Сначала 96×40 мкл экстрактов зародышей переносили в стандартный 96-луночный микротитрационный планшет (Nunc), с последующим добавлением 90 мкл Реагента А [12,5 мМ 3-(диметиламино)бензойной кислоты, 0,625 мМ линолевой кислоты], который был приготовлен сначала смешиванием 155 мкл линолевой кислоты, соответствующей 134 мг свободной кислоты (Sigma, L-1376), и 257 мкл Твина-20; затем добавляли  $\text{H}_2\text{O}$  до объема 5 мл, с последующим добавлением 600 мкл

1 М NaOH. Этот осветленный раствор доводили до 20 мл с использованием H<sub>2</sub>O. Эти смеси инкубировали в течение 10 мин перед добавлением 90 мкл реагента В (0,25 мМ 3-метил-2-бензотиазолинонгидазола, 0,125 мг/мл гемоглобина). После дополнительного инкубирования в течение 5 мин измеряли A<sub>595</sub> в каждой из 96 лунок этого планшета с использованием спектрофотометра Flouorostar Galaxy (BMG Labtechnologies), с образованием окраски, отражающей присутствие HPODE, генерированных LOX-2-катализируемым диоксигенированием (активности даны соответственно в A<sub>595</sub>-единицах).

С использованием вышеописанной процедуры в целом 21000 мутантных линий ячменя анализировали на активность LOX-2 и 1500 линий из них были отобраны на основе низкой активности LOX-2. Эти линии дополнительно размножали в поле, после чего активность LOX-2 измеряли в этих зрелых зернах. Однако было обнаружено, что ни одна из этих линий не передавала признак низкого LOX-2 следующему поколению.

#### Пример 2.

Скрининг на низкую активность LOX-2 в прорастающих зародышах ячменя.

Улучшенный материал для скрининга.

Зерна, собранные из растений ячменя null-LOX-1-линии Ca211901, полученной скрещиваниями (null-LOX-1-мутант D112×Jersey)×Sebastian, инкубировали с мутагеном NaN<sub>3</sub> в соответствии с деталями, обеспеченными Kleinhofs et al. (supra). Эту процедуру выбирали, так как известно, что она индуцирует точечные мутации в геномной ДНК ячменя, в конечном счете вызывая замены аминокислотных остатков или укорочения в белках, кодируемых этой мутагенизированной ДНК. В экспериментах по мутагенезу данной публикации было выбрано размножение мутированных зерен генерации M1 в полевых участках на протяжении двух последующих генераций с получением в конечном счете высокой доли гомозиготных растений для целей скрининга (см. фиг. 1). Хотя зерна генерации M2 не подвергали скринингу, прежде всего вследствие того, что ожидалось, что они содержат относительно высокую долю гетерозиготных точечных мутаций, мутантные зерна генерации M3 использовали в качестве материала для скрининга, с ожиданием 0,9-2,3 мутаций на 10000 зерен (Kleinhofs et al., supra).

Неожиданно, эти авторы обнаружили, что анализ зародышей обеспечивал гораздо лучшие результаты анализа прорастающих зародышей в сравнении с анализом экстрактов зрелых зародышей (как описано выше в примере 1). Таким образом, была установлена высокопроизводительная процедура скрининга для измерения активности LOX-2 в прорастающем зародыше, в том числе ткани щитка.

Два зародыша выделяли из зрелых зерен 35125 колосьев ячменя (20977 линий генерации M4 null-LOX-1-мутанта D112 и 14148 линий генерации M3 null-LOX-1-линии Ca211901-линий) и переносили в 96-луночные планшеты для хранения (ABgene). Прорастание зародышей инициировали после добавления 20 мкг воды в каждую лунку, которую покрывали влажной тканью Kimnett и пластиковой крышкой. Эти планшеты инкубировали в пластиковых мешках при 20°C в течение 48 ч. После инкубации фермент LOX-2 экстрагировали; в каждую лунку сначала добавляли стеклянную бусину диаметром 5 мм и 200 мкл буфера для экстракции (100 мМ раствор молочной кислоты, pH 4,5) с последующим размалыванием в течение 35 с при частоте 27 с<sup>-1</sup> в лабораторной мельнице MM 300 (Retsch). Затем этот планшет центрифугировали при 4000 об/мин в центрифуге Allegra 6R Centrifuge (Beckman-Coulter) в течение 10 мин при 4°C для осаждения нерастворимого материала. Активность LOX-2 определяли, в основном как описано для анализа активности LOX-2 экстрактов зрелых зародышей (пример 1), с тем различием, что использовали только 30 мкл экстракта на один анализ вместо 40 мкл.

Идентификация потенциальных мутантов.

Как описано выше, два зерна каждой из вышеупомянутых 35125 линий ячменя анализировали на активность LOX-2 с целью идентификации зерен с сильно уменьшенной указанной активностью в сравнении с null-LOX-1-зернами и зернами дикого типа. В целом 7 потенциальных исходных мутантов идентифицировали в генерации M3 линии Ca211901. Их дополнительно размножали в оранжерее, собирали и затем повторно подвергали скринингу на этот признак, связанный с очень низкой активностью LOX. В конечном счете было показано, что только один мутант линии Ca211901, названный мутантом A689 (и здесь также называемый мутантом A689 с двойной null-LOX-мутацией), по существу, не проявлял активности LOX-2. Подробные измерения общей активности LOX выполняли с экстрактами прорастающих зародышей, в которых активность LOX сообщалась почти исключительно LOX-2 (Schmitt and van Mechelen, 1997). Для проросших зародышей зерен M3 мутанта A689 общая активность LOX, как определено колориметрическим анализом LOX (пример 1; табл. 1), была равна 0,163±5,5% A<sub>595</sub> Е/проросший зародыш, тогда как общая активность LOX для материнского null-LOX-1-сорта Ca211901 была равна 1,224±3,8% A<sub>595</sub> Е/проросший зародыш (соответствующая величина для исходного null-LOX-1-мутанта D112 была равна 1,215±6,0% A<sub>595</sub> Е/проросший зародыш).

Пример 3.

Мутант ячменя A689.

Проводили анализы для установления, были ли null-LOX-2-растения генераций M4 и M5 гомозиготными в отношении соответствующего мутантного фенотипа. Этот тип анализа мог бы помочь определению, была ли эта мутация генетически рецессивной или доминантной. Кроме того, если растения генерации M3 были гетерозиготными в отношении доминантной мутации, то индивидуумы последующих генераций могли расщепляться в отношении этого фенотипа.

Общую активность LOX измеряли в зародышах ячменя генераций M3, M4 и M5 мутанта A689 и активности сравнивали не только с активностями зародышей материнской линии Ca211901, но также с активностью null-LOX-1-мутанта D112. Определение активности LOX было описано в примере 1 данной публикации. Во всех этих экспериментах контрольные пробы включали стандартные экстракты из прорастающих зародышей материнской линии, а также инактивированные нагреванием, стандартные экстракты из зародышей null-LOX-1-мутантной линии Ca211901 и мутанта D112. Для зародышей зерен генерации M4 мутанта A689 средняя общая активность LOX была равна  $0,151 \pm 2,6\%$   $A_{595}$  E ( $n=24$ ), а для прорастающих зародышей генерации M5 мутанта A689 она была равна  $0,16 \pm 2,3\%$   $A_{595}$  E ( $n=90$ ). Для сравнения, прорастающие зародыши null-LOX-1-линии Ca211901 и мутанта D112 давали  $1,210 \pm 3,0\%$   $A_{595}$  E ( $n=90$ ; генерация M4) и  $1,199 \pm 4,6\%$   $A_{595}$  E ( $n=90$ ; генерация M5), соответственно. Эти результаты суммированы в табл. 1 и на фиг. 4А-С. В целом эти экспериментальные данные подтвердили, что зерна генераций M4 и M5 мутанта D112 были гомозиготными в отношении генетического признака, определяющего очень низкую общую активность LOX, отражающую фенотип двойной null-LOX-мутации.

Таблица 1

Общая активность LOX (среднее) в экстрактах, полученных из проросших зародышей ячменя исходных мутантов (генерации М3) и потомков (генераций М4 и М5)

| Экстракты                                     | Общая активность LOX      | Анализируемые линии | Стандартное отклонение |
|-----------------------------------------------|---------------------------|---------------------|------------------------|
|                                               | A <sub>595</sub> -единицы | №                   | %                      |
| Генерация М3                                  |                           |                     |                        |
| Мутант А689                                   | 0,163                     | 8                   | 5,5                    |
| Са211901                                      | 1,224                     | 6                   | 3,8                    |
| D112                                          | 1,215                     | 6                   | 6,0                    |
| Са211901<br>(инактивированные<br>нагреванием) | 0,099                     | 10                  | 1,3                    |
| D112<br>(инактивированные<br>нагреванием)     | 0,096                     | 10                  | 1,1                    |
| Генерация М4<br>(потомство)                   |                           |                     |                        |
| Мутант А689                                   | 0,151                     | 24                  | 2,6                    |
| Са211901                                      | 1,223                     | 6                   | 2,3                    |
| D112                                          | 1,209                     | 6                   | 5,6                    |
| Са211901<br>(инактивированные<br>нагреванием) | 0,096                     | 10                  | 1,7                    |
| D112<br>(инактивированные<br>нагреванием)     | 0,101                     | 10                  | 1,0                    |
| Генерация М5<br>(потомство)                   |                           |                     |                        |
| Мутант А689                                   | 0,160                     | 90                  | 2,3                    |
| Са211901                                      | 1,210                     | 90                  | 3,0                    |
| D112                                          | 1,199                     | 90                  | 4,6                    |
| Са211901<br>(инактивированные<br>нагреванием) | 0,103                     | 10                  | 2,0                    |
| D112<br>(инактивированные<br>нагреванием)     | 0,097                     | 10                  | 1,2                    |

#### Пример 4.

Анализ на основе ВЭЖХ HPODE в проросшем и микроосоложенном ячмене.

Анализ на HPODE ячменя проводили, по существу, как описано в Международной заявке на патент WO 2005/087934, за исключением использования прорастающих зародышей вместо зрелых зародышей. Зерна генерации М4 проращивали в течение 48 ч, как описано в примере 2. Зерна генерации М5 подвергали процедуре микроосоложения, выполняемого, по существу, как описано в примере 6 здесь далее, но конкретные уровни HPODE определяли после 72 ч прорастания и опускали процедуру печной сушки. Уровни 9-и 13-HPODE определяли, давая экстрактам неочищенного белка из прорастающих зародышей генераций М4 и М5 мутанта А689 и контрольным пробам инкубироваться с субстратом линолевой кислотой. Продукты реакции анализировали с использованием ВЭЖХ. Проросшие зародыши иссекали из зерен ячменя с использованием скальпеля для разреза между щитком и эндоспермом. Затем каждую пробу из 4 зародышей помещали между двумя кусочками бумаги для взвешивания и осторожно измельчали постукиванием для получения однородной муки. Ее переносили в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл; добавляли 600 мкл буфера с 200 мМ молочной кислотой, pH 4,5 и эту пробирку помещали на лед

и выдерживали в течение 10 мин перед дополнительной гомогенизацией с использованием пластикового пестика (Kontes). Затем в каждую пробирку добавляли 600 мкл  $H_2O$  и эти пробы центрифугировали в течение 2 мин при  $20000 \times g$ . Аликвоту 100 мкл полученного супернатанта переносили в центрифужную пробирку на 15 мл (Cellstar; cat. No. 188271) для подготовки для анализа продуктов реакции после действия LOX. 2 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера, pH 6,5, содержащего 260 мкМ линолевую кислоту [этот субстрат готовили смешиванием 10 мл 100 мМ Na-фосфатного буфера, pH 6,5, с 100 мкл 24 мМ исходного раствора линолевой кислоты]. Последний готовили сначала смешиванием 155 мкл линолевой кислоты (соответствующей 134 мг свободной кислоты; L-1376, Sigma) и 257 мкл Твина-20, затем добавлением  $H_2O$  до объема 5 мл с последующим добавлением 600 мкл 1н. NaOH и, когда этот раствор становился прозрачным, доведением этого объема до 20 мл водой. После 15-минутной инкубации при  $\sim 30$  об/мин на ротаторе для пробирок с кровью добавляли 2 мл этилацетата и содержимое проб перемешивали сильным встряхиванием в течение 5 с для экстракции 9- и 13-HPODE. Затем эту пробу центрифугировали в течение 10 мин при  $80 \times g$  и 1 мл этилацетата переносили в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл, в которой этилацетат выпаривали под током газообразного азота. Затем HPODE ресуспендировали в 300 мкл метанола и фильтровали через мембрану 0,45 мкм (Millex-HN filter, Millipore). Анализ содержания HPODE выполняли при помощи ВЭЖХ. В целом 15 мкл из каждой пробы инжестировали в ВЭЖХ-установку (HP 1100 Series, Hewlett Packard), снабженную колонкой 4,6 $\times$ 250 мм Symmetry C18 (Waters). Используемой подвижной фазой была смесь 16:12:10:0,5 (об.:об.:об.:об.) вода:метанол:ацетонитрил:тетрагидрофуран:трифторуксусная кислота. Скорость потока этой подвижной фазы была равна 1 мл/мин, а давление, измеряемое на выходе колонки, было равно 140 бар. Это разделение выполняли при 30°C. Детектирование гидропероксидов линолевой кислоты с конъюгированными двойными связями выполняли при 234 нм.

На фиг. 5 показано сравнение полученных профилей HPODE. Хроматограмма пробы стандарта, содержащая смесь 9- и 13-HPODE, показана на фиг. 5А. Сравнения хроматограммы экстракта, полученного из прорастающих 48 ч зерен генерации M4 null-LOX-мутанта D112 (фиг. 5В), с хроматограммой мутанта A689 с двойной null-LOX-мутацией (фиг. 5С) выявили значительное образование 13-HPODE ферментами LOX, экстрагированными из проросших зародышей null-LOX-мутанта D112, тогда как несколько или только очень мало 9- и 13-HPODE наблюдали в экстрактах мутанта A689 с двойной null-LOX-мутацией.

Сходные характеристики наблюдали при анализе 72-часовых микроосоложенных зародышей дикого типа культивара Barke (фиг. 6А), null-LOX-1-мутанта D112 (фиг. 6В) и мутанта A689 с двойной null-LOX-мутацией (фиг. 6С). Снова существенные уровни как 9-, так и 13-HPODE образовывались в зрелых зародышах культивара Barke дикого типа (фиг. 6А). Экстракты null-LOX-1-мутанта D112 образовывали очень низкие количества 9-HPODE, но высокие количества 13-HPODE (фиг. 6В), подтверждая тем самым отсутствие активности LOX-1. И снова, экстракты двойного null-LOX-мутанта ячменя A689 не образовывали значимых уровней 9- и 13-HPODE (фиг. 6С), подтверждая полное отсутствие активностей как LOX-1, так и LOX-2.

#### Пример 5.

Свойства двойного null-LOX-мутанта ячменя A689, его материнского null-LOX-1-сорта Ca211901 и null-LOX-1-мутанта D112.

Размножение растений в оранжерее.

Зерна генерации M4 и M5 двойного null-LOX-мутанта ячменя A689 и его материнской линии Ca211901 проращивали в оранжерее и выращивали в суточных циклах при 20 ч света при 12°C и 65% относительной влажности. Характеристики роста растений линии Ca211901 и двойного null-LOX-мутанта ячменя A689 были сходными в отношении высоты растений, количества побегов на одно растение, наступления зацветания и количества зерен на колос, подтверждая, что развитие зерен и физиология роста мутанта A689 подобны дикому типу.

Агрономическая продуктивность мутанта A689 в полевых условиях.

Растения двойного null-LOX-мутанта ячменя A689 и null-LOX-1-мутанта D112, а также растения линии Ca211901 сравнивали в стандартных полевых испытаниях с целью идентификации возможных различий в отношении высоты, даты выколашивания, устойчивости к болезням, полегания, раскрытия колоса, времени созревания и урожая (см. табл. 2). Таким образом, равные количества вышеупомянутых зерен высевали в полевых участках 7,88 м<sup>2</sup> в одном местоположении, причем каждый содержал две повторности. Агрономические свойства, опять с особым вниманием в отношении вышеупомянутых свойств, наблюдали тщательно на протяжении всего вегетационного периода. Не наблюдали различий в отношении агрономических признаков для любого из испытанных растений.

Таблица 2

## Сравнение агрономической продуктивности

| Свойство                    | Мутант А689              | Материнская линия Са211901 | Мутант D112            |
|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|
| Генотип LOX                 | null-LOX-1<br>нуль-LOX-2 | null-LOX-1<br>wt LOX-2     | null-LOX-1<br>wt LOX-2 |
| Дата посева 2007            | 29 марта                 | 29 марта                   | 29 марта               |
| Длина при зрелости (см)     | 68                       | 69                         | 74                     |
| Дата выколашивания 2007     | 14 июня                  | 14 июня                    | 14 июня                |
| Настоящая мучнистая роса*   | 0                        | 0                          | 0                      |
| Гельминтоспориоз*           | 3                        | 3                          | 2                      |
| Сетчатая пятнистость*       | 1                        | 1                          | 1                      |
| Ramularia*                  | 3                        | 3                          | 2                      |
| Ржавчина*                   | 1                        | 1                          | 2                      |
| Полегание*                  | 2                        | 2                          | 4                      |
| Дата зрелости 2007          | 1 августа                | 1 августа                  | 1 августа              |
| Относительный урожай 2007** | 107                      | 108                        | 100                    |
| Относительный урожай 2008*  | 104                      | 103                        | 99                     |

\*По шкале от 0 до 9, где 0 обозначает отсутствие инфекции или полегания, а 9 обозначает сильную степень инфекции или полегания.

\*\*Относительная продуктивность в сравнении с культиваром Varke, материнским сортом null-LOX-1-мутанта D112.

## Пример 6.

Анализ микросолодов и их сусел.

Микроосоложение выполняли с пробами 100 г мутантов ячменя А689 и D112, а также культиваров Varke и Power. Эти мутантные линии размножали в поле в течение нескольких сезонов для получения достаточного материала зерен для испытаний соложения и пивоварения.

Замачивание.

Использовали условия: 8 ч водяное; 14 ч сухое; 8 ч водяное; 10 ч сухое; 4 ч в замоченной воде при 16°C.

Соложение.

Использовали условия: 12 ч при 18°C; 24 ч при 16°C; 24 ч при 14°C; 60 ч при 12°C.

Условия сушки были следующими: 12 ч при 60°C; 3 ч при 68°C; 4 ч при 74°C; 3 ч при 80°C.

Готовые солоды использовали для измерений T2N.

Кроме того, пробы ячменя и солода мутантов А689 и D112, а также пробы ячменя и солода культиваров Varke и Power использовали для анализов при помощи стандартных способов EBC (см. табл. 3).

Приготовление сусла.

Для испытания свойств мутантов А689 и D112 в сравнении с культиваром Power получали пробы солода 25-225 г и использовали их в системе лабораторного затирания, которая содержала наружный смеситель и водяную баню, снабженные термостатом, способным спускать температуру определенным образом. Затирание выполняли в малом масштабе с готовым затором, отделяемым через бумажный фильтр, для получения сладкого сусла. Кипячение сусла выполняли в лабораторном масштабе с использованием нагревающего кожуха и круглодонной колбы, соединенной с обратным холодильником.

Как сладкие, так и прокипяченные сусла использовали для измерений T2N (см. фиг. 7-9). Для проб, полученных из зерен генерации 5 двойного null-LOX-мутанта ячменя А689, наблюдали явное ~75%-ное

уменьшение уровней T2N (среднего из трех мутантных линий A689). Кроме того, существенные уменьшения регистрировали для уровней как свободного T2N, так и предшественников T2N в сусле, полученном из микросоложенных проб (фиг. 8, 9).

Уровни T2N определяли газовой хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием (GC-MS), после дериватизации карбониллов O-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гидроксиламином, по существу, как описано Groenqvist et al. (1993).

Таблица 3

| Анализ микросолода   |           |                    |                |                |
|----------------------|-----------|--------------------|----------------|----------------|
| Проба                |           | Культивар<br>Power | Мутант<br>A689 | Мутант<br>D112 |
| Генотип LOX          |           | wt LOX-1           | null-<br>LOX-1 | null-<br>LOX-1 |
|                      |           | wt LOX-2           | null-<br>LOX-2 | wt LOX-2       |
| <b>Ячмень</b>        |           |                    |                |                |
| Содержание влаги     | %*        | 9,3                | 9,5            | 10,5           |
| Белок                | %*        | 12                 | 10,6           | 10,9           |
| Крахмал              | %*        | 61,7               | 63,0           | 62,4           |
| Проращение, 72 ч     | %*        | 100                | 95             | 95             |
| Показатель всхожести |           | 9,9                | 6,6            | 8,3            |
| Гранулометрия        | >2,5 мм   | 97                 | 98,8           | 91,6           |
| TKW                  | г         | 48,6               | 55,8           | 37,5           |
| $\beta$ -глюкан      | %, сухой  | 4,0                | 3,6            | 3,3            |
| $\beta$ -амилаза**   | Ед/г      | 1039               | 1458           | 1027           |
| Предсказанный DP     | WK        | 385                | 538            | 381            |
| <b>Солод</b>         |           |                    |                |                |
| Время соложения      | Н         | 124                | 148            | 124            |
| Выход солода         | %         | 95,1               | 95,9           | 95,3           |
| Содержание влаги     | %*        | 4,8                | 5,6            | 4,6            |
| Белок, сухой         | %*        | 11,2               | 10,3           | 9,9            |
| N, сухой             | %*        | 1,72               | 1,65           | 1,58           |
| Растворимый N        | %*        | 0,67               | 0,62           | 0,64           |
| <b>Сусло</b>         |           |                    |                |                |
| Экстракт             | %*        | 81,0               | 81,0           | 80,9           |
| $\beta$ -глюкан      | %*, сухой | 0,2                | 0,3            | 0,26           |
| Модификация солода   | %         | 95                 | 95             | 96             |
| Гомогенность солода  | %         | 81                 | 70             | 71             |
| $\beta$ -амилаза**   | Ед/г      | 956                | 1235           | 937            |
| Предсказанный DP     | WK        | 385                | 478            | 379            |
| $\alpha$ -амилаза*** | Ед/г      | 242                | 234            | 264            |

\*Измерено стандартной спектроскопией пропускания в ближней ИК-области спектра.

\*\*Активность  $\beta$ -амилазы измеряли с использованием набора Megazyme (код продукта K-BETA).

\*\*\*Активность  $\alpha$ -амилазы измеряли с использованием набора Megazyme (код продукта K-CERA).

Пример 7.

ТНА в пиве, полученном из солода двойного null-LOX-мутанта A689.

Специфические для пива ТНА происходят, по-видимому, из линолевой кислоты (Drost et al., 1974). Несколько сообщений подтвердили, что общее содержание ТНА в пиве находится в диапазонах 5,7-11,4 мкг/мл (Hamberg, 1991 и ссылки в этой работе). В то время как 9,12,13-ТНА обычно составляет 75-85% ТНА в пиве, 9,10,13-ТНА обычно составляет только 15-25%. Другие изомеры обнаруживаются в следовых количествах.

В пиве, приготовленном из сусла, полученного из солода двойного null-LOX-мутанта ячменя A689 (см. пример 8, за исключением того, что затирание проводили при температуре 60°C), концентрация 9,12,13-ТНА уменьшалась на 75% в сравнении с контрольным пивом, полученным из солода культивара Power, и уменьшалась на 45% в сравнении с исходным null-LOX-1-мутантом D112 (табл. 4). Сходные различия наблюдали также для изомера 9,10,13-ТНА. Эти измерения проводили с использованием стандартных ВЭЖХ-масс-спектрометрических анализов (Hamberg, supra).

Таблица 4  
ТНА в типах пива, полученных из солода культивара Power,  
null-LOX-1-мутантов D112 и двойного null-LOX-мутанта  
ячменя A689 (среднее из 3 измерений)

| ТНА             |          |          |                     |
|-----------------|----------|----------|---------------------|
| Тип солода      | 0,12,13- | 9,10,13- | 9,12,13- : 9,10,13- |
| м. д.           |          |          | отношение           |
| Культивар Power | 3,76     | 1,12     | 3,35                |
| Мутант D112     | 1,72     | 0,94     | 1,80                |
| Мутант A689     | 0,94     | 0,50     | 1,88                |

Пример 8.

Экспериментальное соложение и пивоварение.

Соложение.

Проводили эксперименты с зернами двойного null-LOX-мутанта A689, null-LOX-1-мутанта D112 и культивара Power (во всех случаях урожая 2007 года). Соложения в масштабах 30 кг выполняли в солодовенном цехе следующим образом:

- (i) замачивание при 16°C: 8 ч водяное; 14 ч сухое; 8 ч водяное; 10 ч сухое; 4 ч водяное;
- (ii) соложение: 12 ч при 18°C; 24 ч при 16°C; 24 ч при 14°C; 60 ч при 12°C;
- (iii) сушка: 12 ч при 60°C; 3 ч при 68°C; 4 ч при 74°C; 3 ч при 80°C.

Свойства ячменя и солода приведены в списке в табл. 5. Исследование этих результатов выявило, что эти пробы удовлетворяли спецификациям солода для применения исходных материалов в пивоварении.

Таблица 5

## Экспериментальные данные

| Проба                                  |             | Культу-<br>вар<br>Power      | Мутант<br>A689                   | Мутант<br>D112             | Культу-<br>вар<br>Barke      |
|----------------------------------------|-------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Генотип LOX                            |             | wt LOX-<br>1<br>wt LOX-<br>2 | null-LOX-<br>1<br>null-LOX-<br>2 | null-LOX-<br>1<br>wt LOX-2 | wt LOX-<br>1<br>wt Lox-<br>2 |
| <b>Ячмень</b>                          |             |                              |                                  |                            |                              |
| Белок                                  | %*          | 12,0                         | 10,6                             | 10,9                       | 10,6                         |
| Крахмал                                | %*          | 61,7                         | 63,0                             | 62,5                       | 64,2                         |
| Проращивание,<br>72 ч                  | %           | 100                          | 95                               | 85                         | 100,0                        |
| Показатель<br>всхожести                | 1-10        | 9,9                          | 6,6                              | 8,3                        | 9,6                          |
| Водочувстви-<br>тельность              | %           | 1                            | 78                               | 45                         | 14                           |
| Грануломет-<br>рия >2,5 мм             | %           | 97,0                         | 98,8                             | 91,6                       | 88,3                         |
| TKW                                    | г           | 48,6                         | 55,8                             | 37,5                       | 49,5                         |
| $\beta$ -глюкан                        | %,<br>сухой | 4,0                          | 3,6                              | 3,3                        | 3,6                          |
| $\beta$ -амилаза**                     | Е/г         | 1039                         | 1458                             | 1027                       | 1093                         |
| <b>Ячмень</b>                          |             |                              |                                  |                            |                              |
| Время<br>замачивания и<br>проращивания | ч           | 124                          | 148                              | 124                        | 124,0                        |
| Экстракт                               | %*          | 81,0                         | 80,7                             | 80,9                       | 82,5                         |
| Число                                  |             |                              |                                  |                            |                              |
| Кольбаха                               | %           | 37,5                         | 37,1                             | 40,2                       | 42,0                         |
| Модификация                            | %           | 95                           | 94                               | 97                         | 96                           |
| Гомогенность                           | %           | 81                           | 61                               | 81                         | 83                           |
| $\beta$ -глюкан                        | %,<br>сухой | 0,2                          | 0,3                              | 0,2                        | 0,1                          |
| $\beta$ -амилаза**                     | Ед/г        | 956                          | 1261                             | 928                        | 985                          |
| $\alpha$ -амилаза***                   | Ед/г        | 242                          | 222                              | 262                        | 201                          |

\*Измерено стандартной спектроскопией пропускания в ближней ИК-области спектра.

\*\*Активность  $\beta$ -амилазы измеряли с использованием набора Megazyme (код продукта K-BETA).

\*\*\*Активность  $\alpha$ -амилазы измеряли с использованием набора Megazyme (код продукта K-CERA).

Экспериментальное пивоварение с солодом.

Первоначальное испытание с использованием 200 л, с его ключевыми результатами, иллюстрированными на фиг. 10А, В, включало следующие стадии:

- (i) приготовление сусла;
- (ii) отделение сусла;
- (iii) кипячение сусла;
- (iv) ферментацию;
- (V) выдержку;
- (vi) фильтрование светлого пива и
- (vii) розлив в бутылки.

Сусла готовили с использованием больших (30 кг) проб солода культивара дикого типа Power, null-LOX-1-мутанта D112 и двойного null-LOX-мутанта. Начало затирания проводили при 48°C в течение 20 мин с последующим нагреванием в течение 18 мин, в котором эту температуру повышали с 48 до 67°C. Выдержка (пауза) для осахаривания при 67°C длилась в течение 30 мин с последующей стадией повышения нагревания до 72°C в течение 5 мин и выдержкой в течение 15 мин перед окончанием затирания при 78°C. Стадии пивоварения, приведенные здесь выше, т.е. кипячение и фильтрование сусла, отделение гидроциклонным сепаратором, ферментация, выдержка и розлив в зеленые стеклянные бутылки, соответствовали требованиям для стандартной практики пивоварения.

Предшественники T2N готового пива определяли (фиг. 10) с использованием той же самой экспериментальной схемы, которая описана в примере 6. Результаты данного крупномасштабного эксперимента показывали ту же самую тенденцию в относительных уровнях предшественников T2N, какая имеется в прокипяченном сусле микроосоложенных зерен (ср. фиг. 9 и 10), снова выявляющую явно более низкие величины как для null-LOX-1-мутанта D112, так и для двойного null-LOX-мутанта ячменя A876 в сравнении с результатами культивара Power. Более конкретно, предшественники T2N были уменьшены на ~40 и ~70% в пробах пива null-LOX-1 и двойного null-LOX-мутанта соответственно при сравнении с пивом из солода культивара Power.

Уровни свободного T2N измеряли также в вышеупомянутых полученных в экспериментальном пивоварении сортах пива, показывающих опять ту же самую тенденцию, наблюдаемую для потенциала T2N, а именно, что сорта пива, приготовленные из солода null-LOX-1 и двойного null-LOX-мутанта, были явно более низкими в отношении T2N, чем сорта, полученные из солода культивара Power. Что касается уровней T2N, было продемонстрировано, что пиво, полученное из солода двойного LOX-мутанта, соответственно, превосходило пиво из null-LOX-1-мутанта.

Отдельной целью было установление, превосходили ли сорта пива по вкусовым качествам другие сорта после искусственного (принудительного) старения, когда их получали в масштабе 200 л с использованием двойного null-LOX-исходного материала.

Таким образом, дегустационную комиссию специалистов по оценке качества пива, описанную в примере 9, попросили оценить полученные экспериментально обычные сорта пива на бумажный привкус после принудительного старения при 37°C в течение одной недели с использованием оценки от 0 (отсутствует) до 5 (крайняя степень привкуса). Хотя было обнаружено, что пиво из культивара Power обнаруживало балльную оценку бумажного привкуса 1,6, пиво из null-LOX-1 и пиво из двойного null-LOX-мутанта имели балльные оценки 1,2 и 0,6 соответственно. Этот результат доказал превосходство двойного null-LOX-исходного материала для приготовления пива со стабильным вкусом.

#### Пример 9.

Сравнения обычных и сваренных из ячменя сортов пива.

Зерна неосоложенного двойного null-LOX-мутанта A689, null-LOX-1-мутанта ячменя D112 и культивара Power дикого типа использовали для идентичных процессов варки пива из ячменя, каждое из которых использует 25 кг размолотого неосоложенного ячменя в качестве исходного материала с получением 200 л пива (для сравнительных целей, 30 кг размолотого солода использовали для получения 200 л обычного пива в параллельно проводимом эксперименте). Целью было не только сравнение свойств сусла и пива из ячменя и полученных из солода варок, но также определение, могут ли вышеупомянутые мутанты придавать улучшающие привкус характеристики как в сваренном из ячменя, так и обычном готовом пиве. Испытания варки пива в крупном масштабе 200 л предусматривали те же самые стадии получения пива, которые перечислены в примере 8, с конкретными деталями, описанными здесь ниже.

Затирание и варка пива с ячменем.

В данном эксперименте сусло готовили в присутствии смеси ферментов Ondea Pro (Novozymes; номер партии NFNG0005), добавляемой в начале затирания в соответствии с рекомендациями, обеспеченными изготовителем (например, 87,5 г смеси ферментов на 80 л H<sub>2</sub>O). Условиями затирания были: начало затирания при 54°C в течение 30 мин; 10 мин нагревания для повышения температуры до 64°C; инкубирование в течение 45 мин при 64°C; нагревание до 78°C в течение 13 мин; выдержка 10 мин при 78°C. Стадии пивоварения, кипячение и фильтрование сусла, отделение гидроциклонным сепаратором, ферментация, выдержка и розлив в зеленые стеклянные бутылки, соответствовали требованиям для стандартной практики пивоварения.

Стандартное соложение, затирание и варка пива.

При соложении использовали зерна двойного null-LOX-мутанта A689, null-LOX-1-мутанта D112 и культивара Power (во всех случаях урожая 2009 года).

Время затирания при 16°C: 8 ч водяное; 14 ч сухое; 8 ч водяное; 10 ч сухое; 4 ч водяное.

Условия соложения: 12 ч при 18°C; 24 ч при 16°C; 24 ч при 14°C; 60 ч при 12°C.

Условия печной сушки: 12 ч при 60°C; 3 ч при 68°C; 4 ч при 74°C; 3 ч при 80°C.

Анализы ячменя и солода вышеупомянутых исходных материалов выполняли в соответствии со стандартными способами ЕВС с результатами, представленными в списке в табл. 6. Все из этих солодов считали подходящими для пивоварения.

Условия затириания: начальная инкубация при 48°C в течение 20 мин; 18-минутное нагревание до 67°C; 30-минутное нагревание при 67°C; затем нагревание до 72°C в течение 5 мин; 15-минутная инкубация при 72°C; нагревание до 78°C в течение 6 мин; окончание с 5-минутной инкубацией при 78°C.

Стадии пивоварения, кипячение и фильтрование сусла, отделение гидроциклонным сепаратором, ферментация, выдержка и розлив в зеленые стеклянные бутылки, соответствовали требованиям для стандартной практики пивоварения.

Анализ прокипяченного сусла - свободный T2N.

Уровни T2N в экстрактах определяли газовой хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием (GC-MS) после экстракции твердой фазы на колонке C<sub>18</sub> и дериватизации карбониллов O-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гидроксиламином, по существу, как описано Groenqvist et al. (1993); см. также пример 5.

В прямом сравнении с пробами культивара Power и null-LOX-1 мутанта D112 наблюдали явное уменьшение свободного T2N в прокипяченном сусле, полученном как из сусла, сваренного из ячменя, так и обычного сусла двойного null-LOX-мутанта A689 (фиг. 11). При сравнении со сваренным из ячменя прокипяченным суслом, полученным из null-LOX-1-мутанта D112, сусло двойного null-LOX-мутанта ячменя A689 проявляло ~45% уменьшение уровня свободного T2N (для соответствующих осоложенных проб, это уменьшение составляло ~15%).

Подобным образом, ~72%-ное уменьшение было отмечено для свободного T2N в пиве двойного null-LOX-мутанта A689 в сравнении с этим показателем культивара Power (для соответствующих осоложенных проб это уменьшение составляло ~45%).

Анализ прокипяченного сусла - предшественник T2N.

Предшественники T2N в пробах прокипяченного, сваренного из ячменя и обычного сусла культивара Power, null-LOX-1 мутанта D112 и двойного null-LOX-мутанта A689, определяли при помощи GC-MS после дериватизации карбониллов O-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гидроксиламином, по существу, как описано Groenqvist et al. (supra).

Как показано на фиг. 12, предшественники T2N прокипяченного, сваренного из ячменя и обычного пива были заметно самыми низкими в пробах из двойного null-LOX-мутанта A689, достигая уменьшения ~70% в сравнении с этой величиной культивара дикого типа Power (уменьшения были также зарегистрированы с пробами из null-LOX-1-мутанта D112).

Анализ только сваренного из ячменя пива - свободный T2N, принудительное (искусственное) старение. Разлитые в бутылки сорта пива, полученные из ферментации проб полученного из ячменя сусла, и содержащие сходные уровни сульфита, анализировали в пределах одного месяца на продуцирование T2N на протяжении времени.

Эти вышеупомянутые сваренные из ячменя сорта пива искусственно старили при 37°C для прослеживания развития свободного T2N, как описано здесь выше.

Как показано на фиг. 13A, эти три типа сваренных из ячменя сортов пива легко различались в результате явных различий в кинетике развития T2N. В то время как референсное пиво культивара ячменя Power обнаруживало ожидаемые результаты (64 т.д. T2N после 8 недель при 37°C), с уровнями T2N на 10-20% более высокими, чем уровни сходного пива на основе солода (не показано), неожиданное и явно низкое развитие T2N наблюдали в партиях пива из ячменя, полученных из двойного null-LOX-мутанта A689 (16 т.д. T2N после 8 недель при 37°C), что соответствует 75%-ному уменьшению свободного T2N готового пива. Что касается сваренного из ячменя пива null-LOX-1-мутанта D112 в сравнении с тем же самым типом пива из зерен дикого типа, в нем было на 52% меньше свободного T2N на протяжении 8 недель.

Эксперимент с искусственным старением подчеркнул явные различия среди анализируемых типов пива. Уже спустя 1,5 недели уровень T2N референсного, сваренного из ячменя пива культивара Power превышал уровень вкусового порога ~50 т.д., в то время как уровень T2N двойного null-LOX-мутанта A689 был равен ~16 т.д. T2N, следовательно, был лучшим, чем 32 т.д. T2N для сваренного из ячменя пива null-LOX-1-мутанта D112.

Сравнения сваренного из ячменя и обычного пива предшественник T2N. На фиг. 13B обеспечено суммирование данных, описывающих уровни предшественника T2N в свежем пиве из сваренных из ячменя и осоложенных исходных материалов, оба из которых получали в объеме 200 л. Опять, исходные двойные null-LOX-материалы были лучшими в измеряемых свойствах, фактически с более низкими потенциалами T2N в сваренных из ячменя типах пива (1,2 б.д.), чем в типах пива, полученных с null-LOX-1-солодом (1,5 б.д.).

Сравнения сваренного из ячменя и обычного пива искусственное развитие T2N. Также и в этом случае, т.е. при искусственном старении пива при 37°C, было явное различие между пивом, приготовленным из исходного материала дикого типа и исходного мутантного материала (фиг. 13C). Хотя как сваренное из ячменя, так и обычное пиво из зерен дикого типа культивара Barke обнаруживали ~50 т.д. T2N после двух недель, соответствующие величины уменьшались на ~50 и ~75% для исходных материалов null-LOX-1-мутанта D112 и двойного null-LOX-мутанта A689, соответственно. Ту же самую тенденцию наблюдали после трех недель искусственного старения. Таким образом, было доказано, что приме-

нение в получении пива исходных материалов, недостаточных в отношении ферментов LOX, представляет превосходный путь для разительного уменьшения развития T2N во время старения. И, кроме того, в этом отношении, исходные материалы двойного null-LOX-мутанта A689 превосходят исходные материалы null-LOX-1-мутанта D112.

Сравнения сваренного из ячменя и обычного пива - ТНА. Специфические для пива ТНА, произведенные из линолевой кислоты, уже были описаны несколько десятилетий назад (Drost et al., 1974). С тех пор различные сообщения подтвердили, что общее содержание ТНА в пиве находится в диапазоне ~5-12 м.д. (Hamberg, 1991; и ссылки в этой работе). В то время как 9,12,13-ТНА обычно составляют 75-85% ТНА в пиве, величины 9,10,13-ТНА составляют до 15-25%; другие изомеры обнаруживаются в следовых количествах.

В свежих сваренных из ячменя партиях пива в эксперименте в масштабе 200 л с null-LOX-1-мутантом D112 и двойным null-LOX-мутантом A689 в качестве исходных материалов, было обнаружено что уровни полученных в LOX-1- и LOX-2-пути 9,12,13- и 9,10,13-ТНА уменьшаются на ~60 и ~80% соответственно в сравнении с контрольным культиваром Power (фиг. 14A). Неожиданно высокий уровень 9,10,13-ТНА, основного продукта ТНА из LOX-2-ответвления пути LOX измеряли в сваренном из ячменя пиве null-LOX-1-мутанта D112, а именно, +47% в сравнении с величиной пива из культивара Power. Этот результат противоречит результату, полученному с двойным null-LOX-мутантом A689, для которого измеряли 60%-е уменьшение, опять в сравнении с культиваром Power. Результаты отдельного эксперимента подтвердили вышеупомянутый вывод. Молекулярная основа для этого наблюдения остается неясной, но может обсуждаться то, что некоторые клеточные механизмы могут активироваться для компенсации отсутствия LOX-1 в мутанте D112 усилением синтеза ферментов, участвующих в образовании 9,10,13-ТНА.

По этой причине сваренное из ячменя пиво, полученное из двойного null-LOX-мутанта A689, генерировало значимо более низкое отношение 9,12,13-ТНА:9,10,13-ТНА в сравнении с культиваром Power.

Определение уровней 9,12,13-ТНА и 9,10,13-ТНА, объединенное с определением их отношения, представляет удобный исходный инструмент для указания, получено ли пиво с использованием двойного null-LOX-мутанта A689. Однако более надежное оценивание по этому вопросу может включать дополнительные испытания, такие как испытания, описанные в данной заявке.

Было обнаружено, что в пиве, полученном из солода двойного null-LOX-мутанта A689, концентрация полученных из пути LOX 9,12,13- и 9,10,13-ТНА является уменьшенной на ~75 и ~40% соответственно в сравнении с контрольным пивом осоложенного культивара Power (фиг. 14B). В указанном пиве может быть также рассчитано очень низкое отношение 9,12,13-ТНА: 9,10,13-ТНА в сравнении с пивом культивара Power. Обычно, но не во всех случаях, уровни ТНА являются слегка более низкими в пиве на основе солода, чем в пиве, сваренном из ячменя (ср. фиг. 14A и B).

Анализ только сваренного из ячменя пива - стабильность вкуса и запаха. Дегустационная комиссия специалистов по оценке вкуса пива оценивала вышеупомянутые, подвергнутые искусственному старению, сваренные из ячменя партии пива культивара Power, null-LOX-1 мутанта D112 и двойного null-LOX-мутанта A689.

В целом, эта дегустационная комиссия обнаружила удовлетворительные профили вкуса для всех типов свежих и подвергнутых искусственному старению партий пива после 1 недели при 37°C. Однако балльные оценки "бумажного" привкуса были значимо более высокими для референсного пива, чем для пива, полученного с использованием солода двойного null-LOX-мутанта A689 и null-LOX-1-мутанта D112 (FIG. 15A), т.е. референсное пиво характеризовалось более интенсивным указанным привкусом. В целом эта дегустационная комиссия предпочла сваренное из ячменя пиво, полученное из двойного null-LOX-мутанта A689.

Эта обученная дегустационная комиссия оценивала также более общий привкус "старости" после хранения пива в течение 1 месяца и 3 месяцев при 30°C, опять демонстрируя, что указанные балльные оценки привкуса были значимо более высокими для пива культивара Power и null-LOX-1, чем балльные оценки двойного null-LOX-мутанта A689 (фиг. 15B).

В целом эта улучшенная стабильность вкуса сваренного из ячменя и обычного пива двойного null-LOX-мутанта A689 является замечательной, просто вследствие низких уровней T2N после хранения, особенно при высоких температурах. Таким образом, действия LOX-1 и LOX-2 в условиях пивоварения представляют ключевые детерминанты для появления T2N, главного создающего привкус соединения в стареющем пиве.

Сравнения сваренного из ячменя и обычного пива - пивная пена. Сваренное из ячменя пиво и контрольное пиво дегазировали в течение 20 мин в ультразвуковой бане перед добавлением 50 мл H<sub>2</sub>O к 150 мл пива. Эту смесь медленно выливали в колонну для пены, состоящую из стеклянной трубки с длиной 16 см, шириной 7 см (со стеклянным фильтром и соединителем в нижней и верхней части, соответственно). Газ N<sub>2</sub>, при скорости потока 400 мл/мин, барботировали через эту смесь от нижней части для образования пивной пены. Она проходила через трубку и собиралась в градуированном седиментационном конусе, располагаясь по массе.

Общую массу пены регистрировали с интервалами времени 5 мин, пока развитие пены не прекращалось, как для сваренного из ячменя пива (фиг. 16А), так и для сваренного из солода пива (фиг. 16В). В любом случае, пиво исходных материалов из двойного null-LOX-мутанта A689 генерировало наибольшее количество пены. Фактически развитие пены было лучшим в сваренном из ячменя пиве, чем в сравнимом пиве на основе солода.

Таблица 6

## Анализы ячменя, солода, сусла и пива

| Проба                                           |         | Культивар<br>Power | Мутант<br>D112 | Мутант<br>A689 |
|-------------------------------------------------|---------|--------------------|----------------|----------------|
| <b>Анализы ячменя</b>                           |         |                    |                |                |
| Белок                                           | %*      | 11,7               | 11,2           | 10,1           |
| Крахмал                                         | %*      | 63,3               | 62,9           | 62,7           |
| Прорастание при 72 ч                            | %       | 98                 | 99             | 99             |
| Показатель всхожести                            | 1-10    | 8,4                | 7,8            | 7,8            |
| Водочувствительность                            | %       | 9                  | 17             | 24             |
| Гранулометрия >2,5 мм                           | %       | 96,2               | 98,9           | 98,0           |
| TKW                                             | г       | 48,2               | 54,2           | 47,7           |
| $\beta$ -амилаза (ячмень)*                      | Ед/г    | 1039               | 979            | 1491           |
| Транс-2-ноненаль †                              | б.д.    | 270                | 190            | 150            |
| <b>Анализы солода, сусла и пива</b>             |         |                    |                |                |
| Замачивание и проращивание                      | ч       | 120                | 120            | 120            |
| Экстракт                                        | %*      | 81,5               | 81,2           | 81,4           |
| Растворимый N                                   | %, NIT* | 0,67               | 0,63           | 0,64           |
| Модификация                                     | %       | 96                 | 97             | 97             |
| Гомогенность                                    | %       | 88                 | 86             | 81             |
| $\beta$ -амилаза**                              | Ед/г    | 768                | 865            | 1007           |
| $\alpha$ -амилаза***                            | Ед/г    | 175                | 172            | 200            |
| Транс-2-ноненаль †                              | б.д.    | 1100               | 470            | 390            |
| Спирт                                           | %       | 3,94               | 3,87           | 3,80           |
| Действительное содержание экстрактивных веществ | % Плато | 3,76               | 3,80           | 3,30           |
| pH                                              |         | 4,3                | 4,2            | 4,2            |
| Цвет                                            | ЕВС-Ед  | 7,1                | 8,2            | 5,2            |
| Исходный экстракт                               | % Плато | 11,42              | 11,33          | 10,72          |
| Действительная степень ферментации              | %       | 68,4               | 67,8           | 70,4           |
| Спирт                                           | % (об.) | 4                  | 3              | 4              |
| CO <sub>2</sub>                                 | г/л     | 5,6                | 6,1            | 5,9            |
| SO <sub>2</sub>                                 | м.д.    | 4                  | 4              | 5              |
| Диацетил                                        | м.д.    | 23                 | 21             | 10             |

\*Измерено стандартной спектроскопией пропускания в ближней ИК-области спектра.

\*\*Активность  $\beta$ -амилазы измеряли с использованием набора Megazyme (код продукта K-BETA).

\*\*\*Активность  $\alpha$ -амилазы измеряли с использованием набора Megazyme (код продукта K-CERA).

† Измерено в основном, как описано Groenqvist et al. (1993).

Пример 10.

Ген для LOX-2 в мутанте ячменя A689 является мутированным.

Геномную нуклеотидную последовательность, кодирующую LOX-2 культивара Barke (SEQ ID NO: 1), и геномную нуклеотидную последовательность двойного null-LOX-мутанта A689 (SEQ ID NO: 2) получали, как описано здесь далее. Затем полученные последовательности сравнивали для определения молекулярной основы для генотипа null-LOX-2 мутанта A689, фенотип которого характеризуется отсутствием активности LOX-2 в прорастающем зерне ячменя.

Для указанных сравнительных целей, геномные ДНК ячменя из мутанта A689 и культивара дикого типа Barke выделяли из листочков проростков с использованием набора для выделения ДНК (Roche). Две последовательности из 3331 пар оснований, охватывающие кодирующие белок области для LOX-2 в геномных ДНК мутанта A689 и культивара Barke, амплифицировали при помощи ПЦП с использованием праймеров 5'-CGCAGCGAGCTAAGCTTAGAAGCGTGCCACA-3' (SEQ ID NO: 3) и 5'-CCTCATGCSCTTTGTGCTATCCTTGCTTGCT-3' (SEQ ID NO: 4); основы для последовательностей праймеров, содержащихся в геномной последовательности гена для LOX-2 (т.е. SEQ ID NO: 1).

Эти реакции ПЦП состояли из 100 нг геномной ДНК, ресуспендированной в 20 мкл реакционного буфера, содержащего 5 пмоль каждого праймера и 3,0 Е FailSafe полимеразы (Epicentre). ПЦП-амплификации проводили в циклере MJ с использованием следующих параметров: 30 с при 98°C для 1 цикла; 15 с при 98°C; 30 с при 65°C; и 60 с при 72°C в течение 30 циклов; 10 мин при 72°C в течение 1 цикла. Полученные продукты ПЦП разделяли на 1% агарозных гелях и ДНК-фрагменты, соответствующие по длине этим ампликонам, очищали с использованием набора для экстракции из гелей Qiaex II (Qiagen) и инсертировали в плазмидный вектор pCR Blunt II TOPO Blunt (Invitrogen). Эти кодирующие области применяли к реакциям дидезоксинуклеотидной термации цепи со специфическими олигонуклеотидными праймерами, с последующим определением последовательности на ДНК-секвенаторе MegaBACE 1000 (GE Biosystems). На фиг. 17 показана схематическая иллюстрация геномной последовательности, охватывающей стартовый кодон и стоп-кодон области, кодирующей LOX-2. Сравнение последовательностей выполняли с использованием пакета программного обеспечения анализа последовательностей LaserGene версии 5.2 (DNASTAR), с выявлением одной точечной мутации мутации в форме замены G→A в положении 2689 SEQ ID NO: 2 в экзоне 6 (фиг. 17).

Последовательность дикого типа для LOX-2 кодирует имеющий длину 864 остатка белок (SEQ ID NO: 5), с предсказанной массой 96,7 кДа. В то время как эта мутация в положении 684 в LOX-1-кодирующей последовательности мутанта D112 вызывала введение преждевременного стоп-кодона, эта мутация LOX-2-кодирующего гена мутанта A689 приводила к С-концевому укорочению из 180 аминокислот, кодируя вследствие этого белок 76,8 кДа (SEQ ID NO: 6).

Табл. 7 обеспечивает суммирование молекулярных различий, связанных с геном LOX-2 ячменя дикого типа, null-LOX-1-мутанта ячменя D112 и мутанта ячменя A689 (двойного null-LOX-мутанта).

Таблица 7

Молекулярные данные по ячменю дикого типа и мутантному ячменю

| Свойство                   | Ячмень<br>дикого типа | Мутант<br>D112*      | Мутант<br>A689       |
|----------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Генотип LOX</b>         | wt LOX-1              | null-LOX-1           | null-LOX-1           |
|                            | wt LOX-2              | wt LOX-2             | null-LOX-2           |
| <b>Мутация основания**</b> |                       |                      |                      |
| LOX-1                      | -                     | G3474→A              | G3474→A              |
| LOX-2                      | -                     | -                    | G2689→A              |
| <b>Данные по белку***</b>  |                       |                      |                      |
| LOX-1                      | 862 aa<br>(96,4 кДа)  | 665 aa<br>(74,2 кДа) | 665 aa<br>(74,2 кДа) |
| LOX-2                      | 864 aa<br>(96,7 кДа)  | 864 aa<br>(96,7 кДа) | 684 aa<br>(76,8 кДа) |

\*Мутантная материнская линия A689, Ca211901, обнаруживает идентичные свойства.

\*\*Нумерация последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 1 WO 2005/087934 для гена LOX-1, и в соответствии с SEQ ID NO: 1 для гена LOX-2 данной публикации.

\*\*\*Предсказанные длины белков в аминокислотах (aa), с соответствующими, предсказанными массами в скобках.

## Пример 11.

Генетическое детектирование двойного null-LOX-мутанта A689 ячменя.

Анализ полиморфизма единственных нуклеотидов (SNP) представляет удобный способ идентификации мутантов растений. Под SNP здесь имеется в виду точечная мутация с длиной по меньшей мере двух нуклеотидов в одном локусе. Указанный анализ основан на комбинированном применении двух установок ПЦР-реакций с использованием геномной ДНК в качестве матрицы. Обе реакции содержат локус-специфический праймер и один из двух SNP-праймеров (по одному для каждого аллеля этой последовательности). Две установки ПЦР-реакций выполняют на одну линию растения, вследствие чего результатом ПЦР-реакции является то, что этот SNP-праймер связывается либо с последовательностями мутанта, либо с аллелем дикого типа (фиг. 18А). В одном из нескольких способов SNP-анализ может быть основан на идентификации мутантных линий оцениванием картин бэндинга после геле-электрофореза продуктов ПЦР.

Геномные ДНК ячменя из генеалогической линии ячменя и из культивара Quench дикого типа выделяли из ткани листьев проростков с использованием набора для выделения ДНК растений (Roche) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Олигонуклеотидными праймерами, используемыми для амплификации SNP гена LOX-2 дикого типа были 5'-ACCTCAAGGACGCGGCGTGG-3' (SEQ ID NO: 7) и 5'-GAGCGAGGAGTACGCGGAG-3' (SEQ ID NO: 8), тогда как праймерами для соответствующего мутантного гена были 5'-ACCTCAAGGACGCGGCGTGA-3' (SEQ ID NO: 9) и 5'-GAGCGAGGAGTACGCGGAG-3' (SEQ ID NO: 8). Эти комбинации праймеров использовали в ПЦР-реакциях для амплификации ДНК-фрагментов 200 п.н., содержащих части кодирующих областей для LOX-2 двойного null-LOX-мутанта A689 и культивара Quench, соответственно (фиг. 18А). Реакционные смеси ПЦР состояли из 100 нг геномной ДНК в 20 мкл реакционного буфера, содержащего 25 пмоль праймера и 7 мкл смеси REDTaq (Sigma), используемых в соответствии с инструкциями изготовителя. ПЦР-амплификации из 29 циклов проводили в циклере MJ: 2 мин при 96°C в течение 1 цикла; 1 мин при 95°C; 1 мин при 68°C; 1 мин при 72°C; заканчивая 10-минутным удлинением при 72°C.

Перекрестное опыление между гомозиготным растением ячменя, несущим мутацию LOX-1, и гомозиготным растением, несущим мутацию LOX-2, может приводить к 4 различным событиям. С использованием двух наборов праймеров, одного SNP-набора праймеров FL820 (SEQ ID NO: 10 и FL823 (SEQ ID NO: 11) для идентификации мутации LOX-1 (G→A мутации в положении 3474 гена LOX-1) и одного SNP-набора праймеров FL1034 (SEQ ID NO: 9) и FL1039 (SEQ ID NO: 8), для идентификации мутации гена LOX-2 [замены G→A в положении 2689 гена LOX-2 (SEQ ID NO: 1)], можно идентифицировать одно из четырех вышеупомянутых событий (описанных в общих чертах на фиг. 18В). Другими словами, может быть использована единственная комбинированная ПЦР-реакция, специфическая для обеих вышеупомянутых мутаций LOX-1 и LOX-2. Олигонуклеотидными праймерами, используемыми для амплификации ПЦР-продукта SNP для мутации G→A в положении 3474 в гене LOX-1, были 5'-CAAGGTGCGGTTGCTGGTGTTC-3' (SEQ ID NO: 10) и 5'-CTCGCGCGTCTCCTTCCAT-3' (SEQ ID NO: 11), генерирующие ДНК-фрагмент 166 п.н., содержащий часть кодирующей области для LOX-1. Олигонуклеотидными праймерами, используемыми для амплификации ПЦР-продукта SNP для мутации G→A в положении 2689 в гене для LOX-2 были 5'-ACCTCAAGGACGCGGCGTGA-3' (SEQ ID NO: 9) и 5'-GAGCGAGGAGTACGCGGAG-3' (SEQ ID NO: 8), генерирующие ДНК-фрагмент 200 п.н., содержащий часть кодирующей области для LOX-2. Фиг. 18С, дорожка 2, показывает подробно, что двойной null-LOX-мутант A689 нес обе из вышеуказанных мутаций, тогда как контроль дикого типа не нес никаких мутаций (фиг. 18С, дорожка 3).

В другом эксперименте, с использованием набора REDExtract-N-Amp Plant PCR (Sigma) в соответствии с инструкциями изготовителя, геномную ДНК ячменя выделяли из тканей листьев 23 проростков генеалогической линии и затем использовали в ПЦР-реакциях, которые состояли из 100 нг геномной ДНК в 20 мкл реакционного буфера, содержащего 25 пмоль праймер. Амплификации проводили в DNA Engine cycler (MJ Research), в соответствии с инструкциями изготовителя: 2 мин при 96°C в течение 1 цикла; 1 мин при 95°C, 1 мин при 68°C, 1 мин при 72°C в течение 29 циклов; и, наконец, 10 мин при 72°C в течение 1 цикла. Фиг. 19 показывает картину бэндинга после электрофореза продуктов ПЦР. Анализ выявил, что эта процедура применима для отбора на желаемую комбинацию null-LOX-1- и null-LOX-2-мутаций.

### Список последовательностей

- SEQ ID NO: 1. Последовательность геномной ДНК дикого типа, кодирующая LOX-2 из культивара Barke.
- SEQ ID NO: 2. Последовательность геномной ДНК мутантного LOX-2 из мутанта ячменя A689.
- SEQ ID NO: 3. Праймер для амплификации кодирующей белок области для LOX-2 (также называемый FL960).
- SEQ ID NO: 4. Праймер для амплификации кодирующей белок области геномной ДНК LOX-2 (также называемый FL961).
- SEQ ID NO: 5. Последовательность полноразмерного белка LOX-2 ячменя дикого типа, культивара Barke.
- SEQ ID NO: 6. Последовательность мутантного белка LOX-2, лишённого активности LOX-2, из мутанта ячменя A689.
- SEQ ID NO: 7. Праймер для амплификации ДНК LOX-2 дикого типа (также называемый FL1035).
- SEQ ID NO: 8. Праймер для амплификации ДНК LOX-2 (также называемый FL1039).
- SEQ ID NO: 9. Праймер для амплификации ДНК мутантного LOX-2 мутанта A689 (также называемый FL1034).
- SEQ ID NO: 10. Праймер для амплификации ДНК мутантного LOX-1 мутанта D112 (также называемый FL820).
- SEQ ID NO: 11. Праймер для амплификации ДНК LOX-1 (также называемый FL823).

### Цитированные ссылки

Патентные документы.

Патент США № 4683195 Mullis, K.B. et al.

Патент США № 4800159, Mullis, K.B. et al.

PCT заявка на патент WO 02/053721 Douma, A.C. et al.

PCT заявка на патент WO 2005/087934 Breddam, K. et al.

Европейский патент № EP 1609866 Hirota, N. et al.

### Другие публикации

American Association of Cereal Chemists, "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists". ISBN 0-913250-86-4 (1995).

American Society of Brewing Chemists, "Methods of analysis of the American Society of Brewing Chemists". ISBN 1-881696-01-4 (1992).

Baur, C. and Grosch, W., "Investigation about the taste of di-, tri- and tetrahydroxy fatty acids". Z. Lebensm. Unters. Forsch. 165: 82-84 (1977).

Baur, C. et al., "Enzymatic oxidation of linoleic acid: Formation of bitter tasting fatty acids". Z. Lebensm. Unters. Forsch. 164:171-176 (1977).

Briggs, D.E. et al., "Malting and brewing science. Volume I Malt and sweet wort". Chapman and Hall. New York. USA. ISBN 0412165805 (1981).

Drost, B.W. et al., "Role of individual compounds in beer staling". Tech. Q. MBAA 11:127-134 (1974).

Durai, S. et al., "Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells". Nucleic Acids Res. 33:5978-5990 (2005).

European Brewery Convention. "Analytica - EBC". ISBN 3-418-00759-7 (1998).

Groenqvist, A. et al., "Carbonyl compounds during beer production in beer". Proceedings of the 24th EBC Congress, Oslo, pp. 421-428 (1993).

Hamberg, M., "Trihydroxyoctadecenoic acids in beer: Qualitative and quantitative analysis". J. Agric. Food Chem. 39:1568-1572 (1991).

Hansen, M. et al., "Antisense-mediated suppression of C-hordein biosynthesis in the barley grain results in correlated changes in the transcriptome, protein profile, and amino acid composition". *J. Exp. Bot.* 58:3987-3995 (2007).

Hough, J.S. et al., "Malting and brewing science. Volume II Hopped wort and beer". Chapman and Hall, New York, USA. ISBN 0412165902 (1982).

Iida, S. and Terada, R., "Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants". *Plant Mol. Biol.* 59:205-219 (2005).

Institute of Brewing, "Institute of Brewing. Methods of analysis". ISBN 0-900489-10-3 (1997).

Jamieson, A.M. and van Gheluwe, J.E.A., "Identification of a compound responsible for cardboard flavor in beer". *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* 29:192-197 (1970).

Kleinhofs, A. et al., "Induction and selection of specific gene mutations in *Hordeum* and *Pisum*". *Mut. Res.* 51:29-35 (1978).

Kumar, S. et al., "Gene targeting in plants: fingers on the move". *Trends Plant Sci.* 11:159-161 (2006).

Kuroda, H. et al., "Characterization of factors involved in the production of 2(E)-nonenal during mashing". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:691-697 (2003).

Kuroda, H. et al., "Characterization of 9-fatty acid hydroperoxide lyase-like activity in germinating barley seeds that transforms 9(S)-hydroperoxy-10(E).12(Z)-octadecadienoic acid into 2(E)-nonenal". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:1661-1668 (2005).

Lermusieau, G. et al., "Nonoxidative mechanism for development of trans-2-nonenal in beer". *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57:29-33 (1999).

Liégeois, C. et al., "Release of deuterated (E)-2-nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized before boiling". *J. Agric. Food Chem.* 50:7634-7638 (2002).

Maquat, L.E. and Carmichael, G.G., "Quality control of mRNA function". *Cell* 104:173-176 (2001).

Meilgaard, M.C., "Flavor chemistry of beer: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles". Tech. Q. MBAA 12:151-167 (1975).

Mendell, J.T. and Dietz, H.C., "When the message goes awry: Disease-producing mutations that influence mRNA content and performance". Cell 107:411-414 (2002).

Nevo, E., "Resources for Breeding of Wild Barley". In: "Barley: Genetics. Biochemistry. Molecular Biology and Biotechnology". Shewry. P.R., ed., pp.3-18. C.A.B. International. ISBN 0-85198-725-7 (1992).

Noordermeer, M.A. et al., "Fatty acid hydroperoxide lyase: A plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance". ChemBioChem 2:494-504 (2001).

Nyborg, M. et al., "Investigations of the protective mechanism of sulfite against beer staling and formation of adducts with trans-2-nonenal". J. Am. Soc. Brew. Chem. 57:24-28 (1999).

Rasmussen, S.K. and Hatzack, F., "Identification of two low-phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) grain mutants by TLC and genetic analysis". Hereditas 129:107-112 (1998).

Robbins, M.P. et al., "Gene manipulation of condensed tannins in higher plants". Plant Physiol. 116:1133-1144 (1998).

Sambrook, J. and Russell. D.W., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3rd Ed.", Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. ISBN 0-87969-577-3 (2001).

Schmitt, N.F. and van Mechelen. J.R., "Expression of lipoxygenase isoenzymes in developing barley grains". Plant Sci. 128:141-150 (1997).

Stahl, Y. et al., "Antisense downregulation of the barley limit dextrinase inhibitor modulates starch granule sizes distribution, starch composition and amylopectin structure". Plant J. 39:599-611 (2004).

Tzfira, T. and White. C, "Towards targeted mutagenesis and gene replacement in plants". Trends Biotechnol. 23:567-569 (2005).

von Bothmer, R. et al., "Diversity in barley (*Hordeum vulgare*)". In: "Diversity in Barley (*Hordeum vulgare*)". von Bothmer, R., van Hintum, T., Knüpfper, H., Sato. K., eds., pp.129-136. ISBN 0-444-50587-7 (2003). Также доступна в <http://www.genres.de/>.

Wackerbauer, K. and Meyna, S., "Freie und triglyceride-gebundene Hydroxyfettsäuren in Gerste und Malz", Monatsschrift für Brauwissenschaft, heft 3/4: 52-57 (2002).

Wu, J. et al., "Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) silences the accumulation of aberrant trypsin proteinase inhibitor mRNA in *Nicotiana attenuata*". Plant J. 51:693-706 (2007).

## Список последовательностей

|       |                                                                    |      |
|-------|--------------------------------------------------------------------|------|
| <110> | Carlsberg Breweries A/S<br>Heineken Supply Chain B.V.              |      |
| <120> | ЯЧМЕНЬ С УМЕНЬШЕННОЙ ЛИПОКСИГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ                   |      |
| <130> | P1599PC00                                                          |      |
| <160> | 14                                                                 |      |
| <170> | PatentIn version 3.5                                               |      |
| <210> | 1                                                                  |      |
| <211> | 3229                                                               |      |
| <212> | ДНК                                                                |      |
| <213> | Hordeum vulgare cv: Barke                                          |      |
| <400> | 1                                                                  |      |
|       | atgttttggcg tcggcgccat cgtgagcgac ctgacggggg gcctccgggg cggccacctc | 60   |
|       | aagggtccg tcgtcctcat gcgcaagaac gcgctcgact tcaacgactt cggcgccacc   | 120  |
|       | gtcatggacg gcgtcaccga gctcctcggc cgcggcgta cctgccagct catcagctcc   | 180  |
|       | accaacgtcg accacagtga gcaactcact gccactcccc gttttgtaat cctgccact   | 240  |
|       | gtgatacatg gaaaacggaa gcagatccgc atcctcacgc ccgaaccaag caaataatat  | 300  |
|       | atataaagaa ctaaaatgca cgtatggtta cggatgcatg cttatgcttg agcttgagct  | 360  |
|       | tgagcttgag agacagggac gtgcaaaaaa taacttaata atggagtaac taatgtgaga  | 420  |
|       | catgacgcac ggaggggttt accttactac taattaattg tcgagcagac aacggtgggc  | 480  |
|       | gcgggaaggt gggcgcgag gcgaacctgg agcagtggt cctgccgacg aacctgccgt    | 540  |
|       | tcacaccac cggcgagaac aagttcgccg tcaccttcga ctggtcggtg gacaagctgg   | 600  |
|       | gggtgcggg ggccatcatc gtcaagaaca accacgcctc cgagttcttc ctcaagacca   | 660  |
|       | tcacctcga caacgtgccc ggccgcggca ccatcgtctt cgtcgccaac tcattgggtct  | 720  |
|       | acccgcaggc caagtaccgc tacaaccgcg tcttcttcgc caacgacgtg agtattttat  | 780  |
|       | acgagtacca ctccatggta gctagtagca tggatttcgc ttgctcgatg cctgactggt  | 840  |
|       | cgggtccggt gggacatacg tgccgcagac gtacctgccc caccagatgc cggcggcgct  | 900  |
|       | gaagccgtac cgcgacgac agctccggaa cctgaggggc gacgaccagc aggggccccta  | 960  |
|       | cctggaccac gaccgctct accgctacga cgtctacaac gacctcggcg actccgcga    | 1020 |
|       | cgtcctcggc gggtccaagg acctccccta cccgcgccgc tgccgcaccg gccggaagcc  | 1080 |
|       | ctcggacagc agtgctgtgc tcctcccttc tccttccttt cgatctcccc ataacgtgta  | 1140 |
|       | cttggtctga caagcatgtg tggccgacgc agagcccgc cagagagacc ggctgctgcc   | 1200 |
|       | gctggtgcag aacgtctacg tgccgcgca cgagctcttc ggccacctca agcagtcgga   | 1260 |
|       | cttcctgggc tacacgtca aggcgtggt ggacgggatc ataccggcca tccgcacct     | 1320 |
|       | cgtcgacctc tccccggcg agttcgactc cttcgccgac atcctcaagc tctacgagg    | 1380 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cgccatcaag ctgccaaca tcccggccct cgaggagggtg cgcaagcgt tcccgctcca   | 1440 |
| gctcgtcaag gacctcatcc ccaaggcggt cgacttcctc ctcaagctcc ccaagccgga  | 1500 |
| gatcatcaag gtagaccaga aagcgtggat gactgacgag gagttcgcca gggagatgct  | 1560 |
| cgccggcgtc aaccccatga tgatcaaacg cctcaccgtg agtgaccac tccatctacc   | 1620 |
| ggccattgaa caaaatcgtc catacatgtc actaatcaat actcacaccg ttttgaccgc  | 1680 |
| gtgtgcagga gttccctccc aagagcactc tggatccgag caagtacggc gaccacacca  | 1740 |
| gcaccatgac cgaggagcac gtggccaaga gcctggaggg cctcaccgtg cagcaggcgc  | 1800 |
| tcgccggcaa caggctctac atcgtagacc agcacgacaa cctgatgccg ttcctgatcg  | 1860 |
| acatcaacaa cctcgacgcc agcttcgtgt acgccacaag gacgctgctc ttcctgagag  | 1920 |
| gggacggcac gctggcgccg gtcgccatcg agctgagctc gccgctgac cagggcgagc   | 1980 |
| tgaccaccgc caagagcgcc gtgtacacgc cgcagcacgc cggcgtggag ggctggatat  | 2040 |
| ggcagctcgc caaggcctac gcctccgtga acgactacgg gtggcaccag ctcatcagcc  | 2100 |
| actggtcaa cagcagcgc gtcattggagc ctttcgtcat cgccaccaac aggcagctca   | 2160 |
| gcgtcaccca cccggtctac aagctcctgc acccgacta ccgcgacacc atgaacatca   | 2220 |
| acgcgcgggc gcgcgggctg ctcatcaacg ccggcggcgt catcgagatg accgtgttcc  | 2280 |
| cgcaacgca cgccatgccc atgtcctcca tggctacaa gcaactggaac ttcaaccgaac  | 2340 |
| aagctctccc cgccgatcta atcaagaggt gcaacatggt tacattatat aattgacgaa  | 2400 |
| acggtccttg atttgatcaa aatgattaat cgatcttgat ggttgatgat gatgtagggg  | 2460 |
| catggcggtg gaggacgcat cgagcccgca caaggtgcgg ctgctgatca aggactaccc  | 2520 |
| gtacgcgacc gacgggctgg ccgtgtggga cgccatcgag cagtgggtgt cggactacct  | 2580 |
| gaccatctac taccccaacg acggcgtgct gcaggcgac gtggagctgc aggcgtggtg   | 2640 |
| gaaggaggtg agggaggtcg ggcacggcga cctcaaggac gcggcgtggt ggccaaagat  | 2700 |
| gcagacggtg gcggagctga tcaaggcgtg gcgccaccatc atctggaccg ggtcggcgct | 2760 |
| ccacgcggcc gtcaacttcg ggcagtaccc ctactcgggc taccaccca acaagccgtc   | 2820 |
| ggcgagccgg aggcgatgc cgggtgcaggg gagcgaggag tacgcggagc tggagcgaga  | 2880 |
| cccgagagaag gccttcatcc gcaccatcac cagccagttc catgccctgg tggcatctc  | 2940 |
| gctcatggag atcctctcca agcactcctc cgacgaggtc tacctgggcc agcacgacac  | 3000 |
| gccggcgtgg acgtcggacg ccaaggcgtt ggaggcgttc aagcggttcg gggcgaagct  | 3060 |
| ggagggcacg gagaagcagg tggtagccat gaactcggac ccgcagctaa agaaccgcac  | 3120 |
| cgggccggcc aagttcccat acatgctgct ctacccaaac acctccgacc acacgggaca  | 3180 |
| ggccgagggg ctaccgcga gggcatccc gaacagcata tccatctga                | 3229 |

<210> 2  
 <211> 3229  
 <212> ДНК  
 <213> Мутант A689 Hordeum vulgare

<400> 2  
 atgtttggcg tcggcggcat cgtgagcgac ctgacggggg gcctccgggg cggccacctc 60  
 aagggctccg tcgtcctcat gcgcaagaac gcgctcgact tcaacgactt cggcgccacc 120  
 gtcattggacg gcgtcaccga gctcctcggc cggggcgtea cctgccagct catcagctcc 180  
 accaacgtcg accacagtga gcaactcact gccactcccc gttttgtaat ccctgccact 240  
 gtgatacatg gaaaacggaa gcagatccgc atcctcacgc ccgaaccaag caaataatat 300  
 atataaagaa ctaaaatgca cgtatggtta cggatgcatg cttatgcttg agcttgagct 360  
 tgagcttgag agacagggac gtgcaaaaaa taacttaata atggagtaac taatgtgaga 420  
 catgacgcac ggagggggtt accttactac taattaattg tcgagcagac aacggtgggc 480  
 gcgggaaggt gggcgcgag gcgaacctgg agcagtggtt cctgccgacg aacctgccgt 540  
 tcatcaccac cggcgagaac aagttcgccg tcaccttcca ctggtcggtg gacaagctgg 600  
 gggtgccggg ggccatcatc gtcaagaaca accacgcctc cgagttcttc ctcaagacca 660  
 tcaccttcca caacgtgccg ggccgcggca ccatcgtctt cgtcgccaac tcatgggtct 720  
 acccgcaggc caagtaccgc tacaaccgcg tcttcttcgc caacgacgtg agtattttat 780  
 acgagtacca ctccatggtg gctagtacga tggatttcgc ttgctcgatg cctgactggt 840  
 cggttccgtt gggacatacg tgccgcagac gtacctgccg caccagatgc cggcggcgct 900  
 gaagccgtac cgcgacgacg agctccggaa cctgaggggc gacgaccagc agggggccta 960  
 cctggaccac gaccgcgtct accgctaaga cgtctacaac gacctcggcg actcccgca 1020  
 cgtcctcggc ggctccaagg acctccccta cccgcgcgcg tgccgcaccg gccggaagcc 1080  
 ctccgacagc agtgcgtgtc tcctcccttc tccttccttt cgatctcccc ataacgtgta 1140  
 cttggtctga caagcatgtg tggccgacgc agagcccagc caccgagacc ggctgctgcc 1200  
 gctggtgcag aacgtctacg tgccgcgcga cgagctcttc ggccacctca agcagtcgga 1260  
 cttcctgggc tacacgctca aggcgctggt ggacgggatc ataccggcca tccgcacctc 1320  
 cgtcgacctc tccccggcg agttcgactc cttcgccgac atcctcaagc tctacgaggg 1380  
 cggcatcaag ctgcccaca tcccggccct cgaggagggt cgcaagcgtt tcccgctcca 1440  
 gctcgtcaag gacctcatcc ccaaggcgcg cgacttcctc ctcaagctcc ccaagccgga 1500  
 gatcatcaag gtagaccaga aagcgtggat gactgacgag gagttcgcca gggagatgct 1560  
 cgcggcgctc aaccccatga tgatcaaacg cctcacctg agtgaccac tccatctacc 1620  
 ggccattgaa caaaatcgtc catacatgtc actaatcaat actcacaccg ttttgaccgc 1680  
 gtgtgcagga gttccctccc aagagcactc tggatccgag caagtacggc gaccacacca 1740

gcacccatgac cgaggagcac gtggccaaga gcctggaggg cctcaccgtg cagcaggcgc 1800  
tcgccggcaa caggctctac atcgtagacc agcacgacaa cctgatgccg ttcctgatcg 1860  
acatcaacaa cctcgacgcc agcttcgtgt acgccacaag gacgctgctc ttcctgcgag 1920  
gggacggcac gctggcgccg gtcgccatcg agctgagctc gccgctgac cagggcgagc 1980  
tgaccaccgc caagagcgcc gtgtacacgc cgcagcacgc cggcgtggag ggctggatat 2040  
ggcagctcgc caaggcctac gcctccgtga acgactacgg gtggcaccag ctcacagcc 2100  
actggtcaa cagcgacgcc gtcattggagc ccttcgtcat cgcaccaac aggcagctca 2160  
gcgtcaccca cccggtctac aagctcctgc acccgacta ccgcgacacc atgaacatca 2220  
acgcgcgggc gcgcgggctg ctcacaaacg ccggcgccgt catcgagatg accgtgttcc 2280  
cgcacaagca cgccatgccc atgtcctoca tggctctaaa gactggaac ttcaccgaac 2340  
aagctctccc cgcgatcta atcaagagg gcaacatgtt tacattatat aattgacgaa 2400  
acggtccttg atttgatcaa aatgattaat cgatcttgat ggttgatgat gatgtagggg 2460  
catggcggtg gaggacgcat cgagcccgca caaggcgcg ctgctgatca aggactaccc 2520  
gtacgcgacc gacgggctgg ccgtgtggga cgccatcgag cagtgggtgt cggactacct 2580  
gaccatctac taccacaacg acggcgctgt gcagggcgac gtggagctgc aggcgtggtg 2640  
gaaggaggtg agggaggtcg ggcacggcga cctcaaggac gcggcgatg ggccaaagat 2700  
gcagacggtg gcggagctga tcaaggcggt cgccaccatc atctggaccg ggtcggcgct 2760  
ccacgcggcc gtcaacttcg ggcagtagcc ctactcgggc taccaccca acaagccgtc 2820  
ggcgagccgg aggcgatgc cgggtgcagg gagcgaggag tacgcggagc tggagcgaga 2880  
cccgagagaag gccttcaccc gcacccatcac cagccagttc catgccctgg tggcatctc 2940  
gtcatggag atcctctcca agcactcctc cgacgaggtc tacctgggccc agcacgacac 3000  
gccggcggtg acgtcggacg ccaaggcgct ggaggcggtc aagcggttcg gggcgaagct 3060  
ggagggcatc gagaagcagg tggtagccat gaactcggac ccgcagctaa agaaccgcac 3120  
cgggcccggc aagttcccat acatgctgct ctacccaac acctccgacc acacgggaca 3180  
ggccgagggg ctcaccgcca ggggcatccc gaacagcata tccatctga 3229

<210> 3

<211> 30

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер для амплификации гДНК LOX-2 Hordeum vulgare

<400> 3

cgcagcgagc taacttagaa gcgtgccaca

30

<210> 4  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Праймер для амплификации гДНК LOX-2 Hordeum vulgare  
 <400> 4  
 cctcatgcct ttgtgctatc cttgcttgct

30

<210> 5  
 <211> 864  
 <212> БЕЛЮК  
 <213> Hordeum vulgare cv: Barke  
 <400> 5

Met Leu Gly Val Gly Gly Ile Val Ser Asp Leu Thr Gly Gly Ile Arg  
1 5 10 15

Gly Ala His Leu Lys Gly Ser Val Val Leu Met Arg Lys Asn Ala Leu  
20 25 30

Asp Phe Asn Asp Phe Gly Ala His Val Met Asp Gly Val Thr Glu Leu  
35 40 45

Leu Gly Arg Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Asn Val Asp  
50 55 60

His Asn Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Asn Leu Glu  
65 70 75 80

Gln Trp Leu Leu Pro Thr Asn Leu Pro Phe Ile Thr Thr Gly Glu Asn  
85 90 95

Lys Phe Ala Val Thr Phe Asp Trp Ser Val Asp Lys Leu Gly Val Pro  
100 105 110

Gly Ala Ile Ile Val Lys Asn Asn His Ala Ser Glu Phe Phe Leu Lys  
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Asn Val Pro Gly Arg Gly Thr Ile Val Phe Val  
130 135 140

Ala Asn Ser Trp Val Tyr Pro Gln Ala Lys Tyr Arg Tyr Asn Arg Val  
145 150 155 160

Phe Phe Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro His Gln Met Pro Ala Ala Leu  
165 170 175

Lys Pro Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln  
180 185 190

Gln Gly Pro Tyr Leu Asp His Asp Arg Val Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr  
 195 200 205  
 Asn Asp Leu Gly Asp Ser Arg Asp Val Leu Gly Gly Ser Lys Asp Leu  
 210 215 220  
 Pro Tyr Pro Arg Arg Cys Arg Thr Gly Arg Lys Pro Ser Asp Ser Lys  
 225 230 235 240  
 Pro Asp His Glu Ser Arg Leu Leu Leu Leu Val Gln Asn Val Tyr Val  
 245 250 255  
 Leu Arg Asp Glu Leu Phe Gly His Leu Lys Gln Ser Asp Leu Leu Gly  
 260 265 270  
 Tyr Thr Leu Lys Gly Trp Leu Asp Gly Ile Ile Leu Ala Ile Arg Thr  
 275 280 285  
 Tyr Val Asp Leu Ser Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Ala Asp Ile Leu  
 290 295 300  
 Lys Leu Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Asn Ile Pro Ala Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Glu Val Arg Lys Arg Phe Pro Leu Gln Leu Val Lys Asp Leu Ile Pro  
 325 330 335  
 Lys Gly Gly Asp Phe Leu Leu Lys Leu Pro Lys Pro Glu Ile Ile Lys  
 340 345 350  
 Val Asp Gln Lys Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met  
 355 360 365  
 Leu Ala Gly Val Asn Pro Met Met Ile Lys Arg Leu Thr Glu Phe Pro  
 370 375 380  
 Pro Lys Ser Thr Leu Asp Pro Ser Lys Tyr Gly Asp His Thr Ser Thr  
 385 390 395 400  
 Met Thr Glu Glu His Val Ala Lys Ser Leu Glu Gly Leu Thr Val Gln  
 405 410 415  
 Gln Ala Leu Ala Gly Asn Arg Leu Tyr Ile Val Asp Gln His Asp Asn  
 420 425 430  
 Leu Met Pro Phe Leu Ile Asp Ile Asn Asn Leu Asp Ala Ser Phe Val  
 435 440 445

## 028532

Tyr Ala Thr Arg Thr Leu Leu Phe Leu Arg Gly Asp Gly Thr Leu Ala  
 450 455 460

Pro Val Ala Ile Glu Leu Ser Ser Pro Leu Ile Gln Gly Glu Leu Thr  
 465 470 475 480

Thr Ala Lys Ser Ala Val Tyr Thr Pro Gln His Ala Gly Val Glu Gly  
 485 490 495

Trp Ile Trp Gln Leu Ala Lys Ala Tyr Ala Ser Val Asn Asp Tyr Gly  
 500 505 510

Trp His Gln Leu Ile Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu  
 515 520 525

Pro Phe Val Ile Ala Thr Asn Arg Gln Leu Ser Val Thr His Pro Val  
 530 535 540

Tyr Lys Leu Leu His Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Ala  
 545 550 555 560

Arg Ala Arg Gly Leu Leu Ile Asn Ala Gly Gly Val Ile Glu Met Thr  
 565 570 575

Val Phe Pro His Lys His Ala Met Pro Met Ser Ser Met Val Tyr Lys  
 580 585 590

His Trp Asn Phe Thr Glu Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg  
 595 600 605

Gly Met Ala Val Glu Asp Ala Ser Ser Pro His Lys Val Arg Leu Leu  
 610 615 620

Ile Lys Asp Tyr Pro Tyr Ala Thr Asp Gly Leu Ala Val Trp Asp Ala  
 625 630 635 640

Ile Glu Gln Trp Val Ser Asp Tyr Leu Thr Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp  
 645 650 655

Gly Val Leu Gln Gly Asp Val Glu Leu Gln Ala Trp Trp Lys Glu Val  
 660 665 670

Arg Glu Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Ala Trp Trp Pro Lys  
 675 680 685

Met Gln Thr Val Ala Glu Leu Ile Lys Ala Cys Ala Thr Ile Ile Trp  
 690 695 700

## 028532

Thr Gly Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr  
705 710 715 720

Ser Gly Tyr His Pro Asn Lys Pro Ser Ala Ser Arg Arg Pro Met Pro  
725 730 735

Val Gln Gly Ser Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Lys  
740 745 750

Ala Phe Ile Arg Thr Ile Thr Ser Gln Phe His Ala Leu Val Gly Ile  
755 760 765

Ser Leu Met Glu Ile Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Val Tyr Leu  
770 775 780

Gly Gln His Asp Thr Pro Ala Trp Thr Ser Asp Ala Lys Ala Leu Glu  
785 790 795 800

Ala Phe Lys Arg Phe Gly Ala Lys Leu Glu Gly Ile Glu Lys Gln Val  
805 810 815

Val Ala Met Asn Ser Asp Pro Gln Leu Lys Asn Arg Thr Gly Pro Ala  
820 825 830

Lys Phe Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Thr Gly  
835 840 845

Gln Ala Glu Gly Leu Thr Ala Arg Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile  
850 855 860

<210> 6  
<211> 684  
<212> БЕЛОК  
<213> Мутант A689 Hordeum vulgare

<400> 6

Met Leu Gly Val Gly Gly Ile Val Ser Asp Leu Thr Gly Gly Ile Arg  
1 5 10 15

Gly Ala His Leu Lys Gly Ser Val Val Leu Met Arg Lys Asn Ala Leu  
20 25 30

Asp Phe Asn Asp Phe Gly Ala His Val Met Asp Gly Val Thr Glu Leu  
35 40 45

Leu Gly Arg Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Asn Val Asp  
50 55 60

028532

His Asn Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Asn Leu Glu  
65 70 75 80

Gln Trp Leu Leu Pro Thr Asn Leu Pro Phe Ile Thr Thr Gly Glu Asn  
85 90 95

Lys Phe Ala Val Thr Phe Asp Trp Ser Val Asp Lys Leu Gly Val Pro  
100 105 110

Gly Ala Ile Ile Val Lys Asn Asn His Ala Ser Glu Phe Phe Leu Lys  
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Asn Val Pro Gly Arg Gly Thr Ile Val Phe Val  
130 135 140

Ala Asn Ser Trp Val Tyr Pro Gln Ala Lys Tyr Arg Tyr Asn Arg Val  
145 150 155 160

Phe Phe Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro His Gln Met Pro Ala Ala Leu  
165 170 175

Lys Pro Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln  
180 185 190

Gln Gly Pro Tyr Leu Asp His Asp Arg Val Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr  
195 200 205

Asn Asp Leu Gly Asp Ser Arg Asp Val Leu Gly Gly Ser Lys Asp Leu  
210 215 220

Pro Tyr Pro Arg Arg Cys Arg Thr Gly Arg Lys Pro Ser Asp Ser Lys  
225 230 235 240

Pro Asp His Glu Ser Arg Leu Leu Leu Val Gln Asn Val Tyr Val  
245 250 255

Leu Arg Asp Glu Leu Phe Gly His Leu Lys Gln Ser Asp Leu Leu Gly  
260 265 270

Tyr Thr Leu Lys Gly Trp Leu Asp Gly Ile Ile Leu Ala Ile Arg Thr  
275 280 285

Tyr Val Asp Leu Ser Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Ala Asp Ile Leu  
290 295 300

Lys Leu Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Asn Ile Pro Ala Leu Glu  
305 310 315 320

Glu Val Arg Lys Arg Phe Pro Leu Gln Leu Val Lys Asp Leu Ile Pro  
 325 330 335

Lys Gly Gly Asp Phe Leu Leu Lys Leu Pro Lys Pro Glu Ile Ile Lys  
 340 345 350

Val Asp Gln Lys Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met  
 355 360 365

Leu Ala Gly Val Asn Pro Met Met Ile Lys Arg Leu Thr Glu Phe Pro  
 370 375 380

Pro Lys Ser Thr Leu Asp Pro Ser Lys Tyr Gly Asp His Thr Ser Thr  
 385 390 395 400

Met Thr Glu Glu His Val Ala Lys Ser Leu Glu Gly Leu Thr Val Gln  
 405 410 415

Gln Ala Leu Ala Gly Asn Arg Leu Tyr Ile Val Asp Gln His Asp Asn  
 420 425 430

Leu Met Pro Phe Leu Ile Asp Ile Asn Asn Leu Asp Ala Ser Phe Val  
 435 440 445

Tyr Ala Thr Arg Thr Leu Leu Phe Leu Arg Gly Asp Gly Thr Leu Ala  
 450 455 460

Pro Val Ala Ile Glu Leu Ser Ser Pro Leu Ile Gln Gly Glu Leu Thr  
 465 470 475 480

Thr Ala Lys Ser Ala Val Tyr Thr Pro Gln His Ala Gly Val Glu Gly  
 485 490 495

Trp Ile Trp Gln Leu Ala Lys Ala Tyr Ala Ser Val Asn Asp Tyr Gly  
 500 505 510

Trp His Gln Leu Ile Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu  
 515 520 525

Pro Phe Val Ile Ala Thr Asn Arg Gln Leu Ser Val Thr His Pro Val  
 530 535 540

Tyr Lys Leu Leu His Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Ala  
 545 550 555 560

Arg Ala Arg Gly Leu Leu Ile Asn Ala Gly Gly Val Ile Glu Met Thr  
 565 570 575

Val Phe Pro His Lys His Ala Met Pro Met Ser Ser Met Val Tyr Lys  
580 585 590

His Trp Asn Phe Thr Glu Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg  
595 600 605

Gly Met Ala Val Glu Asp Ala Ser Ser Pro His Lys Val Arg Leu Leu  
610 615 620

Ile Lys Asp Tyr Pro Tyr Ala Thr Asp Gly Leu Ala Val Trp Asp Ala  
625 630 635 640

Ile Glu Gln Trp Val Ser Asp Tyr Leu Thr Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp  
645 650 655

Gly Val Leu Gln Gly Asp Val Glu Leu Gln Ala Trp Trp Lys Glu Val  
660 665 670

Arg Glu Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Ala  
675 680

<210> 7  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер для амплификации гДНК LOX-2 Hordeum vulgare

<400> 7  
acctcaagga cgcggcgtgg 20

<210> 8  
<211> 19  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер для амплификации гДНК LOX-2 Hordeum vulgare

<400> 8  
gagcgaggag tacgcgag 19

<210> 9  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Праймер для амплификации гДНК мутанта A689 LOX-2 Hordeum vulgare

<400> 9  
acctcaagga cgcggcgtga 20

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Праймер для амплификации гДНК мутанта D112 LOX-1 *Hordeum vulgare*  
  
 <400> 10  
 caaggtgcgg ttgctggtgt c 21  
  
 <210> 11  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Праймер для амплификации гДНК LOX-1 *Hordeum vulgare*  
  
 <400> 11  
 ctgcgcgctc tccttccat 19  
  
 <210> 12  
 <211> 4165  
 <212> ДНК  
 <213> Мутант D112 *Hordeum vulgare*  
  
 <400> 12  
 atgctgctgg gagggctgat cgacaccctc acgggggcga acaagagcgc ccggctcaag 60  
 ggcacggctgg tgctcatgcg caagaacgtg ctggacctca acgacttcgg cgccaccatc 120  
 atcgacggca tcggcgagtt cctcggaag ggcgtcacct gccagcttat cagctccacc 180  
 gccgtcgacc aaggtaatca ctaccctcct ccggccttct cctctgttta caagatatag 240  
 tatttctttc gtgtgggccc gcgcccatgg atggatggat gtgtctggat cggctaaaga 300  
 agataggata gctagccctg gccggtcgtc ttacctgag catgggcata tgccatcgaa 360  
 aaaagagaca acagcatgca tgcattggtg gcgcaccaga ccacgcagag caccggatgc 420  
 tcgagacaaa gcaacacaac aagcaaggac gacacgtcaa aagcaacaca acaagcaagg 480  
 acggcacgtc aaaagcaaca caaacctaaa ctaaagcaca aagacgtaag agcaagcaca 540  
 caatcagcag gctataaaca gttgtcatca aaaacaacgc tggaagagag agagaaggaa 600  
 ggaagtagta gccatgaaaa attaaatcac cgggcgttgc tctttgccc acaattaatc 660  
 aagcaggata cgtggcatgt atagttcttg taagtaaact aagcatgtga tatgagaagg 720  
 tacgtggtgg tgcagacaac gccggtcgcg ggaagggtgg cgcggaggcg gagctggagc 780  
 agtgggtgac gagcctgccg tcgctgacga cgggggagtc caagttcggc ctcaccttcg 840  
 actgggaggt ggagaagctc ggggtgccgg gcgccatcgt cgtcaacaac taccacagct 900  
 ccgagttcct gcttaaaacc atcaccctcc acgacgtccc cggccgcagc ggcaacctca 960

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ccttcgtcgc caactcatgg atctaccccg ccgccaacta ccgatacagc cgcgtcttct  | 1020 |
| tcgccaaagc cgtgcgtgga ttttctctca ctttctctc ctttcatttt caccgccttc   | 1080 |
| gtcattcatg gtcgatcatt aagtcttgcc aggacaatag atgatgagct aggagtgggt  | 1140 |
| accacttagc agtacgtaca ttattttattc cgtgttggtg gaaaaggata tggtttggtg | 1200 |
| cagatcgaca caagattgaa tgaaagttgc accgtggcac cgtggcagcg tggtaggtga  | 1260 |
| aaataactgt tgcacggatc caccacatg attgttttca tgaataaact ttttaaggat   | 1320 |
| gtgtctagcc acatctagat gcatgtcaca taattattgc atacccaaac gattaaatta  | 1380 |
| agcataaaaa gaaaaggaaa aaaatactca catatctcga cgtaagatca atgatatagt  | 1440 |
| atttagatat gcaatattta tcttacatct aaacctttct tcattcctaa atataagaca  | 1500 |
| tttgtaagat ttcactatgg acaacatacg aaacaaaatc agtggatctc tctatgcatt  | 1560 |
| cattatgtag tctataataa aatcttttaa agatcgtata ttttgcaacg gagggagtaa  | 1620 |
| aacataactt tttaatagta atgttgacg gctccacact cgcagacgta cctgccgagc   | 1680 |
| cagatgccgg cggcgctgaa gccgtaccgc gacgacgagc tccggaacct gcgtggcgac  | 1740 |
| gaccagcagg gcccgtagca ggagcacgac cgcactctacc gctacgacgt ctacaacgac | 1800 |
| ctcggcgagg gccgccccat cctcggcggc aactccgacc acccttacct gcgcgcgggc  | 1860 |
| cgcacggagc gcaagcccaa cgcacgcgac ccgagcctgg agagccggct gtcgctgctg  | 1920 |
| gagcagatct acgtgccgcg ggacgagaag ttcggccacc tcaagacgtc cgacttctg   | 1980 |
| ggctactcca tcaaggccat cacgcagggc atcctgccgg ccgtgcgcac ctacgtggac  | 2040 |
| accacccccg gcgagttcga ctccctccag gacatcatca acctctatga gggcggcatc  | 2100 |
| aagctgcccc aggtggccgc cctggaggag ctccgtaagc agttcccgtc ccagctcatc  | 2160 |
| aaggacctcc tccccgtcgg cggcgactcc ctgcttaagc tccccgtgcc ccacatcatc  | 2220 |
| caggagaaca agcaggcgtg gaggaccgac gaggagtctg caccggagggt gctcgcgggc | 2280 |
| gtcaaccogg tcatgatcac gcgtctcacg gtgagtcagc gattatttgt tcattgtgtg  | 2340 |
| tgtatggtgt ccatggtgag aaagtgcaga tcttgatttg cgttgggtcg catgcacgca  | 2400 |
| tgctgcatgc atgcaggagt tcccgccaaa aagtagtctg gaccctagca agtttggtga  | 2460 |
| ccacaccagc accatcacgg cggagcacat agagaagaac ctcgagggcc tcacggtgca  | 2520 |
| gcaggttaatt ggtccaagcc atcgacatca actatgattt acctaggagt aattggtagc | 2580 |
| tgtagataat ttggcttcgt tgcaattaat ttgatgctgg ccgatcaagt gatcgtattg  | 2640 |
| ggtttgaaat ttgcaggcgc tggaaagcaa caggctgtac atccttgatc accatgaccg  | 2700 |
| gttcatgccg ttcctgatcg acgtcaacaa cctgcccggc aacttcatct acgccacgag  | 2760 |
| gaccctcttc ttcctgcgcg gcgacggcag gctcacgccg ctgcccatcg agctgagcga  | 2820 |
| gcccatcatc cagggcgggc ttaccacggc caagagcaag gtttacacgc cggtgcccag  | 2880 |

```

cggtccgctc gaaggctggg tgtgggagct cgccaaggcc tacgtcgccg tcaatgactc      2940
cggttgccac cagctcgta gccactggta cgttctccac ggtcgatgtg attcagtcag      3000
tcgatgcaca acaactgatc gaaatatgat tgattgaaac gcgcaggctg aacactcacg      3060
cggtgatgga gccgttcgtg atctcgacga accggcacct tagcgtgacg caccgggtgc      3120
acaagctgct gagcccgcac taccgcgaca ccatgaccat caacgcgctg gcgcggcaga      3180
cgctcatcaa cgccggcggc atcttcgaga tgacgggtgtt cccgggcaag ttcgcgttg      3240
ggatgtcggc cgtgggtgtac aaggactgga agttcaccga gcagggactg ccggacgatc      3300
tcatcaagag gtacgtacct ggtaaattgt atgaatgtgt aaaacaaatt gggcgtctcg      3360
ctcactgaca ggaacgtggg aaaaaaaatg caggggcatg gcggtggagg acccgtcgag      3420
cccgtaacaag gtgcggttgc tgggtgcgga ctaccctgac gcggcggacg ggctggcgat      3480
ctggcacgcc attgagcagt acgtgagcga gtacctggcc atctactacc cgaacgacgg      3540
cgtgctgcag ggcgatacgg aggtgcaggc gtgatggaag gagacgcgcg aggtcgggca      3600
cggcgacctc aaggacgccc catggtggcc caagatgcaa agtgtgccgg agctggccaa      3660
ggcgtgcacc accatcatct ggatcgggtc ggcgctgcat gcggcagtca acttcgggca      3720
gtacccttac gcggggttcc tcccgaaacc gccgacggtg agccggcgcc gcatgccgga      3780
gcccggcacg gaggagtacg cggagctgga gcgcgacccg gagcgggcct tcatccacac      3840
catcacgagc cagatccaga ccatcatcgg cgtgtcgctg ctggaggtgc tgtcgaagca      3900
ctcctccgac gagctgtacc tcgggcagcg ggacacgccg gaggggacct cggacccaaa      3960
ggccctggag gtgttcaagc ggttcagcga ccggctgggt gagatcgaga gcaagggtgt      4020
gggcatgaac catgaccggg agctcaagaa ccgcaacggc ccggctaagt ttccctacat      4080
gctgctctac cccaacacct ccgaccacaa gggcgccgct gccgggctta ccgccaaggg      4140
catccccaac agcatctcca tctaa                                           4165

```

```

<210> 13
<211> 4165
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Геномная последовательность мутанта D112 Hordeum vulgare, включающая
сегмент, соответствующий области между стартовым и стоп-кодоном гена,
кодирующего LOX-1 cv. Barke
Соответствует WO 2005/087934

```

```

<220>
<221> Мутант D112 Hordeum vulgare
<222> (1)..(4165)
<223> Геномная последовательность мутанта D112 Hordeum vulgare, включающая
сегмент, соответствующий области между стартовым и стоп-кодоном гена,
кодирующего LOX-1 cv. Barke
Соответствует SEQ ID NO:2 из WO 2005/087934

```

```

<400> 13
atgctgctgg gagggctgat cgacaccctc acgggggcga acaagagcgc ccggtcaag      60
ggcacggtgg tgctcatgcg caagaacgtg ctggacctca acgacttcgg cgccaccatc      120
atcgacggca tcggcgagtt cctcggcaag ggcgtcacct gccagcttat cagctccacc      180
gccgtcgacc aaggtaatca ctaccctcct ccggccttct cctctgttta caagatatag      240
tatttctttc gtgtgggccc gcggccatgg atggatggat gtgtctggat cggctaaaga      300
agataggata gctagccctg gccggtcgtc ttacctgag catgggcata tgccatcgaa      360
aaaagagaca acagcatgca tgcattgtgc gcgcaccaga ccacgcagag caccggatgc      420
tcgagacaaa gcaacacaac aagcaaggac gacacgtcaa aagcaacaca acaagcaagg      480
acggcacgtc aaaagcaaca caaacctaaa ctaaagcaca aagacgtaag agcaagcaca      540
caatcagcag gctataaaca gttgtcatca aaaacaacgc tggaagagag agagaaggaa      600
ggaagtagta gccatgaaaa attaaatcac cgggcgttgc tctttgccca acaattaatc      660
aagcaggata cgtggcatgt atagtctctg taagtaaact aagcatgtga tatgagaagg      720
tacgtggtgg tgcagacaac ggcggtcgcg ggaaggtggg cgcggaggcg gagctggagc      780
agtgggtgac gagcctgccg tcgctgacga cgggggagtc caagttcggc ctcaccttcg      840
actgggaggt ggagaagctc ggggtgccgg gcgccatcgt cgtcaacaac taccacagct      900
ccgagttcct gcttaaaacc atcaccctcc acgacgtccc cggccgcagc ggcaacctca      960
ccttcgtcgc caactcatgg atctaccccg ccgccacta ccgatacagc cgcgtcttct      1020
tcgccaacga cgtgcgtgga ttttctctca ctttctctc ctttcathtt caccgccttc      1080
gtcattcatg gtcgatcatt aagtcttgcc aggacaatag atgatgagct aggagtgggt      1140
accacttagc agtacgtaca ttatttattc cgtgttggtg gaaaaggata tggtttggtg      1200
cagatcgaca caagattgaa tgaaagttgc accgtggcac cgtggcagcg tggtaggtga      1260
aaataactgt tgcacggatc caccacatg attgttttca tgaataaaact ttttaaggat      1320
gtgtctagcc acatctagat gcatgtcaca taattattgc ataccaaacc gattaaatta      1380
agcataaaaa gaaaaggaaa aaaatactca catatctcga cgtaagatca atgatatagt      1440
atttagatat gcaatattta tcttacatct aaacctttct tcattcctaa atataagaca      1500
tttgaagat ttcactatgg acaacatacg aaacaaaatc agtggatctc tctatgcatt      1560
cattatgtag tctataataa aatctttaaa agatcgtata ttttgcaacg gagggagtaa      1620
aacataactt ttaaatagta atgttgacg gctccacact cgcagacgta cctgccgagc      1680
cagatgccgg cggcgctgaa gccgtaccgc gacgacgagc tccggaacct gcgtggcgac      1740
gaccagcagg gcccgtagca ggagcacgac cgcactctacc gctacgacgt ctacaacgac      1800
ctcggcgagg gccgccccat cctcggcggc aactccgacc acccttacct gcgcgcgggc      1860

```

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cgcacggagc gcaagcccaa cgccagcgac ccgagcctgg agagccggct gtcgctgctg  | 1920 |
| gagcagatct acgtgccgcg ggacgagaag ttccggccacc tcaagacgtc cgacttcctg | 1980 |
| ggctactcca tcaaggccat cacgcagggc atcctgccgg ccgtgcgcac ctacgtggac  | 2040 |
| accacccccg gcgagttcga ctccctccag gacatcatca acctctatga gggcggcatc  | 2100 |
| aagctgcccc aggtggccgc cctggaggag ctccgtaagc agttcccgct ccagctcatc  | 2160 |
| aaggacctcc tccccgtcgg cggcgactcc ctgcttaagc tccccgtgcc ccacatcatc  | 2220 |
| caggagaaca agcaggcggtg gaggaccgac gaggagtctg cacgggaggt gctcgcgggc | 2280 |
| gtcaaccogg tcatgatcac gcgtctcacg gtgagtcagc gattatattgt tcattgtgtg | 2340 |
| tgtatggtgt ccatggtgag aaagtgcaga tcttgatttg cgttgggtcg catgcacgca  | 2400 |
| tgctgcatgc atgcaggagt tcccgccaaa aagtagtctg gacctagca agtttgggtga  | 2460 |
| ccacaccagc accatcacgg cggagcacat agagaagaac ctcgagggcc tcacggtgca  | 2520 |
| gcaggtaatt ggtccaagcc atcgacatca actatgattt acctaggagt aattggtagc  | 2580 |
| tgtagataat ttggcttcgt tgcaattaat ttgatgctgg ccgatcaagt gatcgtattg  | 2640 |
| ggtttgaaat ttgcaggcgc tggaaagcaa caggctgtac atccttgatc accatgaccg  | 2700 |
| gttcatgccg ttcttgatcg acgtcaacaa cctgcccggc aacttcatct acgccacgag  | 2760 |
| gacctcttcc ttctgacgcg gcgacggcag gtcacgccg ctcgccatcg agctgagcga   | 2820 |
| gcccacatc cagggcggcc ttaccacggc caagagcaag gtttacacgc cggtgcccag   | 2880 |
| cggctccgtc gaaggctggg tgtgggagct cgccaaggcc tacgtcgccg tcaatgactc  | 2940 |
| cgggtggcac cagctcgtea gccactggta cgttctccac ggtcgatgtg attcagtcag  | 3000 |
| tcgatgcaca acaactgacg gaaatatgat tgattgaaac gcgcaggctg aacactcacg  | 3060 |
| cggtgatgga gccgttcgtg atctcgacga accggcacct tagcgtgacg caccgggtgc  | 3120 |
| acaagctgct gagcccgcac taccgcgaca ccatgaccat caacgcgctg gcgcggcaga  | 3180 |
| cgctcatcaa cgccggcggc atcttcgaga tgacgggtgt cccgggcaag ttcgcgttgg  | 3240 |
| ggatgtcggc cgtggtgtac aaggactgga agttcaccca gcagggactg ccggacgatc  | 3300 |
| tcatcaagag gtacgtacct ggtaaatgtt atgaatgtgt aaaacaaaatt gggcgtctcg | 3360 |
| ctcactgaca ggaacgtggt aaaaaaatg caggggcatg gcggtggagg acccgtcgag   | 3420 |
| cccgtacaag gtgcggttgc tgggtgcgga ctaccctgac gcggcggaag ggctggcgat  | 3480 |
| ctggcacgcc attgagcagt acgtgagcga gtacctggcc atctactacc cgaacgacgg  | 3540 |
| cgtgctgcag ggcgatacgg aggtgcaggc gtgatggaag gagacgcgcg aggtcgggca  | 3600 |
| cggcgacctc aaggacgccc catggtggcc caagatgcaa agtgtgccgg agctggccaa  | 3660 |
| ggcgtgcacc accatcatct ggatcgggtc ggcgctgcat gcggcagtca acttcgggca  | 3720 |
| gtacccttac gcgggggtcc tcccgaaccg gccgacggtg agccggcgcc gcatgccgga  | 3780 |

```

ccccggcacg gaggagtacg cggagctgga gcgcgacccg gagcgggcct tcatccacac      3840
catcacgagc cagatccaga ccatcatcgg cgtgtcgctg ctggaggtgc tgtcgaagca      3900
ctcctccgac gagctgtacc tcgggcagcg ggacacgccg gaggggacct cggacccaaa      3960
ggccctggag gtgttcaagc ggttcagcga ccggctgggt gagatcgaga gcaaggtggt      4020
gggcatgaac catgaccggg agctcaagaa ccgcaacggc ccggctaagt ttccctacat      4080
gctgctctac cccaacacct ccgaccacaa gggcgccgct gccgggctta ccgccaaggg      4140
catccccaac agcatctcca tctaa                                           4165

```

```

<210> 14
<211> 862
<212> БЕЛОК
<213> Hordeum vulgare cv. Barke

```

```

<220>
<221> LOX1
<222> (1)..(862)
<223> Последовательность LOX1 Hordeum vulgare cv. Barke. Соответствует
SEQ ID NO: 3 из WO 2005/087934

```

```

<400> 14

```

```

Met Leu Leu Gly Gly Leu Ile Asp Thr Leu Thr Gly Ala Asn Lys Ser
1              5              10              15

```

```

Ala Arg Leu Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp
          20              25              30

```

```

Leu Asn Asp Phe Gly Ala Thr Ile Ile Asp Gly Ile Gly Glu Phe Leu
          35              40              45

```

```

Gly Lys Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Ala Val Asp Gln
          50              55              60

```

```

Asp Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Glu Gln
65              70              75              80

```

```

Trp Val Thr Ser Leu Pro Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ser Lys Phe Gly
          85              90              95

```

```

Leu Thr Phe Asp Trp Glu Val Glu Lys Leu Gly Val Pro Gly Ala Ile
          100             105             110

```

```

Val Val Asn Asn Tyr His Ser Ser Glu Phe Leu Leu Lys Thr Ile Thr
          115             120             125

```

Leu His Asp Val Pro Gly Arg Ser Gly Asn Leu Thr Phe Val Ala Asn  
 130 135 140

Ser Trp Ile Tyr Pro Ala Ala Asn Tyr Arg Tyr Ser Arg Val Phe Phe  
 145 150 155 160

Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro Ser Gln Met Pro Ala Ala Leu Lys Pro  
 165 170 175

Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln Gln Gly  
 180 185 190

Pro Tyr Gln Glu His Asp Arg Ile Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr Asn Asp  
 195 200 205

Leu Gly Glu Gly Arg Pro Ile Leu Gly Gly Asn Ser Asp His Pro Tyr  
 210 215 220

Pro Arg Arg Gly Arg Thr Glu Arg Lys Pro Asn Ala Ser Asp Pro Ser  
 225 230 235 240

Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Leu Glu Gln Ile Tyr Val Pro Arg Asp  
 245 250 255

Glu Lys Phe Gly His Leu Lys Thr Ser Asp Phe Leu Gly Tyr Ser Ile  
 260 265 270

Lys Ala Ile Thr Gln Gly Ile Leu Pro Ala Val Arg Thr Tyr Val Asp  
 275 280 285

Thr Thr Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Gln Asp Ile Ile Asn Leu Tyr  
 290 295 300

Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Lys Val Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg  
 305 310 315 320

Lys Gln Phe Pro Leu Gln Leu Ile Lys Asp Leu Leu Pro Val Gly Gly  
 325 330 335

Asp Ser Leu Leu Lys Leu Pro Val Pro His Ile Ile Gln Glu Asn Lys  
 340 345 350

Gln Ala Trp Arg Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Val Leu Ala Gly  
 355 360 365

Val Asn Pro Val Met Ile Thr Arg Leu Thr Glu Phe Pro Pro Lys Ser  
 370 375 380

## 028532

Ser Leu Asp Pro Ser Lys Phe Gly Asp His Thr Ser Thr Ile Thr Ala  
 385 390 395 400

Glu His Ile Glu Lys Asn Leu Glu Gly Leu Thr Val Gln Gln Ala Leu  
 405 410 415

Glu Ser Asn Arg Leu Tyr Ile Leu Asp His His Asp Arg Phe Met Pro  
 420 425 430

Phe Leu Ile Asp Val Asn Asn Leu Pro Gly Asn Phe Ile Tyr Ala Thr  
 435 440 445

Arg Thr Leu Phe Phe Leu Arg Gly Asp Gly Arg Leu Thr Pro Leu Ala  
 450 455 460

Ile Glu Leu Ser Glu Pro Ile Ile Gln Gly Gly Leu Thr Thr Ala Lys  
 465 470 475 480

Ser Lys Val Tyr Thr Pro Val Pro Ser Gly Ser Val Glu Gly Trp Val  
 485 490 495

Trp Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Val Ala Val Asn Asp Ser Gly Trp His  
 500 505 510

Gln Leu Val Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu Pro Phe  
 515 520 525

Val Ile Ser Thr Asn Arg His Leu Ser Val Thr His Pro Val His Lys  
 530 535 540

Leu Leu Ser Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Thr Ile Asn Ala Leu Ala  
 545 550 555 560

Arg Gln Thr Leu Ile Asn Ala Gly Gly Ile Phe Glu Met Thr Val Phe  
 565 570 575

Pro Gly Lys Phe Ala Leu Gly Met Ser Ala Val Val Tyr Lys Asp Trp  
 580 585 590

Lys Phe Thr Glu Gln Gly Leu Pro Asp Asp Leu Ile Lys Arg Gly Met  
 595 600 605

Ala Val Glu Asp Pro Ser Ser Pro Tyr Lys Val Arg Leu Leu Val Ser  
 610 615 620

Asp Tyr Pro Tyr Ala Ala Asp Gly Leu Ala Ile Trp His Ala Ile Glu  
 625 630 635 640

## 028532

Gln Tyr Val Ser Glu Tyr Leu Ala Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp Gly Val  
 645 650 655

Leu Gln Gly Asp Thr Glu Val Gln Ala Trp Trp Lys Glu Thr Arg Glu  
 660 665 670

Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Pro Trp Trp Pro Lys Met Gln  
 675 680 685

Ser Val Pro Glu Leu Ala Lys Ala Cys Thr Thr Ile Ile Trp Ile Gly  
 690 695 700

Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Ala Gly  
 705 710 715 720

Phe Leu Pro Asn Arg Pro Thr Val Ser Arg Arg Arg Met Pro Glu Pro  
 725 730 735

Gly Thr Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Arg Ala Phe  
 740 745 750

Ile His Thr Ile Thr Ser Gln Ile Gln Thr Ile Ile Gly Val Ser Leu  
 755 760 765

Leu Glu Val Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Leu Tyr Leu Gly Gln  
 770 775 780

Arg Asp Thr Pro Glu Trp Thr Ser Asp Pro Lys Ala Leu Glu Val Phe  
 785 790 795 800

Lys Arg Phe Ser Asp Arg Leu Val Glu Ile Glu Ser Lys Val Val Gly  
 805 810 815

Met Asn His Asp Pro Glu Leu Lys Asn Arg Asn Gly Pro Ala Lys Phe  
 820 825 830

Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Lys Gly Ala Ala  
 835 840 845

Ala Gly Leu Thr Ala Lys Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile  
 850 855 860

# ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение ячменя или его часть для приготовления напитка, содержащего потенциал T2N (транс-2-ноненаля) на 50% ниже в сравнении с потенциалом T2N напитка, приготовленного таким же образом из культивара Power ячменя, при этом указанное растение ячменя содержит ген липоксигеназы LOX-1, который кодирует мутированную форму липоксигеназы LOX-1 (SEQ ID NO: 14), при этом указанная мутированная форма LOX-1 лишена от 2 до 343 аминокислот из 520-862 LOX-1, что приводит к полной потере функционального фермента LOX-1, и содержит ген липоксигеназы LOX-2 (SEQ ID NO: 2), который кодирует мутированную форму липоксигеназы LOX-2, при этом указанная мутированная форма LOX-2 лишена от 2 до 203 аминокислот из 515-717 LOX-2, что приводит к полной потере функционального фермента LOX-2, где потенциал T2N представляет собой разницу между начальной и конечной концентрациями транс-2-ноненаля, высвобождаемого в напиток при инкубации в течение 2 ч при 100°C, pH 4,0.

2. Растение ячменя или его часть по п.1, где ген, кодирующий LOX-1 (SEQ ID NO: 13) указанного растения, содержит преждевременный стоп-кодон.

3. Растение ячменя или его часть по п.2, где ген, кодирующий LOX-1 указанного растения, содержит стоп-кодон, причем указанный кодон соответствует номерам оснований 3572-3574 LOX-1 (SEQ ID NO: 13).

4. Растение ячменя или его часть по любому из пп.1-3, где ген, кодирующий LOX-2 указанного растения, содержит преждевременный стоп-кодон.

5. Растение ячменя или его часть по п.3, где ген LOX-2 имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

6. Растение ячменя или его часть по п.1, где ген, кодирующий LOX-2 указанного растения, содержит мутацию в положении нуклеотида 2689 SEQ ID NO: 1, при этом указанная мутация вводит nonsense-кодон.

7. Напиток, выбранный из группы, состоящей из напитков на основе солода, напитков на основе ячменя и напитков на основе смеси солода и ячменя, где указанный напиток приготовлен из растения ячменя или его части по любому из пп.1-6, где указанный напиток содержит потенциал T2N на 50% ниже в сравнении с потенциалом T2N напитка, приготовленного таким же образом из культивара Power ячменя, где потенциал T2N представляет собой разницу между начальной и конечной концентрациями транс-2-ноненаля, высвобождаемого в напиток при инкубации в течение 2 ч при 100°C, pH 4,0.

8. Напиток по п.7, где указанный напиток приготовлен на основе смеси солода и ячменя.

9. Напиток по п.7, где указанный напиток является солодовым напитком.

10. Напиток по любому из пп.7-9, где напиток является пивом.

11. Напиток по п.7, где указанный напиток является ячменным пивом.

12. Напиток по любому из пп.7-11, где напиток содержит менее 50% свободного T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из культивара Power ячменя, после хранения в течение 8 недель при 37°C.

13. Напиток по любому из пп.7-12, где напиток содержит менее 40% свободного T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из культивара Power ячменя, после хранения в течение 8 недель при 37°C.

14. Напиток по любому из пп.7-13, где напиток содержит менее 35% свободного T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из культивара Power ячменя, после хранения в течение 8 недель при 37°C.

15. Напиток по любому из пп.7-14, где напиток содержит менее 30% свободного T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из культивара Power ячменя, после хранения в течение 8 недель при 37°C.

16. Напиток по любому из пп.7-15, где напиток содержит менее 25% свободного T2N в сравнении с напитком, приготовленным таким же образом из культивара Power ячменя, после хранения в течение 8 недель при 37°C.

17. Композиция солода, приготовленная из растения ячменя или его части по любому из пп.1-6.

18. Композиция сусла, приготовленная с использованием растения ячменя или его части по любому из пп.1-6, или с использованием композиции солода, приготовленной из указанного растения ячменя или его части, или их смесей.

19. Напиток по любому из пп.7-16, где указанный напиток приготовлен из композиции солода по п.17 или композиции сусла по п.18.

20. Композиция солода по п.17, где композиция солода выбрана из группы, состоящей из ячменных сиропов, солодовых сиропов, ячменных экстрактов и солодовых экстрактов.

21. Композиция сусла по п.18, где композиция сусла выбрана из группы, состоящей из ячменных сиропов, солодовых сиропов, ячменных экстрактов и солодовых экстрактов.

22. Пищевая композиция, приготовленная с использованием растения ячменя или его части по любому из пп.1-6, или с использованием композиции солода, приготовленной из указанного растения ячме-

ня или его части, или их смесей.

23. Кормовая композиция, приготовленная с использованием растения ячменя или его части по любому из пп.1-6, или с использованием композиции солода, приготовленной из указанного растения ячменя или его части, или их смесей.

24. Способ получения напитка, содержащего потенциал T2N на 50% ниже в сравнении с потенциалом T2N напитка, приготовленного таким же образом из культивара Power ячменя, где потенциал T2N представляет собой разницу между начальной и конечной концентрациями транс-2-ноненаля, высвобождаемого в напиток при инкубации в течение 2 ч при 100°C, pH 4,0 причем указанный способ включает стадии:

- (i) приготовление композиции, содержащей растение ячменя или его части по любому из пп.1-6; и
- (ii) переработка композиции (i) в напиток.

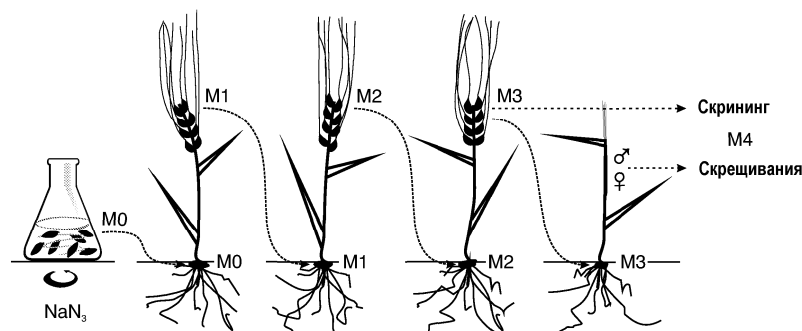
25. Способ получения композиции солода, содержащей потенциал T2N на 50% ниже в сравнении с потенциалом T2N композиции солода, приготовленной таким же образом из культивара Power ячменя, причем указанный способ включает стадии:

- (i) обеспечение зерен растения ячменя по любому из пп.1-6;
- (ii) замачивание указанных зерен;
- (iii) проращивание замоченных зерен;
- (iv) обработка проросших зерен нагреванием.

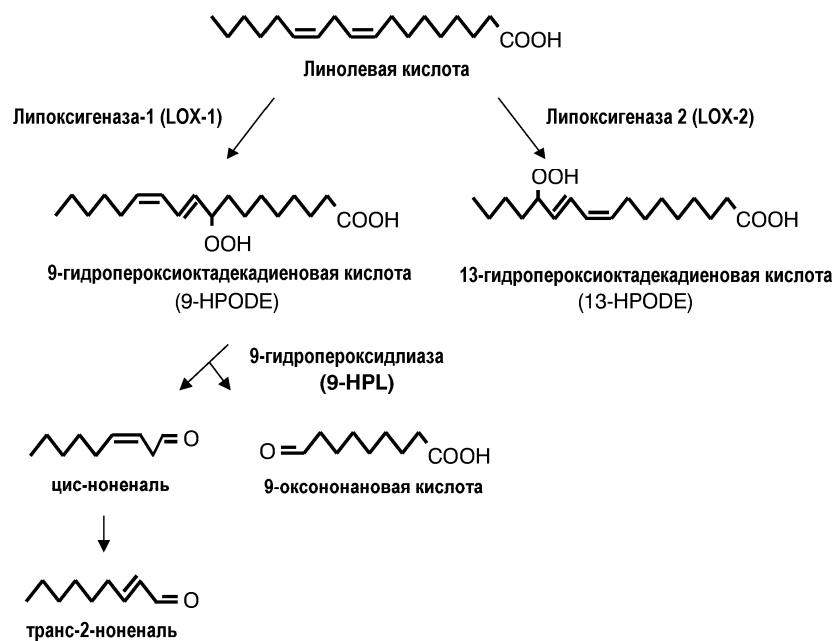
26. Способ по п.25, где композиция солода содержит уровень свободного T2N, который равен самое большее 50% T2N в сравнении со свободным T2N в композиции солода, приготовленной таким же образом из мутанта D112 ячменя, имеющего номер доступа РТА-5487 депозита ATCC.

27. Способ получения растения ячменя по п.1 для приготовления напитка, содержащего потенциал T2N на 50% ниже в сравнении с потенциалом T2N напитка, приготовленного таким же образом из культивара Power ячменя, при этом указанное растение содержит ген LOX-1, который кодирует мутированную форму LOX-1 (SEQ ID NO: 14), при этом указанная мутированная форма LOX-1 лишена от 2 до 343 из аминокислот 520-862 LOX-1, что приводит к полной потере функционального фермента LOX-1, и содержит ген LOX-2 (SEQ ID NO: 2), который кодирует мутированную форму LOX-2, при этом указанная мутированная форма LOX-1 лишена от 2 до 203 из аминокислот 515-717 LOX-2, что приводит к полной потере функционального фермента LOX-2, включающий стадии:

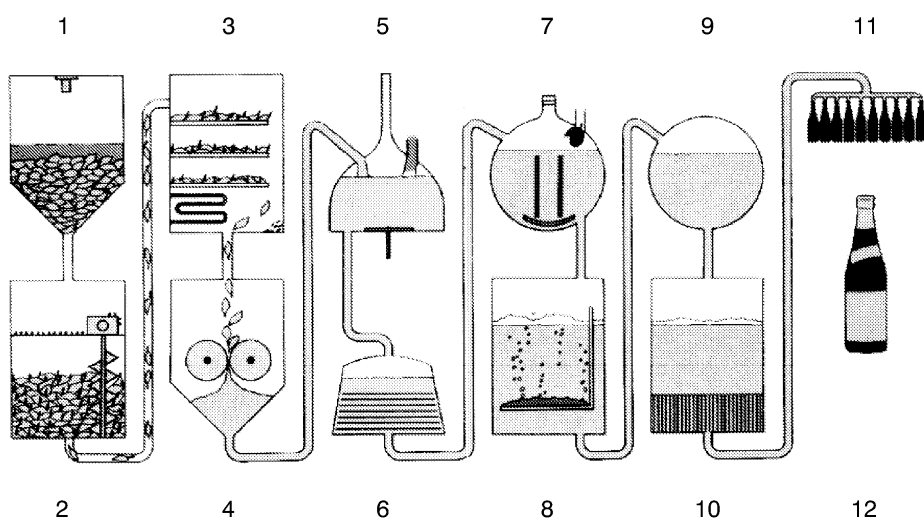
- (i) обеспечение растения ячменя или его частей с полной потерей функционального фермента LOX-1; и
- (ii) мутагенез указанного растения ячменя, и/или клеток ячменя, и/или ткани ячменя, и/или зерен ячменя, и/или зародышей ячменя из указанного растения ячменя с получением посредством этого генерации M0 ячменя; и
- (iii) размножение указанных мутагенизированных растений, зерен и/или зародышей ячменя в течение по меньшей мере 2 генераций с получением посредством этого генерации Mx растений ячменя, где x является целым числом  $\geq 2$ ; и
- (iv) получение зародышей из указанных растений ячменя Mx; и
- (v) проращивание указанных зародышей;
- (vi) определение активностей LOX-1 и LOX-2 в указанных проросших зародышах или их частях; и
- (vii) отбор растений с полной потерей активностей LOX-1 и LOX-2 в проросших зародышах; и
- (viii) определение присутствия или отсутствия мутации в гене, кодирующем LOX-1, и в гене, кодирующем LOX-2; и
- (ix) отбор растений, несущих мутацию в гене, кодирующем LOX-1, и в гене, кодирующем LOX-2, с получением посредством этого растения ячменя, содержащего первую мутацию, приводящую к полной потере функционального фермента LOX-1, и вторую мутацию, приводящую к полной потере функционального фермента LOX-2.



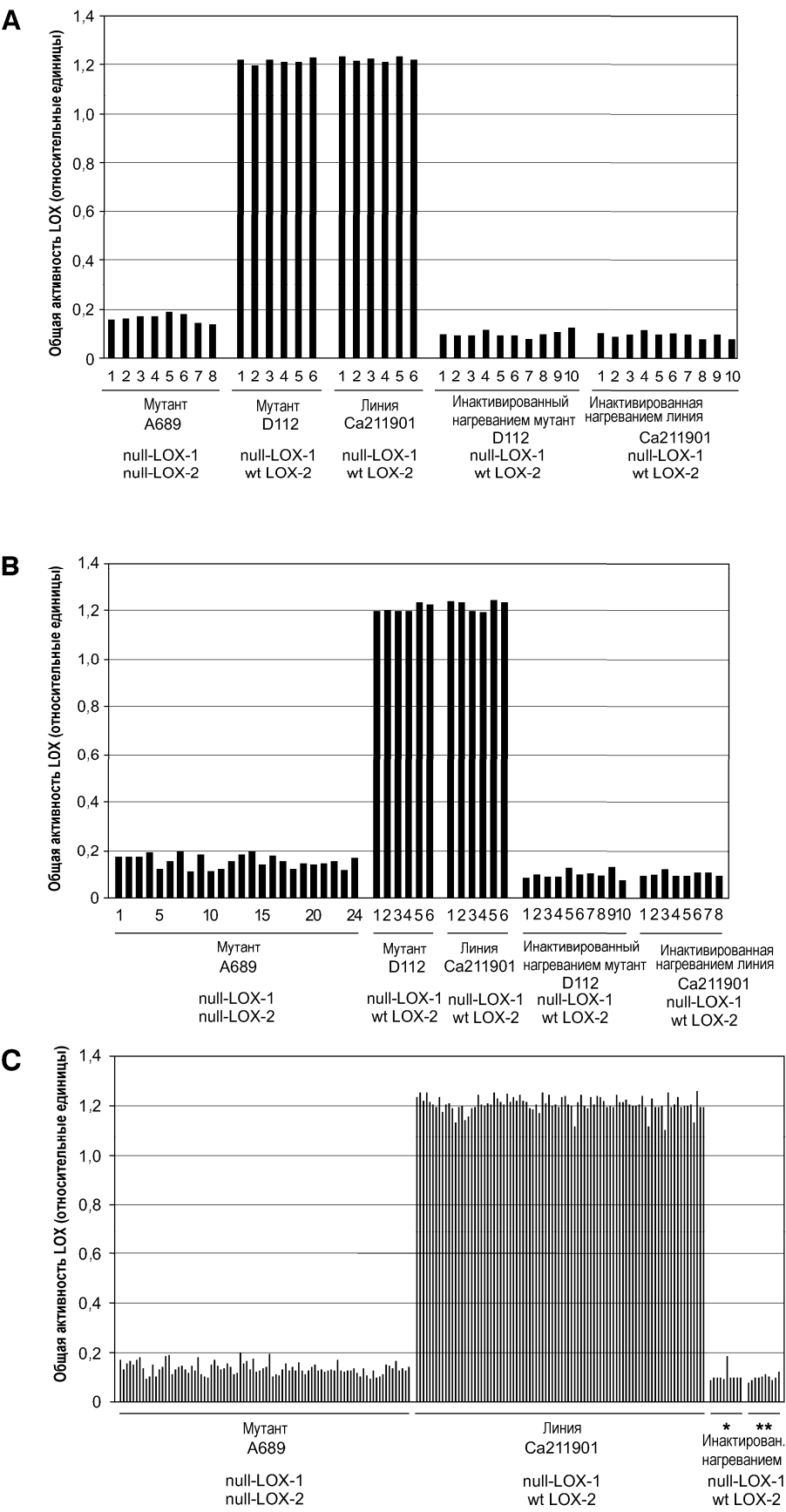
Фиг. 1



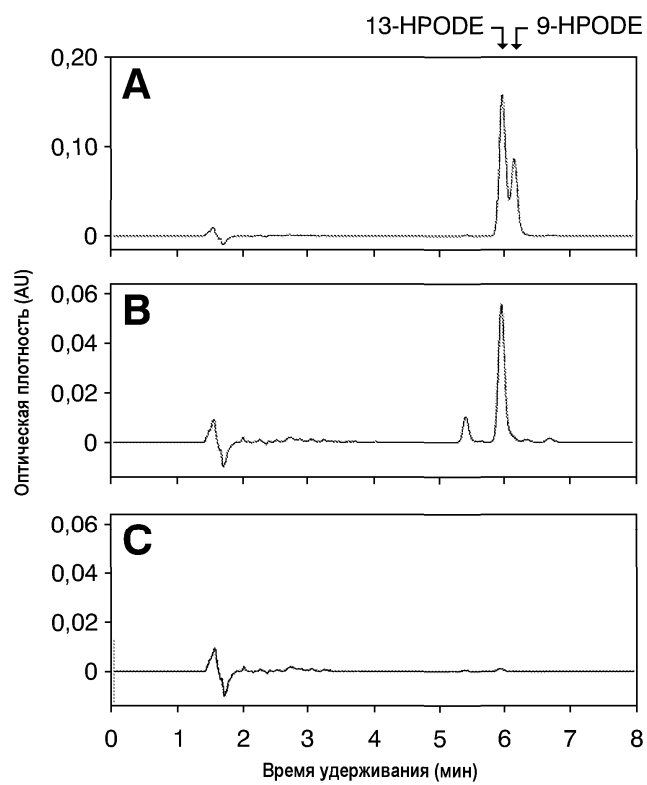
Фиг. 2



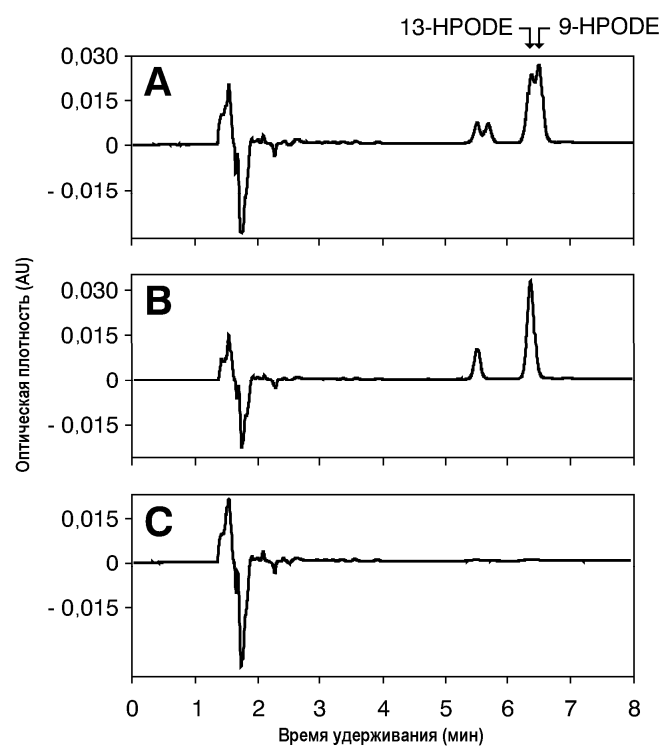
Фиг. 3



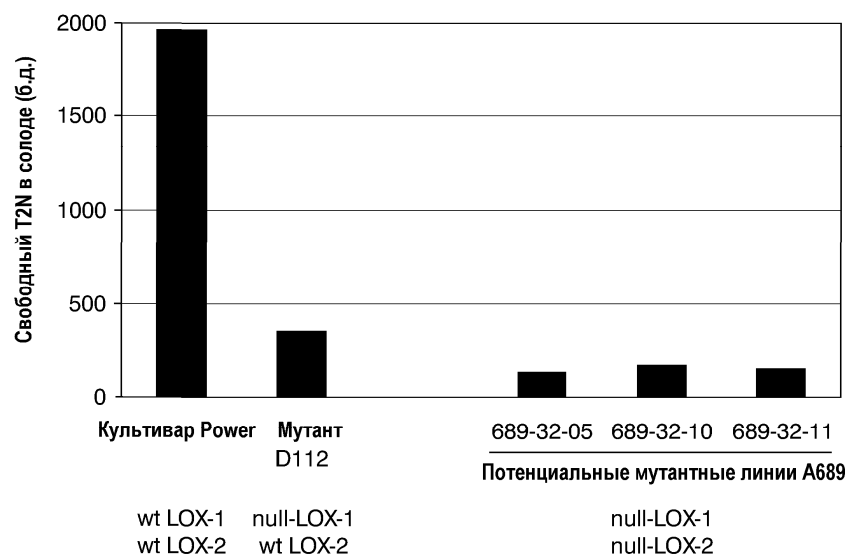
Фиг. 4



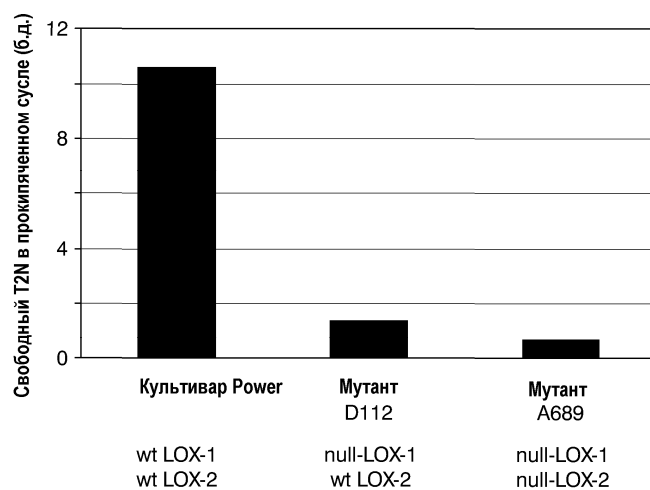
Фиг. 5



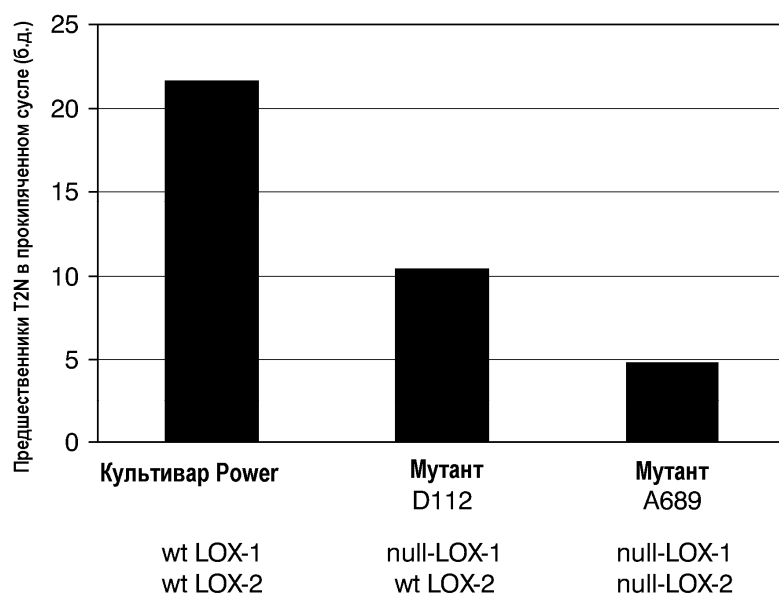
Фиг. 6



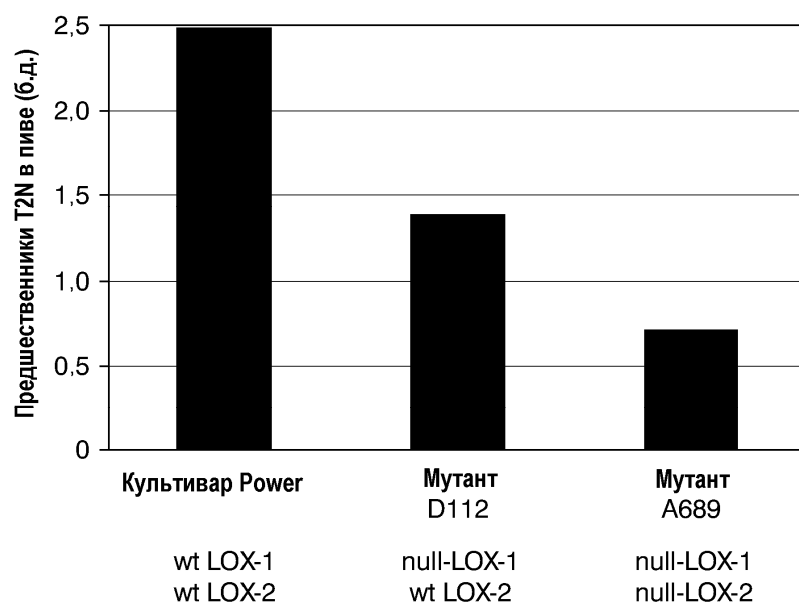
Фиг. 7



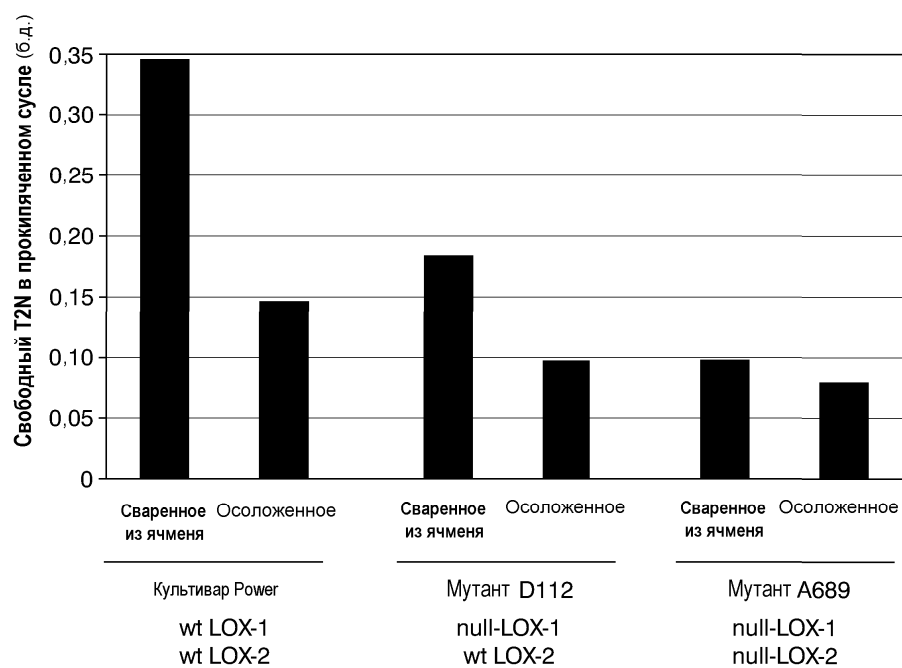
Фиг. 8



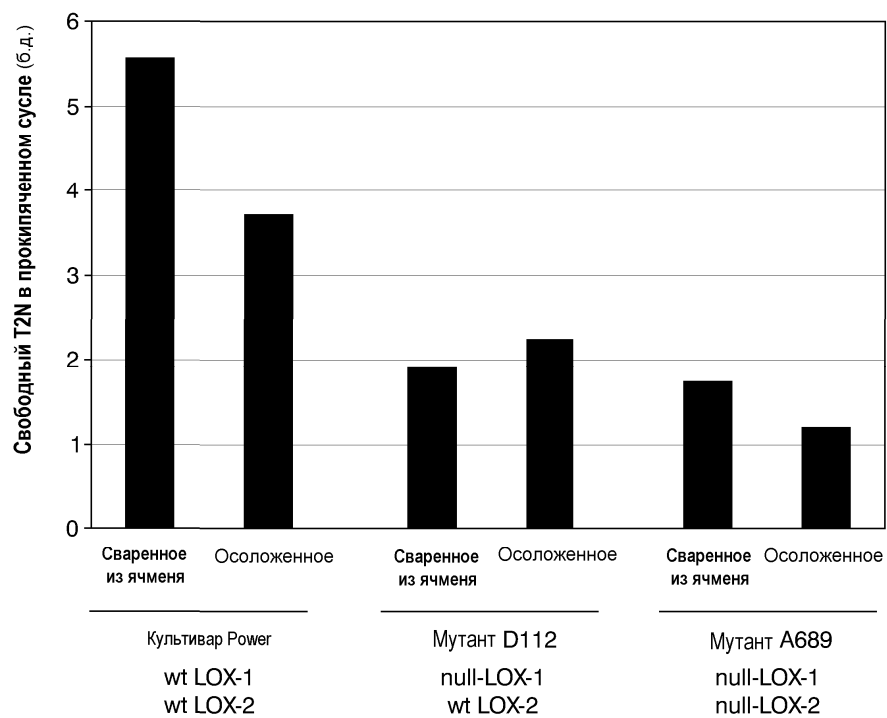
Фиг. 9



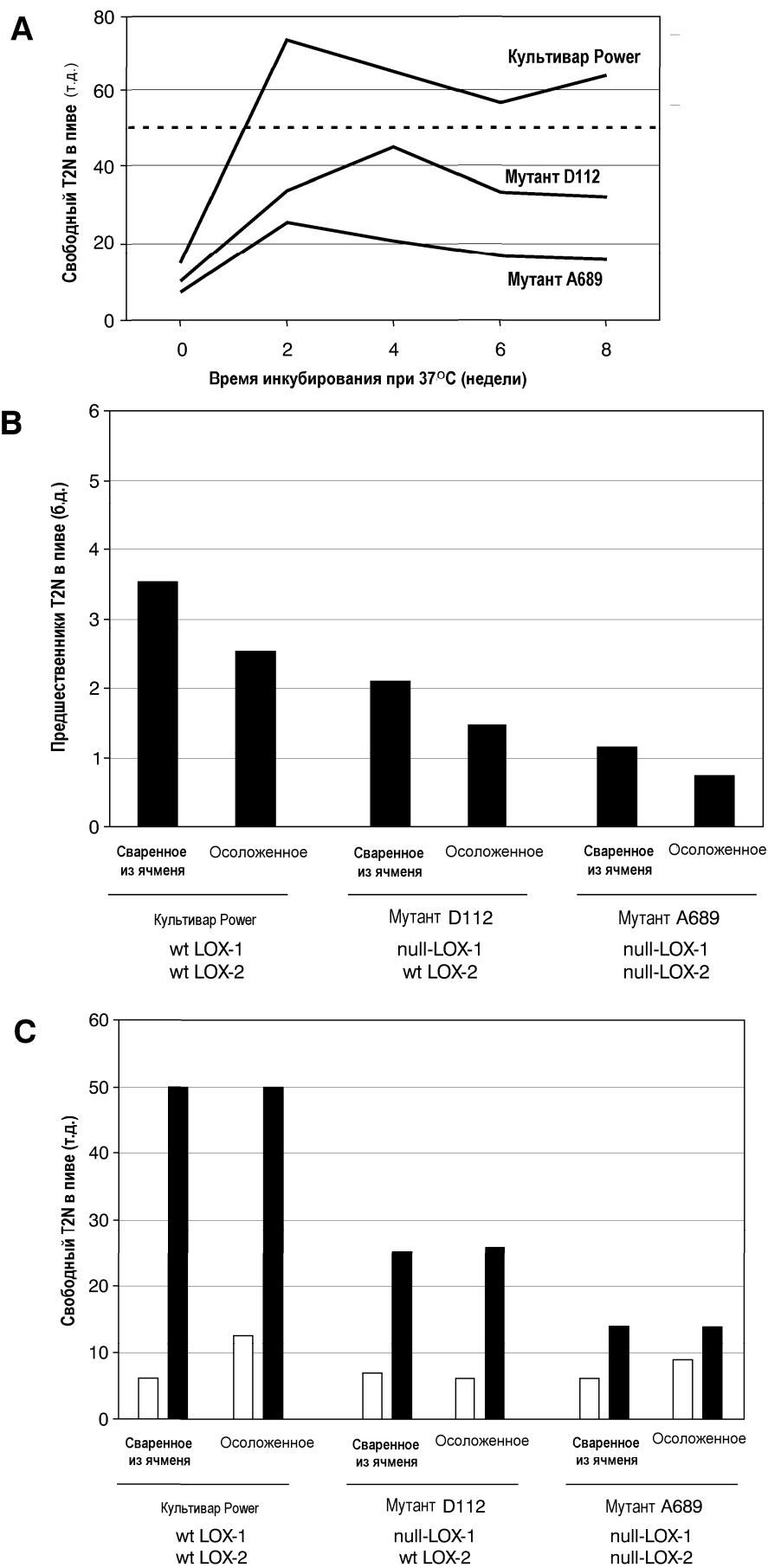
Фиг. 10



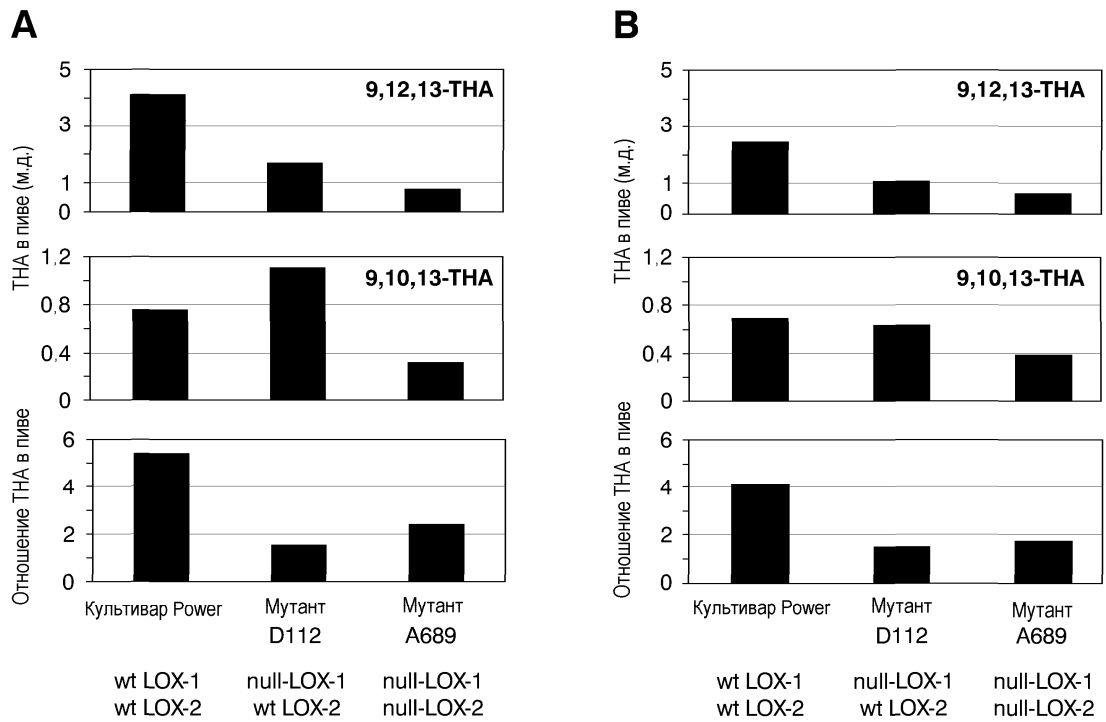
Фиг. 11



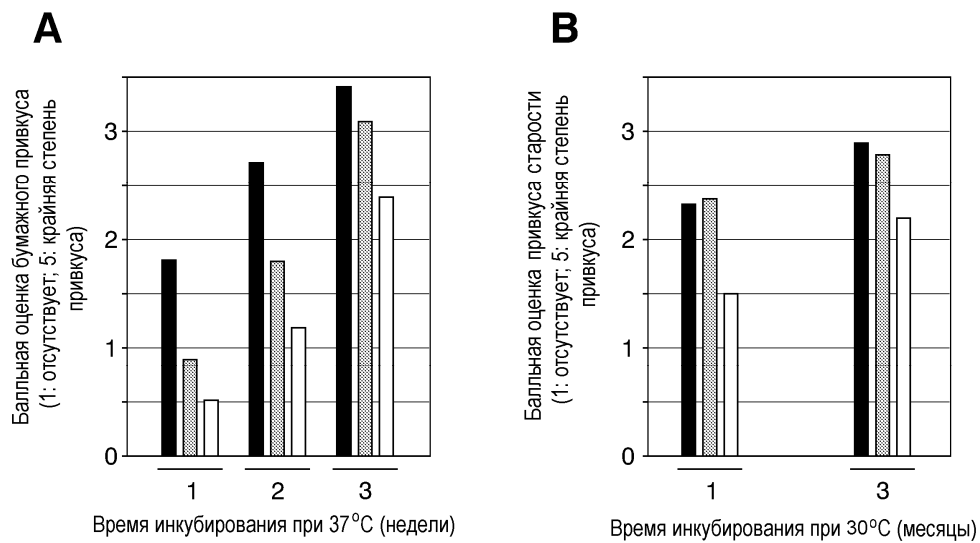
Фиг. 12



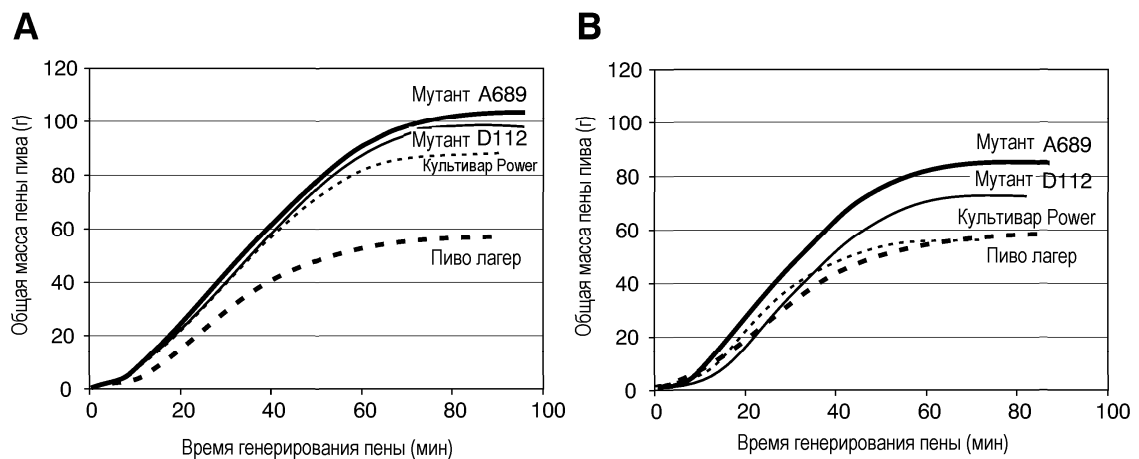
Фиг. 13



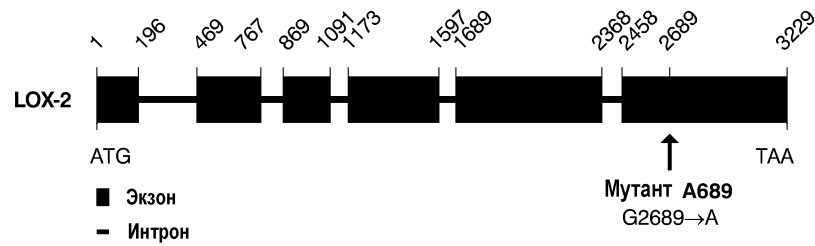
Фиг. 14



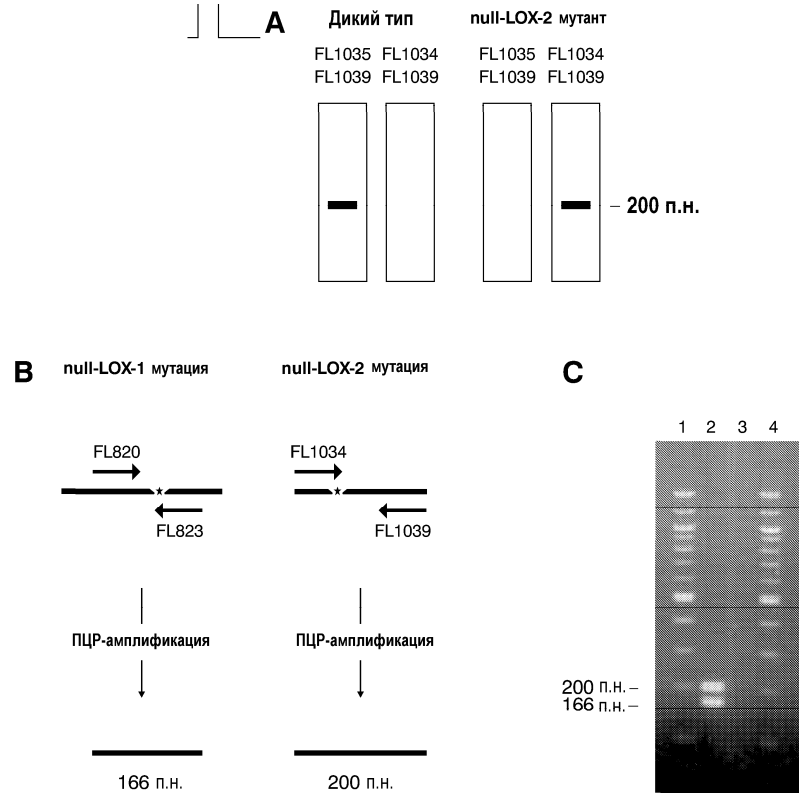
Фиг. 15



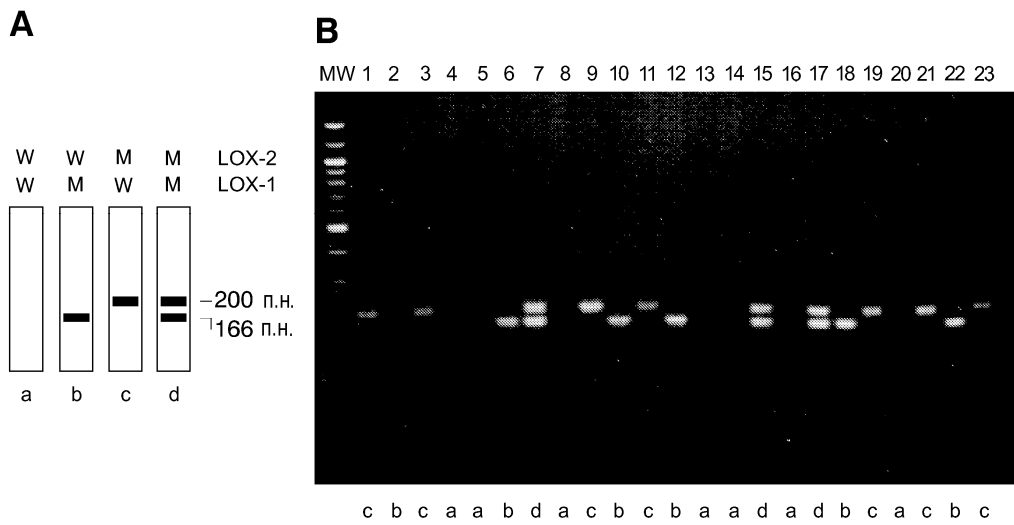
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19