



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 984**

51 Int. Cl.:
C12N 15/53 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 9/08 (2006.01)
C12C 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04723378 .8**
96 Fecha de presentación : **25.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1609866**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

54 Título: **Gen de la lipoxigenasa-1 de cebada, método de selección de cebada, materiales para bebidas alcohólicas de malta y método para la producción de bebidas alcohólicas de malta.**

30 Prioridad: **25.03.2003 JP 2003-83924**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Sapporo Breweries Limited**
20-1, Ebisu 4-chome
Shibuya-ku, Tokyo 150-8522, JP

72 Inventor/es: **Hirota, Naohiko;**
Kaneko, Takafumi;
Kuroda, Hisao;
Kaneda, Hirotaka;
Takoi, Kiyoshi y
Takeda, Kazuyoshi

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 312 984 T3

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

DESCRIPCIÓN

Gen de la lipoxigenasa-1 de cebada, método de selección de cebada, materiales para bebidas alcohólicas de malta y método para la producción de bebidas alcohólicas de malta.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un gen de lipoxigenasa-1 de cebada, a un método de selección de cebada, a materiales para bebidas alcohólicas de malta y a un método para la producción de bebidas alcohólicas de malta.

Técnica anterior

La lipoxigenasa-1 de cebada (en lo sucesivo, abreviadamente "LOX-1") es una enzima presente en la malta, que oxida el ácido linoleico derivado de la malta a ácido 9-hidroperoxioctadecadienoico durante el braceado para la producción de bebidas alcohólicas de malta (Kobayashi, N. *et al.*, *J. Ferment. Bioeng.*, 76, 371-375, 1993). El ácido 9-hidroperoxioctadecadienoico se convierte posteriormente en ácido trihidroxiocetadecenoico (THOD) por una actividad similar a peroxigenasa (Kuroda, H., *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 73-77, 2002). Se sabe que el THOD reduce la estabilidad de la espuma de cerveza, imparte un sabor astringente y deteriora la suavidad del sabor de la cerveza (Kobayashi, N., *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 60: 37-41, 2002; y Kaneda, *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 92: 221-226, 2001), dando como resultado una menor calidad de las bebidas alcohólicas de malta. Además, el ácido 9-hidroperoxioctadecadienoico se convierte en trans-2-nonenal que es la sustancia responsable de un sabor desagradable a cartulina en bebidas alcohólicas de malta envejecidas (Yasui, *Journal of the Brewing Society of Japan*, 96:94-99 (2001)).

Como estrategia para inhibir la producción de trans-2-nonenal con el fin de mejorar la estabilidad del sabor de las bebidas alcohólicas de malta, se ha propuesto un método para producir bebidas alcohólicas de malta utilizando una malta con baja actividad de LOX-1 (Drost, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 48: 124-131 (1990)).

Douma *et al.*, han inducido una mutación en la cebada por tratamiento mutágeno (químico) para generar una línea mutada inducida que exhibe 9% menos de actividad de LOX-1 en comparación con los controles y han intentado producir bebidas alcohólicas de malta empleando dicha cebada (WO02/053721).

Sin embargo, aún cuando se utilice esa cebada la concentración reducida de trans-2-nonenal de las bebidas alcohólicas de malta obtenidas es insuficiente y la estabilidad del sabor no mejora lo suficiente. Más aun, no se han obtenido resultados absolutamente definitivos en términos de reducir el THOD o mejorar la estabilidad de la espuma.

Descripción de la invención

A la luz de los problemas de la técnica anterior antes citados, se ha logrado la presente invención, cuyo objeto es proporcionar un gen de LOX-1 de cebada que es útil para la producción de bebidas alcohólicas de malta que exhiben estabilidad del sabor y estabilidad de la espuma mejoradas sin manipulación de genes, un método de selección de cebada deficiente en LOX-1, materiales para bebidas alcohólicas de malta derivados de cebada obtenidos por el método de selección, y un método para la producción de bebidas alcohólicas de malta usando los materiales para bebidas alcohólicas de malta.

Como resultado de una intensa y diligente investigación llevada a cabo con el propósito de alcanzar el objeto antes señalado, los inventores de la presente solicitud han completado esta invención al descubrir una variedad de cebada natural que es completamente deficiente en actividad de LOX-1 e identificar un nuevo gen LOX-1 mutante de la variedad de cebada.

Específicamente, el gen LOX-1 mutante de la presente invención se caracteriza porque la guanina presente en el sitio donador de empalme (5'-GT-3') del 5° intrón del gen LOX-1 conocido de cebada está mutado a una base diferente. La base diferente es preferiblemente adenina.

El método de selección para cebada deficiente en LOX-1 de cebada de acuerdo con la presente invención se caracteriza por distinguir cebada deficiente en LOX-1 de cebada comprobando sí o no la guanina presente en el sitio donador de empalme del quinto intrón del gen de LOX-1 está mutada a una base diferente. La base diferente es preferiblemente adenina.

Asimismo, el método de selección de cebada deficiente en LOX-1 se caracteriza por comprender una etapa de extracción de DNA genómico en donde se extrae DNA genómico de una muestra de cebada; una etapa de amplificación de un fragmento de DNA en donde se amplifica un fragmento de DNA que contiene el sitio donador de empalme del 5° intrón del gen LOX-1 a partir del DNA genómico extraído; y una etapa de detección del fragmento de DNA en donde se escinde, con una enzima de restricción, el fragmento de DNA que contiene el sitio donador de empalme del 5° intrón del gen LOX-1 amplificado en la etapa de amplificación del fragmento de DNA, se detecta un fragmento de DNA que tiene el número de bases prescrito y se distingue cebada deficiente en LOX-1 de cebada comprobando sí o no la guanina situada en el sitio donador de empalme está mutada a una base diferente.

ES 2 312 984 T3

La enzima de restricción empleada en la etapa de detección del fragmento de DNA es preferiblemente AfaI y/o RsaI, que reconocen la secuencia de nucleótidos 5'-GTAC-3'.

De acuerdo con la presente invención, la variedad de cebada que tiene el rasgo de deficiente actividad de LOX-1 se distingue sobre la base de la presencia o ausencia de una mutación de la guanina en el sitio donador de empalme del 5° intrón del gen LOX-1.

Como resultado, es posible distinguir fácilmente la variedad de cebada deficiente en actividad de LOX-1 por análisis a nivel genético, sin medir directamente la actividad de LOX-1. La actividad de la enzima está influenciada por las etapas de desarrollo individuales, el medio ambiente y otros factores y, por lo tanto, es difícil medirla con precisión, pero este método permite distinguir la variedad de cebada deficiente en actividad de LOX-1 de manera diferente de la medición enzimática y, por tanto, independientemente del medio ambiente y otros factores. Más aun, aunque no se puede medir la actividad enzimática hasta que las semillas hayan madurado, el escrutinio de DNA puede identificar la presencia o ausencia del rasgo de deficiencia de actividad en una etapa temprana del desarrollo, puesto que se lleva a cabo antes de la floración y, por consiguiente, es eficaz para el retrocruzamiento continuo.

El material para las bebidas alcohólicas de malta de la presente invención se caracteriza por consistir en una semilla, una malta, un extracto de malta, un producto de la descomposición de cebada o un derivado de cebada procesada procedente de cebada que tiene un gen LOX-1 mutante de acuerdo con la presente invención.

El material para bebidas alcohólicas de malta de la presente invención se caracteriza asimismo por consistir en una semilla, una malta, un extracto de malta, un producto de la descomposición de cebada o un derivado de cebada procesada procedente de cebada seleccionado por un método de selección de cebada deficiente en LOX-1 de acuerdo con la presente invención.

El método para la producción de bebidas alcohólicas de malta de acuerdo con la presente invención se caracteriza por utilizar el material para bebidas alcohólicas de malta de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, es posible obtener bebidas alcohólicas de malta con estabilidad de sabor y estabilidad de espuma mejoradas porque no está presente LOX-1 en el material y, por lo tanto, no se produce fácilmente el ácido 9-hidroperooctadecadienoico a partir del ácido linoleico y, en consecuencia, tampoco se producen fácilmente THOD y trans-2-nonenal en el método de producción de bebidas alcohólicas de malta.

La invención proporciona además un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos desde la posición 1 a 1554 que se exponen la SEQ ID NO: 10. Esta secuencia de nucleótidos representa la región codificadora del gen que codifica una proteína LOX-1 mutante que carece de actividad de lipoxigenasa de la proteína LOX-1. Detectando la presencia o ausencia de este ácido nucleico es posible distinguir si o no la cebada tiene el rasgo de deficiencia en actividad de LOX-1.

La invención proporciona además incluso un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que se expone en SEQ ID NO: 11. Esta secuencia de nucleótidos representa la secuencia genómica del gen que codifica una proteína LOX-1 mutante que carece de actividad de lipoxigenasa de la proteína LOX-1. Detectando la presencia o ausencia de este ácido nucleico en una muestra de cebada, es posible distinguir si o no la cebada tiene el rasgo de deficiencia en actividad de LOX-1.

La invención proporciona además incluso un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de 10 a 60 bases continuas, incluyendo la base 3178^a en la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 11. La base 3178^a es un polimorfismo de un solo nucleótido, que es G en LOX-1 auténtico y A en LOX-1 mutante. Detectando la presencia o ausencia del ácido nucleico que incluye el sitio polimorfo en una muestra de cebada es posible distinguir si o no la cebada tiene el rasgo de deficiencia en actividad de LOX-1.

La invención proporciona además un método para detectar la presencia de actividad de LOX-1 en cebada, que comprende una etapa de aislar un DNA genómico a partir de una muestra de cebada, y una etapa de detectar la base 3178^a de la secuencia de nucleótidos que se expone en la SEQ ID NO: 11, en donde la presencia de la base es un indicador de la presencia de la actividad de LOX-1 en cebada. De acuerdo con este método es posible distinguir si o no la cebada analizada tiene el rasgo de deficiencia en actividad de LOX-1.

Una semilla, malta, extracto de malta, producto de descomposición de cebada o cebada procesada derivada de cebada deficiente en actividad de LOX-1 descubierta por este método puede ser usado como materia prima para bebidas alcohólicas de malta con estabilidad de sabor y estabilidad de espumas mejoradas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica que muestra los resultados de actividad de LOX-1 en el Ensayo de búsqueda 1.

La Figura 2 es una gráfica que muestra los resultados de la inhibición de actividad en el Ensayo de verificación 1.

ES 2 312 984 T3

La Figura 3 es un par de imágenes de electroforesis que muestran los resultados del análisis de Western de la proteína LOX de la semilla de cebada en el Ensayo de verificación 2. La imagen A muestra los resultados de análisis Western después de la SDS-PAGE, y B muestra los resultados del análisis de Western después de la IEF.

5 La Figura 4 es una imagen de electroforesis que muestra los resultados de los análisis de RT-PCR del RNA de semillas de cebada en el Ensayo de verificación 3.

La Figura 5 es un diagrama que muestra la estructura del sitio donador de empalme del 5° intrón del gen LOX-1 en el Ensayo de verificación 4.

10 La Figura 6 es un par de imágenes de electroforesis que muestran los resultados de los análisis de empalme del gen LOX-1 mutante en el Ensayo de verificación 5. La imagen A es una imagen de electroforesis de fragmentos amplificados que contienen del 3° al 5° intrones y B es una imagen de electroforesis de los mismos fragmentos que A tras la digestión con StuI.

15 La Figura 7 es una imagen de electroforesis que muestra las proteínas inducidas por expresión en *E. coli* en los Ensayos de verificación 7 y 8.

20 La Figura 8 es una gráfica que muestra la actividad de la expresión inducida en *E. coli* en el Ensayo de verificación 1.

La Figura 9 es una imagen de electroforesis que muestra el polimorfismo de DNA en la 2ª generación filial híbrida para Kendall x SBOU2 en el Ensayo de verificación 2.

25 La Figura 10 es una tabla que resume el polimorfismo de DNA en la segunda generación filial del híbrido y la actividad de LOX en la tercera generación filial del híbrido para Kendall x SBOU2 en el Ensayo de Verificación 9.

La Figura 11 es una imagen de electroforesis que muestra los resultados del análisis de una variedad/línea de cebada general por el método que emplea AfaI según el Ejemplo 1.

30 La Figura 12 es una imagen de electroforesis que muestra los resultados del análisis de una cebada deficiente en LOX-1 por el método que emplea AfaI según el Ejemplo 2.

35 La Figura 13 es un par de gráficas que ilustran los resultados de actividad de LOX en semillas de cebada deficiente en LOX-1 de acuerdo con el Ejemplo 2. La gráfica A muestra los resultados para un tiempo de reacción enzimática de 5 minutos y la gráfica B muestra los resultados para un tiempo de reacción enzimática de 90 minutos.

La Figura 14 es una tabla que muestra los resultados del análisis de malta de las semillas de la población LOX+F4 y la población LOX-F4 según el Ejemplo 5.

40 La Figura 15 es una gráfica de puntos que ilustra las concentraciones de trans-2-nonenal y los potenciales de nonenal para el mosto en el Ejemplo 5.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

45 La presente invención se explicará ahora con mayor detalle.

Para empezar, se explicará el gen LOX-1 mutante de la invención.

50 El gen LOX-1 mutante de la presente invención es un nuevo gen descubierto por los inventores de la presente y se caracteriza porque la 60ª base G del gen LOX-1 de cebada conocido (SEQ ID NO: 1) está reemplazada por A (SEQ ID NO: 2). Puesto que las bases 60-61 de la SEQ ID NO:1 constituyen el sitio donador de empalme (5'-GT-3'), esta sustitución de bases produce una aberración en el empalme de LOX-1, de modo que no se puede expresar la LOX-1 activa.

55 La secuencia de nucleótidos de la región del 5° intrón del gen LOX-1 conocido de cebada se lista como SEQ ID NO: 1 en el Listado de Secuencias y la secuencia de nucleótidos de la porción del gen LOX-1 mutante de la presente invención correspondiente a la región del 5° intrón del gen LOX-1 se lista como SEQ ID NO: 2.

60 Se explicará ahora el método de selección de cebada deficiente en LOX-1 de acuerdo con la presente invención.

El método de selección de cebada deficiente en LOX-1 de acuerdo con la presente invención se caracteriza por distinguir cebada deficiente en LOX-1 basándose en sí o no la guanina situada en el sitio donador de empalme del 5° intrón del gen LOX-1 está mutada a una base diferente.

65 El método para seleccionar cebada deficiente en LOX-1 utilizando la mutación de bases antes mencionada puede ser, por ejemplo, un método que consiste en usar un cebador que contiene el sitio de mutación antes mencionado ya sea en el extremo 3' de la secuencia del cebador o dentro de la secuencia de cebador para amplificación de DNA, detectar

ES 2 312 984 T3

la mutación de bases basándose en la presencia de amplificación o en la eficiencia de amplificación y seleccionar la cebada deficiente en LOX-1, o bien un método de amplificar un fragmento de DNA que contiene el sitio de la mutación antes mencionado, determinar la secuencia de nucleótidos para detectar la mutación de bases y seleccionar la cebada deficiente en LOX-1.

5

No hay restricciones particulares en cuanto al método de detectar la mutación de la secuencia de nucleótidos, siempre que el método permita la detección de fragmentos de DNA, aunque los métodos adecuados para emplear incluyen la electroforesis en gel de agarosa y la electroforesis en gel de poliacrilamida. Cuando se ha de detectar la mutación de DNA basándose en la presencia de amplificación o la eficiencia de la amplificación, se puede utilizar PCR cuantitativa como el método TAQMAN en lugar de electroforesis.

10

El método de selección de la cebada deficiente en LOX-1 de la presente invención se caracteriza porque comprende: preferiblemente, una etapa de extracción de DNA genómico en donde se extrae el DNA genómico de una muestra de cebada; una etapa de amplificación de un fragmento de DNA en donde se amplifica, a partir del DNA genómico extraído, un fragmento de DNA que contiene el sitio donador de empalme del 5° intrón del gen LOX-1; y una etapa de detección de un fragmento de DNA en donde se escinde, con una enzima de restricción, el fragmento de DNA que contiene el sitio donador de empalme del 5° intrón del gen LOX-1 amplificado en la etapa de amplificación de fragmentos de DNA; se detecta un fragmento de DNA con el número de bases prescrito y se distingue cebada deficiente en LOX-1 de cebada basándose en si está mutada o no, a una base diferente, la guanina situada en el sitio donador de empalme.

15

20

Se pasa a explicar primeramente la etapa de extracción de DNA genómico de la presente invención.

No hay restricciones particulares con respecto al método de extracción del DNA genómico de la muestra para el ensayo de cebada y se puede emplear cualquier método conocido públicamente. Específicamente, la extracción se puede llevar a cabo, por ejemplo por el método CTAB (Murria *et al.*, 1980, *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325) o por el método del bromuro de etidio (Varadarajan y Prakash 1991, *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 6-12). El tejido empleado para la extracción del DNA genómico no está limitado a las semillas de cebada, sino que también puede consistir en hojas, tallos, raíces o similares. Por ejemplo, se pueden utilizar para la selección las hojas de un lote de individuos en generaciones de retrocruzamiento.

30

A continuación se explica la etapa de amplificación de fragmentos de DNA.

No hay restricciones particulares con respecto al método de amplificar fragmentos de DNA y se puede emplear, por ejemplo, la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores empleados para el método de PCR no están limitados específicamente en cuanto a sus secuencias de nucleótidos, siempre que sea una región que permita la amplificación de un fragmento de DNA que contiene el sitio donador de empalme del 5° intrón del gen LOX-1 y, específicamente, tienen preferiblemente 10-60 bases continuas y más preferiblemente 15-30 bases continuas del gen LOX-1. En general, la secuencia de nucleótidos del cebador tiene preferiblemente un contenido de GC de 40-60%. Además, la diferencia de los valores de Tm de los dos cebadores empleados para el método de PCR es preferiblemente cero o muy pequeña. Los cebadores preferiblemente no forman entre sí una estructura secundaria.

35

40

Se pasa a explicar ahora la etapa de detección de fragmentos de DNA.

45

El gen LOX-1 mutante de acuerdo con la presente invención tiene una secuencia de nucleótidos diferente de la del LOX-1 conocido como se ha explicado anteriormente y, por lo tanto, si se utiliza una enzima de restricción que reconoce o escinde la porción diferente para escindir el producto de la amplificación, se advertirá evidentemente una diferencia en los tamaños de los fragmentos de DNA obtenidos. No hay limitaciones particulares con respecto a la enzima de restricción empleada para la presente invención, siempre que reconozca o escinda la porción diferente, aunque son preferibles las enzimas AfaI y/o RsaI, que ya han demostrado exhibir dicha actividad.

50

En otras palabras, puesto que el gen LOX-1 mutante de la presente invención tiene mutada la guanina, situada en el sitio del donador de empalme, a una base diferente, carece del sitio de escisión para las enzimas de restricción AfaI y/o RsaI (5'-GTAC-3': nucleótidos 60-63 del 5° intrón) que están presentes en el gen LOX-1 conocido. Como resultado de ello, su patrón de escisión cuando se escinde el producto de la amplificación génica que contiene el sitio de escisión con AfaI y/o RsaI diferirá del gen LOX-1 conocido, permitiendo así la identificación del gen LOX-1 mutante.

55

El fragmento de DNA que contiene el número prescrito de bases no está limitado su número de bases, siempre que sea un fragmento de DNA en donde la presencia de la porción diferente de como resultado una diferencia del tamaño del fragmento de DNA obtenido mediante la escisión del producto de la amplificación con la enzima de restricción.

60

La detección en esta etapa no está particularmente restringida, siempre que sea un método que permita la detección del fragmento de DNA escindido por la enzima de restricción y, específicamente, se puede lograr la detección, por ejemplo, por electroforesis en gel de agarosa o electroforesis en gel de poliacrilamida.

65

Se procede a explicar ahora el material para bebidas alcohólicas de malta de la presente invención.

ES 2 312 984 T3

El material para bebidas alcohólicas de malta de la presente invención se caracteriza por consistir en una semilla, una malta, extracto de malta, producto de descomposición de cebada o cebada procesada derivado de cebada que tiene el gen LOX-1 mutante de acuerdo con la presente invención y, al ser una semilla, una malta, extracto de malta, producto de descomposición de cebada o cebada procesada derivado de cebada seleccionado por un método de selección de cebada deficiente en LOX-1 de acuerdo con la presente invención.

El extracto de malta es el extracto de la malta y se pueden mencionar, como ejemplos, el extracto de los componentes de azúcar o los componentes proteicos de la malta. El producto de la descomposición de cebada es el producto de la descomposición de cebada con enzimas o similares, e incluye cebada braceada y similares. Cebada procesada se refiere a cebada molida empleada como material aditivo para bebidas alcohólicas de malta.

Puesto que el material para las bebidas alcohólicas de malta de acuerdo con la presente invención no contiene LOX-1, no tiene lugar fácilmente la producción de ácido 9-hidroperoxioctadecadienoico a partir del ácido linoleico y, en consecuencia, tampoco tiene lugar fácilmente la producción de THOD y trans-2-nonenal durante el método de producción de bebidas alcohólicas de malta; por lo tanto es posible obtener bebidas alcohólicas de malta con sabor y estabilidad de espuma mejorados.

A continuación, se pasa a explicar el método de producción de bebidas alcohólicas de malta.

El método de producción de bebidas alcohólicas de malta de acuerdo con la presente invención se caracteriza por usar un material para bebidas alcohólicas de malta de acuerdo con la presente invención.

Se explica, en primer lugar, la etapa de malteado de acuerdo con la presente invención.

La etapa de malteado de acuerdo con la presente invención es una etapa de obtención de la malta, caracterizada por usar cebada deficiente en LOX-1 y el método no se limita particularmente y puede ser un método públicamente conocido. Más específicamente, por ejemplo, la maceración hasta un grado de maceración de 40-45% va seguida por la germinación a 10-20°C durante 3-6 días y el secado en horno para obtener la malta.

Se explica ahora la etapa de braceado de acuerdo con la presente invención.

La etapa de braceado de acuerdo con la presente invención es una etapa para obtener el mosto braceando la malta antes mencionada. Más específicamente, consiste en las siguientes cuatro etapas.

La primera etapa es una etapa de braceado en la cual el material que contiene malta se mezcla con agua, la mezcla obtenida se calienta para bracear la malta y se obtiene el mosto de la malta sacarificada.

La malta empleada para esta etapa se obtiene preferiblemente por adición de agua y aire a la cebada para la germinación, seguido por el secado para eliminar las radículas. La malta es la fuente de las enzimas necesarias para la producción del mosto, así como la principal fuente de almidón como material para el braceado. Además, la malta germinada secada en horno se utiliza para la producción del mosto a fin de impartir el sabor y color característicos de una bebida alcohólica de malta. Además a dicha malta, se pueden añadir materiales aditivos, tales como cebada deficiente en LOX-1 de acuerdo con la presente invención y/o cebada ordinaria, almidón de maíz, sémola de maíz, arroz, sacáridos o similares.

En la etapa de producción del mosto antes descrita, el extracto de malta, el producto de la descomposición de cebada o cebada procesada preparada a partir de cebada deficiente en LOX-1 de la presente invención y/o cebada corriente se mezclan con el agua de braceado y se añaden los materiales aditivos antes mencionados según sea necesario para obtener el mosto.

La malta se mezcla después de la adición al agua de braceado. También se añaden los materiales aditivos y también se pueden mezclar en este momento. Los sacáridos se pueden añadir antes de la ebullición descrita más adelante. No hay ninguna restricción particular respecto al agua de braceado y se puede añadir el agua necesaria para la producción de la bebida alcohólica de malta. El braceado se puede llevar a cabo básicamente en las condiciones convencionales. Después de la clarificación de la malta braceada obtenida de esta manera, se añaden los materiales que imparten sabor o amargor, tales como lúpulos o hierbas y se hierve la mezcla y luego se la enfría para obtener un mosto refrigerado.

La segunda etapa es una etapa de adición de levadura al mosto refrigerado para la fermentación, a fin de obtener los productos intermedios de una bebida alcohólica de malta.

La levadura empleada en esta etapa puede ser cualquier levadura de cerveza para la fermentación alcohólica, que metabolice los azúcares del mosto obtenido por el braceado de la malta para producir alcohol y dióxido de carbono gaseoso y, específicamente se puede mencionar, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum*.

La fermentación se realiza enfriando el mosto obtenido en la etapa de braceado y añadiendo al mismo la levadura. Las condiciones de fermentación pueden ser básicamente las mismas que para la fermentación convencional y, por ejemplo, la temperatura de fermentación habitualmente no es superior a 15°C y preferiblemente de 8-10°C, mientras que el período de fermentación es preferiblemente 8-10 días.

ES 2 312 984 T3

La tercera etapa es una etapa de conservación (almacenamiento) en la cual se conservan los productos intermedios de la bebida alcohólica de malta obtenida en la etapa de fermentación.

5 En esta etapa la solución de fermentación que ha completado la fermentación alcohólica se transfiere a un depósito hermético y se conserva. La fermentación secundaria es básicamente igual a las condiciones convencionales, por ejemplo, la temperatura de conservación es preferiblemente 0-2°C y el tiempo de conservación es preferiblemente 20-90 días. La conservación de la solución fermentada permite que se produzca la re-fermentación y maduración del extracto residual.

10 La cuarta etapa consiste en una etapa de filtración en la cual los productos intermedios de la bebida alcohólica de malta obtenida en la etapa de conservación se filtran para obtener una bebida alcohólica de malta.

15 Las condiciones de filtración son básicamente las mismas que las condiciones convencionales y el material de filtración puede ser, por ejemplo, tierra de diatomeas, PVPP (polivinilpirrolidona), gel de sílice, polvo de celulosa o similar y la temperatura puede ser $0 \pm 1^\circ\text{C}$.

20 Este procedimiento produce una bebida alcohólica de malta. Luego la bebida alcohólica de malta filtrada se introduce en un depósito, barril, botella o lata para su envío al mercado, ya sea directamente o después de filtración estéril o tratamiento térmico.

La proporción de malta empleada para la producción de la bebida alcohólica de cebada no está restringida particularmente, y la bebida alcohólica puede ser cualquiera de las producidas utilizando malta como material. Se pueden mencionar específicamente, por ejemplo, la bebida y el licor de malta espumoso. También se consideran bebidas alcohólicas de malta la cerveza sin alcohol y el licor de malta espumoso no alcohólico, puesto que el método de producción empleado es similar al de las bebidas alcohólicas de malta como la cerveza.

30 Puesto que el material de acuerdo con la presente invención no contiene LOX-1, no tiene lugar fácilmente la producción de ácido 9-hidroperoxioctadecadienoico a partir del ácido linoleico y, en consecuencia se inhibe la producción de THOD y trans-2-nonenal durante el transcurso del método de producción de bebidas alcohólicas de malta, y por lo tanto es posible obtener bebidas alcohólicas de malta con sabor y estabilidad de espuma mejorados.

A continuación se explica el ácido nucleico y el método para detectar la presencia de actividad de LOX-1 en cebada de acuerdo con la invención.

35 El ácido nucleico de la invención se caracteriza por comprender la secuencia de nucleótidos que se expone en la SEQ ID NO: 11. La SEQ ID NO: 11 representa la secuencia genómica para el LOX-1 mutante en la variedad de cebada SBOU2 deficiente en actividad de LOX-1. Es decir, el gen LOX-1 mutante de la invención se caracteriza por estar representado por la SEQ ID NO: 11. La base correspondiente a la posición 3178 es G en el gen LOX-1 auténtico, mientras que la base 3178^a está mutada a A en el gen LOX-1 mutante. Esta base también es la primera base del 5° intrón del gen LOX-1 auténtico, y la secuencia GT como la secuencia de bases 3178-3179 corresponde al sitio donador de empalme (Fig. 5). En el gen LOX-1 mutante, sin embargo, la secuencia de bases 3178-3179 correspondiente al sitio donador de empalme es AT, y por tanto ocurre una aberración de empalme que impide el empalme. Además, la secuencia de bases 3176-3178 es TGA que es un codón de parada, y por tanto la traducción termina en este punto.

45 Puesto que la proteína LOX-1 mutante expresada del gen LOX-1 mutante solo posee la porción correspondiente al 5° exón, carece de los residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal desde el 5° exón de la proteína LOX-1 auténtica. El peso molecular de la proteína LOX-1 auténtica es 95 kD, mientras que el de la proteína LOX-1 mutante es 57 kD. La proteína LOX-1 mutante es deficiente en actividad de lipoxigenasa, y esto está correlacionado con el hecho conocido de que el dominio correspondiente a la región del exón cerca del 5° intrón en la proteína LOX-1 auténtica es el centro activo de LOX de la planta (Shibata y Axelrod (1995) *J. Lipid Mediators and Cell Signaling* 12:213-218).

50 Consecuentemente, si la cebada que posee el gen LOX-1 mutante se usa como materia prima para la producción de bebidas alcohólicas de malta, no estará presente proteína LOX-1 en la materia prima, y por tanto será reducida la producción de ácido 9-hidroperoxioctadecadienoico a partir de ácido linoleico durante el método de producción para las bebidas alcohólicas de malta, de modo que como resultado puede conseguirse la inhibición de THOD y la producción de trans-2-nonenal para obtener bebidas alcohólicas de malta con estabilidad de sabor y estabilidad de espumas mejoradas. Por tanto, el ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que se expone en la SEQ ID NO: 11 de acuerdo con la invención es altamente útil para obtener bebidas alcohólicas de malta con estabilidad de sabor y estabilidad de espumas mejoradas.

60 El ácido nucleico de la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de 10 a 60 bases continuas incluyendo la base 3178^a en la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 11. El ácido nucleico puede ser usado como sonda para distinguir entre las formas auténticas y mutantes del gen LOX-1 de cebada. Es decir, puesto que la base 3178^a del gen LOX-1 auténtico es G, el desapareamiento resultante puede ser utilizado para distinguir entre las formas auténtica y mutante basándose en la diferencia en hibridación. Por ejemplo, formando híbridos entre estos ácidos nucleicos y el ácido nucleico del gen LOX-1, aumentando gradualmente la temperatura y midiendo la temperatura de fusión de los híbridos, es posible distinguir fácilmente entre el gen LOX-1 auténtico y el gen LOX-1 mutante, puesto que diferirán sus temperaturas de fusión. El ácido nucleico también

ES 2 312 984 T3

puede utilizarse para distinguir entre las formas del gen LOX-1 (formas auténticas/mutantes) por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Desde el punto de vista de la especificidad, el ácido nucleico comprende preferiblemente una secuencia de nucleótidos de 20-50 bases continuas incluyendo la base 3178^a, y preferiblemente incluye las bases 3178-3181. El ácido nucleico también puede estar marcado con una sustancia fluorescente, radioisótopo o similar.

El método para detectar la presencia de actividad de LOX-1 en cebada de acuerdo con la invención comprende una etapa de aislar un DNA genómico de una muestra de cebada, y una etapa de detectar la base 3178^a de la secuencia de nucleótidos que se expone en la SEQ ID NO: 11, en donde la presencia de la base es un indicador de la presencia de actividad de LOX-1 en la cebada. De acuerdo con este método, es posible distinguir sin o no la cebada analizada tiene el rasgo de actividad deficiente en LOX-1.

La muestra de cebada no está restringida a semillas de cebada, y puede ser hojas, tallos, raíces o similares de cebada. El ácido nucleico puede aislarse por un método públicamente conocido, y por ejemplo, puede usarse el método CTAB o el método del bromuro de etidio.

La detección de la base 3178^a de la secuencia de nucleótidos que se expone en la SEQ ID NO: 11 puede conseguirse por un método conocido por los expertos en la técnica. Si es necesario, por ejemplo, un ácido nucleico que contiene la base 3178^a de la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 11 puede ser amplificado por un método de amplificación de ácidos nucleicos, tal como PCR. La identidad de la base en la posición 3178 del ácido nucleico aislado o un fragmento del ácido nucleico amplificado puede ser discriminada, por ejemplo, usando un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 11 en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de 10-60 bases continuas que incluye la base 3178^a, como se ha descrito antes.

Sin embargo, es más conveniente y eficaz un método para detectar la base 3178^a utilizando la diferencia en las bases 3178-3181 del gen LOX-1. El sitio de las bases 3178-3181 es el sitio de escisión para las enzimas de restricción Afal/Rsal en el gen LOX-1 auténtico, pero debido a que la base 3178^a es A en el gen LOX-1 mutante, no forma un sitio de escisión para las enzimas de restricción Afal/Rsal (Fig. 5). En otras palabras, si un fragmento de ácido nucleico aislado o amplificado se trata con las enzimas de restricción Afal/Rsal, se escindirán el ácido nucleico auténtico LOX-1, mientras que no se escindirán el ácido nucleico de LOX-1 mutante. El análisis electroforético de la muestra de ácido nucleico tratada con las enzimas de restricción dejará que la forma del gen LOX-1 (auténtico o mutante) sea distinguida basándose en la diferencia en los patrones de electroforesis, de modo que puede ser discriminada la identidad de la base en la posición 3178. Además, usando un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de 10-60 bases continuas incluyendo las bases 3178-3181 como una sonda para la hibridación con el ácido nucleico tratado con las enzimas de restricción, es posible distinguir la forma del gen LOX-1 y por tanto permitir que se discrimine la identidad de la base 3178^a base.

Si, como resultado de discriminar la base 3178^a de esta manera, se encuentra que la base es G, entonces puede llegarse a la conclusión que la cebada analizada tiene actividad de LOX-1 y no es adecuada como materia prima para bebidas alcohólicas de malta con estabilidad de sabor y estabilidad de espuma mejoradas. Por otro lado, si la base es A, entonces se puede llegar a la conclusión que la cebada analizada no tiene la actividad de LOX-1 y, por lo tanto, es adecuada como materia prima para bebidas alcohólicas de malta con estabilidad de sabor y estabilidad de espuma mejoradas.

El ácido nucleico de la invención también se caracteriza por comprender la secuencia de nucleótidos desde la posición 1 a 1554 que se expone en la SEQ ID NO: 10. La SEQ ID NO: 10 representa la secuencia de cDNA para la LOX-1 mutante expresada por la variedad de cebada SBOU2 deficiente en actividad de LOX-1. La secuencia de nucleótidos desde la posición 1 a 1554 representa la región codificadora. Como se ha explicado antes, la proteína LOX-1 mutante codificada por este cDNA carece de los residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal del 5^o exón de la proteína LOX-1 auténtica, su peso molecular es 57 kD, y carece de actividad de lipoxigenasa.

Consecuentemente, la cebada que expresa este ácido nucleico puede usarse como materia prima para la producción de bebidas alcohólicas de malta, para obtener bebidas alcohólicas de malta con estabilidad de sabor y estabilidad de espuma mejoradas, como se ha mencionado anteriormente.

Ejemplos

A continuación se explica la presente invención con mayor detalle por medio de los siguientes ejemplos, con la salvedad de que estos ejemplos no son, en modo alguno, limitativos de la invención.

Ensayo de búsqueda 1

Búsqueda de cebada deficiente en LOX-1 por medición de la actividad enzimática de LOX-1

Se midió la actividad enzimática de LOX-1 por el método descrito a continuación, y se llevó a cabo una búsqueda de la cebada deficiente en LOX-1 a partir de recursos o colecciones de genes de cebada.

ES 2 312 984 T3

En primer lugar, se extrajo una solución de enzimas en bruto de semillas de cebada por el siguiente método. Se trituró una semilla de cebada madura con un martillo y se utilizaron 500 μ l de tampón de extracción (tampón de acetato de sodio 0,1 M (pH 5,5)) para la extracción con agitación a 4°C durante 30 minutos. El extracto obtenido se centrifugó durante 10 minutos a 15.000 r.p.m. y luego se recogió el líquido sobrenadante como solución enzimática en bruto.

5 Seguidamente, se añadieron 5 μ l de solución sustrato (ácido linoleico 40 mM en solución acuosa de Tween 20 al 1,0% (p/v)) y 85 μ l de tampón de extracción a 10 μ l de la solución enzimática en bruto y se mezcló con la misma, y a continuación se llevó a cabo la reacción a 24°C durante 5 minutos. La reacción se terminó añadiendo y mezclando 100 μ l de solución de detención (2,6-di-t-butil-p-cresol 80 mM en solución en metanol). Después de dejar que la mezcla de reacción reposara a -20°C durante 30 minutos, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 20 minutos y se utilizó el líquido sobrenadante en la siguiente reacción de desarrollo de color. Se añadió una porción de 200 μ l de una solución de desarrollo de color (solución en metanol acuoso al 90% de 2,6-di-t-butil-p-cresol 4 mM, ácido sulfúrico 25 mM, sulfato de amonio y hierro (II) hexahidrato 0,25 mM, naranja de xilenol 100 mM) a 20 μ l del líquido sobrenadante obtenido y después de reposar durante 30 minutos, se midió la absorbancia a 550 nm. Como control negativo se llevó a cabo la reacción de la misma manera empleando la solución de enzima en bruto tratada térmicamente a 100°C durante 5 minutos para la inactivación de la LOX-1, en tanto que, como control positivo, se utilizaron semillas de la variedad de cebada Kendall.

20 Como se muestra en la Fig. 1, la búsqueda de recursos genéticos reveló que había actividad significativa de LOX-1 en las semillas de SBOU2. Puesto que SBOU2 es una variedad del terreno (*land race*), es una mutante espontánea en lugar de una línea mutagenizada artificialmente.

Ensayo de verificación 1

25 *Confirmación de la falta de actividad inhibitoria de LOX-1 en soluciones en bruto de enzimas de SBOU2*

Se examinaron las soluciones en bruto de enzimas de SBOU2 para determinar la presencia o ausencia de actividad inhibitoria de la LOX-1.

30 Se añadieron soluciones de enzimas de SBOU2 en bruto (10 μ l, 20 μ l, 50 μ l) a una solución de enzimas en bruto que exhibía actividad de LOX-1 (control positivo: abreviadamente PC por las iniciales en inglés *positive control*) y se examinaron los cambios en la actividad de LOX-1. La actividad de LOX-1 permaneció inalterada con la adición de la solución de enzimas de SBOU2 en bruto, y por lo tanto las soluciones de enzimas de SBOU2 en bruto no exhibieron actividad inhibitoria de LOX-1 (Fig. 2). Esto sugirió que la causa de la deficiencia de actividad de LOX-1 en SBOU2 no se debía a una sustancia inhibitoria de la actividad de LOX.

Ensayo de Verificación 2

40 *Confirmación del nivel de expresión de proteína LOX-1 en las semillas de SBOU2*

Se utilizó un anticuerpo anti-LOX-1 para determinar si se expresa, o no, la proteína LOX-1 en las semillas de SBOU2.

45 Se preparó, en primer lugar, un anticuerpo anti-LOX-1. Se obtuvo la proteína LOX-1 utilizada como antígeno purificando la proteína LOX-1 expresada por *E. coli* (Kuroda *et al.*, (2002) *J. Bioscience and Bioengineering* 93: 73-77). Se utilizó la proteína purificada para inmunizar conejos para la producción del anticuerpo LOX-1. Este anticuerpo reconoce tanto la LOX-1 como la LOX-2.

50 Luego se llevó a cabo la transferencia Western de la siguiente manera para examinar la expresión de la proteína LOX-1 en las semillas de SBOU2. Se fraccionó una porción de 3 μ g de proteína soluble total extraída de las SBOU2 utilizando tampón de acetato de sodio 0,1M (pH 5,5) mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) y luego se transfirió a una membrana PVDF (Millipore). Se lavó la membrana con TTBS (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5)), cloruro de sodio 0,15M, Tween 20 al 0,05% (p/v), 0,05% (p/v) de azida sódica) y seguidamente se hizo reaccionar con una solución de anticuerpo de LOX-1 (dilución 1000 veces/TTBS) durante 30 minutos. Se lavó la membrana con TTBS tres veces durante 5 minutos cada vez, después de lo cual se llevó a cabo la reacción durante 30 minutos con solución de anticuerpo IgG anti-conejo de cabra marcado con fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology, solución de TTBS en una dilución de 1000 veces). Después de lavar la membrana con TTBS durante 5 min x 2 y luego con AP9.5 (Tris-HCl 10 mM (pH 9,5), cloruro de sodio 0,1 M, cloruro de magnesio 5 mM) durante 5 min x 1, se efectuó la reacción con la solución sustrato con fosfatasa alcalina (1 mg/ml de nitroazul de tetrazolio, 0,5 mg/ml de BCIP, solución de AP9.5) para desarrollo del color. Como resultado, se obtuvo una banda oscura con un peso molecular de aproximadamente 95 kD con la variedad control (Kendall), mientras que se detectaron dos bandas muy tenues en las regiones de peso molecular de aproximadamente 95 kD y aproximadamente 57 kD con las semillas de SBOU2 (Fig. 65 3A).

Luego la muestra de extracción se sometió a enfoque isoeléctrico (IEF, pI 3-9) utilizando un PhastSystem (Amersham Pharmacia) y se sometió a análisis Western de modo similar al descrito anteriormente. Como resultado del análisis

ES 2 312 984 T3

con SBOU2, se detectó una banda en la posición de pI de LOX-2, pero no había ninguna banda clara presente en la posición de pI de LOX-1 (Fig. 3B). Esto sugirió que la banda de aproximadamente 95 kD que aparecía con la proteína extraída de las semillas de SBOU2 era la proteína LOX-2.

5 Estos resultados confirmaron que las semillas de SBOU2 virtualmente no expresan proteína LOX-1 auténtica.

Ensayo de verificación 3

10 *Análisis del RNA de LOX-1 de semillas de SBOU2*

Se llevó a cabo la RT-PCR utilizando como molde RNA total extraído de semillas de SBOU2 de aproximadamente 4 semanas de maduración y semillas germinadas de 3 días. La reacción se llevó a cabo utilizando kits existentes en el comercio (Roche Diagnostics, Parking Elmer), de acuerdo con los manuales de los kits. Los cebadores fueron 5'-GGAGAGGAGGCCAAGAACAAGATG-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-GGTTGCCGATGGCTTAGAT-3' (SEQ ID NO: 4), diseñados sobre la base de la secuencia publicada (DNA Databank: N° de acceso L35931). Después de la incubación a 94°C durante 2 min, se llevó a cabo la PCR con reacción a 94°C, 1 min, 60°C, 2 min y 72°C, 4 min, se repitió 31 veces, seguido por reacción de extensión a 72°C, 7 min.

20 Tras la electroforesis del DNA amplificado, se detectó la amplificación de una banda de aproximadamente 2,5 Kb del RNA de las semillas en maduración y germinación, si bien en una cantidad ligeramente menor que el control (variedad Kendall) (Fig. 4). Esto indicaba que el gen LOX-1 se había transcrito correctamente.

Puesto que los resultados antes mencionados para las semillas de SBOU2 indicaron que no se había detectado (1) actividad de LOX-1, (2) sólo estaba presente una cantidad traza de proteína antigénica que reaccionaba con el anticuerpo LOX-1, (3) se detectó la presencia de una proteína con un peso molecular de aproximadamente 57 kD y (4) se detectó RNA de LOX-1, se concluyó que el mecanismo de la deficiencia de actividad de LOX-1 en SBOU2 era una aberración posterior a la transcripción.

30 Ensayo de verificación 4

Análisis estructural de regiones de intrones del gen LOX-1 de SBOU2

35 Para analizar la estructura de las regiones de intrones y exones del gen LOX-1, se aisló DNA genómico de una región que comprendía todos los exones. Se utilizó como molde DNA total de SBOU2. Los cebadores (5'-CACGTCGCCGTCCGATCCATC-3' (SEQ ID NO: 5), 5'-GGTTGCCGATGGCTTAGAT-3' (SEQ ID NO: 4)) se diseñaron basándose en la secuencia descrita (DNA Databank: N° de acceso U83904, L35931). Se llevó a cabo la PCR con reacción a 94°C, 1 min, 65°C, 2 min y 72°C, 3 min; se repitió 31 veces, seguidas por la reacción de extensión a 72°C, 7 min. El fragmento de DNA obtenido se clonó en PCR2.1 (pGLXABAL1) para usar como patrón para el análisis estructural. El análisis estructural se llevó a cabo utilizando un secuenciador ABI y la reacción de secuenciación se llevó a cabo por el método del terminador con colorante. La estructura completa se muestra en SEQ.ID NO: 1 en el Listado de secuencias.

45 La SEQ ID NO: 1 del Listado de Secuencias muestra la estructura de la región de la secuencia de nucleótidos publicada del gen LOX-1 (WO 02053721) que contiene el 5° intrón. El sitio donador de empalme es la secuencia de nucleótidos 5'-GT-3' en las posiciones 60-61.

50 La secuencia de nucleótidos de la región correspondiente de SBOU2 determinada por los resultados del análisis se lista como SEQ ID NO: 2. Claramente en SBOU2, la guanina de la posición 60 del sitio donador de empalme está mutada a adenina.

55 El reemplazo de la 60ª base de la SEQ ID NO: 2 con adenina forma un nuevo codón de parada (la secuencia de nucleótidos 5'-TGA-3' en las posiciones 58-60 de la SEQ ID NO: 2) y, por lo tanto, presumiblemente la traducción de la proteína LOX-1 termina en ese punto si el sitio de empalme no cambia nunca hacia el extremo 5' (Fig. 5).

Se sabe que la región de exón cercana al 5° intrón es el centro activo de la LOX vegetal (Shibata y Axelrod (1995), *J. Lipid Mediators and Cell Signaling* 12: 213-228) y se cree que la aberración de empalme antes mencionada tiene un efecto principal sobre la actividad de la enzima LOX-1,

60 Ensayo de Verificación 5

Análisis del empalme en el 5° Intrón

65 Se llevó a cabo el análisis por RT-PCR para confirmar que realmente se había producido la aberración de empalme en el 5° intrón.

ES 2 312 984 T3

Se extrajo RNA total de SBOU2 y la variedad Kendall en germinación y se utilizó un kit existente en el comercio (Roche Diagnostics) para la síntesis de cDNA para preparar molde de DNA. Se llevó a cabo la PCR utilizando dos cebadores diferentes (5'-CCATCACGCAGGGCCTCCTG-3' (SEQ ID NO: 6), 5'-GCGTTGATGAGCGTCTGCCG-3' (SEQ ID NO: 7)) diseñados para dar un fragmento amplificado que contenía el 3er intrón (106 pb), el 4º intrón (132 pb) y el 5º intrón (79 pb) en la secuencia de DNA genómico. La PCR se llevó a cabo con la reacción a 94°C, 1 min, 65°C, 2 min y 72°C, 3 min, se repitió 31 veces, seguido por la reacción de extensión a 72°C, 7 min. La electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA amplificados indicó que el fragmento amplificado de SBOU2 era aproximadamente 80 pb más grande que el fragmento amplificado de la variedad Kendall (Fig. 6A). Se amplificó un fragmento de 1,2 Kb de DNA genómico de SBOU2, sugiriendo que los resultados de la RT-PCR eran los resultados del RNA expresado.

A continuación, para investigar en cuál de los intrones se había producido la aberración de empalme (el 3er intrón (106 pb), el 4º intrón (132 pb) o el 5º intrón (79 pb)), el fragmento amplificado se digirió en el sitio de la enzima de restricción *StuI* presente en la región de exón entre el 4º intrón (132 pb) y el 5º intrón. Como resultado, el fragmento de DNA que contenía el 5º intrón tuvo una movilidad a grandes rasgos equivalente a la de uno de los fragmentos de amplificación de DNA genómico y, por lo tanto, se había producido evidentemente una aberración en el empalme del 5º intrón que había impedido el empalme o había desplazado el sitio de empalme hacia el extremo 3' (Fig. 6B). Es decir, que claramente el codón de terminación recién formado como se muestra en la Fig. 5 había detenido la traducción de la proteína LOX-1 de SBOU2 en ese codón, dando lugar a la pérdida de actividad de LOX-1.

Ensayo de verificación 6

Análisis estructural de cDNA de LOX-1 de SBOU2

Para establecer la estructura de LOX-1 derivada de SBOU2, se aisló el cDNA por el mismo método descrito anteriormente. La amplificación se llevó a cabo usando un cebador que comprende el sitio *Bam*HI y el codón de iniciación (5'-GGATCCATGCTGCTGGGAGGGCTG-3' (SEQ ID NO: 8)) y un cebador diseñado para incluir el sitio *Hind*III y el codón de parada (5'-AAGCTTTTAGATGGAGATGCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 9)). El fragmento amplificado se clonó en el vector pT7 Blue T (Novagen) (pBDC1) y luego proporcionó el análisis estructural. Los resultados del análisis estructural proporcionaron la secuencia de nucleótidos del cDNA mostrada como SEQ ID NO: 10. Este clon de cDNA incluye claramente la región completa del 5º intrón (bases 1554 a 1632 de la SEQ ID NO: 10).

Ensayo de verificación 7

Transformación de E. coli y expresión inducida

Para la expresión de LOX-1 derivada de la variedad *Steptoe* que retiene el LOX-1 de tipo silvestre, también se aisló el cDNA derivado de *Steptoe* del mismo modo que antes y se clonó en *E. coli* (pSDC1), separadamente de SBOU2. El fragmento *Bam*HI-*Hind*III se cortó de cada uno de los clones pSDC1 y pBDC1 y cada uno de los fragmentos obtenidos se insertó en el sitio *Bam*HI-*Hind*III del vector de expresión en *E. coli* pQE80L (Qiagen) para obtener vectores de expresión en *E. coli* (pSQE1 (cDNA insertado en *Steptoe*) y pBQE1 (cDNA insertado en SBOU2)). Estos vectores se usaron para transformar *E. coli* JM109, y luego se indujo la expresión por TTG de acuerdo con el manual de instrucciones de Qiagen. Como resultado se indujo la expresión de una banda de aproximadamente 95 kD con pSQE1/JM109, mientras que se indujo la expresión de una banda de aproximadamente 57 kD con pBQE1/JM109 (Fig. 7). Las células de *E. coli* se rompieron por tratamiento con ultrasonidos y se analizaron las actividades de LOX de los extractos enzimáticos en bruto. Como resultado se encontró alta actividad de LOX con pSQE1/JM109, mientras que no se encontró actividad de LOX con pBQE1/JM109 (Fig. 8). Estos resultados igualan perfectamente la actividad de LOX-1 y los resultados de los análisis de la proteína LOX-1 para plantas de SBOU2, lo que indica que la deficiencia en LOX-1 de SBOU2 puede ser reproducida en *E. coli*.

Ensayo de verificación 8

Ensayo de inserción con intercambio y expresión

A continuación, un fragmento *Pst*I-*Stu*I que contenía una mutación en sitio donador de empalme del 5º intrón de pBQE1 (el sitio *Stu*I está en las bases 1502-1507 de la SEQ ID NO: 10, y el sitio *Pst*I está en las bases 2048-2053 de la SEQ ID NO: 10) fue mutuamente intercambiado con el fragmento *Pst*I-*Stu*I de pSQE1 de tipo silvestre (pSQE1+BPS, pBQE1+SPS), y se indujo la expresión en *E. coli* del mismo modo descrito antes. Como resultado, con pSQE1+BPS/JM109 que tiene el fragmento *Pst*I-*Stu*I derivado de pBQE1 que contenía una mutación en el sitio donador de empalme del 5º intrón insertado en pSQE1, se indujo la expresión de una proteína de aproximadamente 57 kD (Fig. 7) y se perdió la actividad de LOX (Fig. 8), similar a pBQE1/JM109. Inversamente, con pBQE1+SPS/JM109 que tiene el fragmento *Pst*I-*Stu*I derivado de pSQE1 insertado en pBQE1, se restableció la expresión de una proteína de aproximadamente 95 kD (Fig. 7) y actividad de LOX (Fig. 8), similar a pSQE1/JM109. La secuencia de nucleótidos del fragmento *Pst*I-*Stu*I de pBQE1 era exactamente idéntica al gen de LOX-1 silvestre excepto el sitio donador de empalme del 5º intrón (G está sustituido por A en la base 1554ª de la SEQ ID NO: 10). Estos resultados demuestran claramente que la presencia o ausencia de la mutación en el sitio donador de empalme del 5º intrón de SBOU2 determina si está presente actividad de LOX-1.

ES 2 312 984 T3

Ensayo de verificación 9

Cartografiado y selección de una variedad híbrida de cebada utilizando la mutación en el 5° intrón

5 En la secuencia de nucleótidos de LOX-1 descrita, una secuencia que contiene el sitio donador de empalme del 5° intrón (nucleótidos 60-63 de SEQ ID NO: 1: 5'-GTAC-3') puede ser digerida por la enzima de restricción AfaI (o RsaI) que reconoce la secuencia GTAC. Se cartografió el gen deficiente en LOX-1 utilizando el hecho de que está presente una mutación en la secuencia de esta región en la línea SBOU2 (nucleótidos 60-63 de la SEQ ID NO: 2: 5'-ATAC-3') que impide la digestión por AfaI y/o RsaI (Fig. 5). Se extrajo DNA de las hojas de 144 individuos de un híbrido de la segunda generación filial (F2) de un cruce entre Kendall y la línea SBOU2 y se llevó a cabo la PCR utilizando dos cebadores diferentes (5'-CCATCACGCAGGGCATCCTG-3' (SEQ ID NO: 6), 5'-GCGTTGATGAGCGTCTGCCG-3' (SEQ ID NO: 7)) diseñados de manera que el fragmento amplificado pudiera contener el sitio AfaI. La PCR se llevó a cabo con reacción a 94°C, 1 min, 65°C, 2 min y 72°C, 3 min, repitiendo 31 veces, para luego realizar la reacción de extensión a 72°C, 7 min. Se escindió cada uno de los fragmentos amplificados con AfaI y se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 2,5% (en adelante este método se denomina "método AfaI"). Como resultado, fue posible distinguir fácilmente entre los tipos SBOU2, Kendall y heterogéneos (Fig. 9). Además del estudio del polimorfismo por el método AfaI, también se examinó el polimorfismo de cada variedad utilizando un marcador de DNA (JBC970) cerca del *locus* del gen LOXA del gen LOX-1 que lleva el cromosoma 4H de cebada (Fig. 10).

20 Se utilizó una semilla madura de cada uno de los individuos de F2 para examinar la actividad de LOX de las semillas. En el caso de las líneas que no exhibían actividad de LOX en absoluto, se midió la actividad utilizando varias semillas (4-7) (Fig. 10).

25 Como resultado del examen de los polimorfismos por el método AfaI de la generación F2 y la medición de la actividad de LOX de las semillas F3, la segregación del rasgo deficiente en LOX-1 coincidió perfectamente con la segregación del polimorfismo por el método AfaI. Por consiguiente, esta serie de análisis genéticos demostró claramente que el gen deficiente en LOX-1 de SBOU2 está en el *locus* del gen LOXA.

30 Los resultados también demostraron que el uso del método AfaI como ejemplo de un método de selección de cebada utilizando la mutación de DNA permite la selección de las líneas de progenie deficientes en LOX-1 en la etapa temprana de crecimiento de la cebada, eliminando la necesidad de esperar hasta que las semillas hayan madurado.

Ejemplo 1

35 *Examen de los polimorfismos AfaI de otras variedades de cebada*

Se utilizaron variedades/líneas de cebadas generales para el examen de los polimorfismos AfaI. Se utilizó un total de 32 variedades/líneas: Mikamo Golden, Golden Melon, Haruna Nijo, Myogi Nijo, Sakitama Nijo, Wasedori Nijo, Agurimochi, Harupin Nijo, Ryofu, Hokuiku 33, Hokuiku 35, Prior, Schooner, Sloop, Lofty Nijo, Franklin, Betzes, 40 Harrington, Manley, B1251, CDC Kendall, CDC Stratus, CDC Copeland, Hanna, Merit, AC Metcalfe, TR145, Chariot, Stirling, Proctor, Koral y Heartland. Como resultado del examen de polimorfismos por el método AfaI, se determinó que las variedades analizadas no eran el tipo SBOU2, sino que eran digeridas en el sitio de la enzima de restricción AfaI que contenía el sitio donador de empalme del 5° intrón (nucleótidos 60-63 de la SEQ ID NO: 1: 5'-GTAC-3') (Fig. 11). Esto indicó que estas líneas viables no poseían una mutación de DNA en el sitio AfaI (nucleótidos 60-63 de la SEQ ID NO: 1: 5'-GTAC-3') y, por lo tanto, que el método AfaI puede ser empleado con eficacia para la selección de genes deficientes en LOX-1 entre las líneas de la progenie.

Ejemplo 2

50 *Búsqueda de recursos génicos*

Se examinaron recursos génicos de cebada de todo el mundo (variedades de la tierra) conservados en la Universidad de Okayama por el método AfaI. Como resultado, se descubrieron cinco nuevas líneas (SBOU1, SBOU3, SBOU4, SBOU5 y SBOU6 conservados en la Universidad de Okayama) que no fueron digeridas en el sitio de la enzima de restricción AfaI que contenía el sitio donador de empalme del 5° intrón (nucleótidos 60-63 de la SEQ ID NO: 1: 5'-GTAC-3') (Fig. 12).

60 Se midió la actividad de LOX-1 de las semillas de estas líneas por el método descrito en la Ensayo de búsqueda 1. La medición de actividad, en el caso de SBOU5 y SBOU6, se llevó a cabo por reacción durante 5 minutos (Fig. 13A), mientras que la medición de actividad en SBOU1, SBOU3 y SBOU4 se realizó con un tiempo de reacción estimado de 90 minutos para una identificación clara de la actividad (Fig. 13B). Como resultado, no se encontró actividad significativa en ninguna de las líneas (Fig. 13).

65 Esto demostró claramente que así como SBOU2, SBOU1, SBOU3, SBOU4, SBOU5 y SBOU6 (el tipo de cebada SBOU2 deficiente en LOX-1) eran líneas de cebada deficientes en LOX-1. Puesto que todas las líneas eran *landrace* y no eran líneas que habían sido sometidas a mutagénesis, estas representan mutantes espontáneas del gen LOX-1.

ES 2 312 984 T3

Los resultados antes descritos demostraron que el método AfaI, como ejemplo de método de selección de cebada utilizando la mutación de DNA es una técnica que permite no sólo la selección de las líneas de progenie de la cebada deficientes en LOX-1, sino también una selección eficaz de la cebada deficiente en LOX-1 entre los recursos génicos.

5 Ejemplo 3

Cultivo de la cebada para elaboración de bebida de cebada de ensayo

10 Se cruzó una variedad de cebada, Taishomugi, con SBOU2 y la primera generación filial obtenida (F1) fue auto-polinizada para obtener una generación F2. El rasgo deficiente en LOX-1 fue confirmado por el método de medición de la actividad enzimática de LOX-1 descrito en el Ensayo de búsqueda 1 y el método AfaI descrito en el Ensayo de verificación 7 antes expuestos y se proporcionaron el grupo de líneas deficientes en LOX-1 y el grupo de líneas que retenían LOX-1 como poblaciones para la propagación de las semillas descrita a continuación.

15 Se llevó a cabo la propagación de las semillas de cada línea (población) utilizando una parcela uniforme o invernadero hasta obtener las semillas F4. Cuando se analizó la actividad de la enzima LOX-1 de las semillas F4, se encontró que se mantenían los rasgos de actividad de la LOX-1 respectiva de los individuos F2, indicando que el rasgo de deficiencia de LOX-1 se transmite a la progenie de forma estable.

20 Se utilizaron las semillas F4 para el siguiente ensayo de producción de malta y el ensayo de producción de bebidas alcohólicas de malta.

25 Ejemplo 4

Producción de la malta para la elaboración de ensayo

30 Se prepararon y utilizaron para el malteado una población F4 de cebada deficiente en LOX-1 (LOX-F4) que comprendía semillas de cebada sin actividad de LOX-1 y una población de cebada F4 que retenía actividad de LOX (LOX+F4) de semillas de cebada con LOX-1, ambas derivadas del cruce de Taishomugi x SBOU2.

35 El malteado se llevó a cabo utilizando un *Automatic Micromalting System* (Phoenix Systems) en condiciones de temperatura de maceración de 16°C durante un total de 82 horas (ciclo de 5 h HUMEDO/7 h SECO), germinación a 15°C durante 139 horas y secado en horno durante 29 horas (55°C durante 13,5 h, 65°C durante 8 h, 75°C durante 3,5 h, 83°C durante 4 h).

Ejemplo 5

40 *Análisis de la malta y el mosto congreso*

La malta se analizó de acuerdo con el método estándar de EBC (European Brewery Convención ed., Analytica EBC (4th Ed.), 1987). Como resultado, no se encontró diferencia significativa en valores analíticos de malta entre las maltas que empleaban LOX-F4 y LOX+F4, lo que demostró que se las puede utilizar para la elaboración de bebidas alcohólicas de malta con el fin de comparar la presencia o ausencia de actividad de LOX-1 (Fig. 14).

A continuación, se utilizaron 50 g de la malta para producir mosto por el Método Congreso (European Brewery Convención ed., Analytica EBC (4th Ed.), 1987) y se analizó la oxidación de los lípidos en el mosto congreso.

50 En primer lugar, se midió la cantidad de trans-2-nonenal en el mosto congreso por el siguiente método. Se colocó una muestra de mosto de 8 ml en un vial, se añadieron 3 g de NaCl y se tapó el vial. A continuación, se insertó una fibra de polidimetilsiloxano SPME (Supelco, Inc.) en el espacio de cabeza del vial y se incubó el vial a 40°C durante 15 minutos.

55 Luego se insertó la fibra en un orificio de inyección de un equipo de cromatografía de gases/espectrometría de masas equipado con una columna J&W DB-1 como columna capilar (30 m x 0,25 mm, espesor de la película: 1 µm). Se empleó helio como gas portador (1 ml/min) y las condiciones del horno eran 60°C a 225°C (5°C/min) en el modo de ion seleccionado (m/z: 70). La cuantificación se realizó por el método de adición estándar utilizando trans-2-nonenal (Sigma) como muestra estándar.

60 Como resultado, las concentraciones de trans-2-nonenal de los mostos de tipo congreso producidos utilizando LOX-F4 y LOX+F4 fueron 0,36 ppm y 3,85 ppm, respectivamente. De esa manera se demostró que la producción de mosto utilizando la malta de acuerdo con la presente invención permite que se inhiba la producción de trans-2-nonenal en tanto como la décima parte o menos de la malta convencional.

65 Se midió el potencial de nonenal del mosto congreso mediante el siguiente método: En primer lugar, se hirvió el mosto congreso durante 2 horas según el método de Drost *et al.*, (Drost, B.W., Van der Berg, R., Freijee, F.J.M., Van der Velde, E.G. y Hollemans M., *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 48, 124-131, 1990). Luego se midió la cantidad de trans-2-

nonenal en la mezcla por el método de medición de trans-2-nonenal antes descrito y se calculó el potencial de nonenal del mosto congreso.

Como resultado, los potenciales de nonenal de los mostos de tipo congreso producidos con el uso de LOX-F y LOX+F4 fueron 2,74 ppm y 11,9 ppm, respectivamente. Puesto que el potencial de nonenal se conoce como índice del envejecimiento del producto (Drost, B.W. *et al.*, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 48, 124-131, 1990; Ueda *et al.* (2001) *EBC-Proceedings 55*:p3 28th Congress), la malta producida a partir de la cebada de acuerdo con la presente invención puede ser utilizada para la elaboración de bebidas de malta para mejorar significativamente la estabilidad del sabor de las bebidas alcohólicas de malta.

En la Fig. 15 se muestran las concentraciones de trans-2-nonenal y los potenciales de nonenal de los mostos de tipo congreso producidos utilizando LOX-F4 en comparación con los de los mostos de tipo congreso producidos utilizando la malta existente en el comercio. Como es claro de los resultados expuestos en la Fig. 15, los mostos de la presente invención exhibieron valores que no se podían alcanzar con la cebada convencional.

Esos resultados demostraron que el uso de la cebada de acuerdo con la presente invención permite la producción de malta con nivel de calidad superior que no exhibían los productos convencionales.

Las concentraciones de THOD de los mostos de tipo congreso se determinaron por análisis de cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas (HPLC-MS). Las condiciones de HPLC fueron las siguientes: El caudal de la fase móvil era 0,3 ml/min, utilizando una solución mixta de ácido acético al 0,5% (solución A) y acetonitrilo (solución B) como fase móvil, con un gradiente de solución A:solución B = 35:65 (0 min) a solución A:solución B = 5:95 (30 min). La columna empleada fue una columna Waters Asymmetry (N° 106005; C18, 3,5 μ m; 2,1 x 150 mm), la temperatura de la columna fue 50°C y se utilizó un sistema HPLC Modelo 1100 (Hewlett-Packard) para la separación de 5 μ l de muestra de mosto o bebida alcohólica de malta. Se realizó el análisis de masas empleando una columna Waters ZQ, con monitorización de masa 329 en módulo de ionización negativa ES. La solución patrón de THOD empleada era una muestra de extracto de cerveza (Kobayashi, N., *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* 90, 69-73, 2000).

Como resultado, las concentraciones de THOD del mosto congreso producido usando LOX-F4 y LOX+F4 fueron 6,5 ppm y 14,7 ppm, respectivamente, demostrando así que la producción de mosto usando la malta de acuerdo con la presente invención puede inhibir la concentración de THOD del mosto a la mitad o menos.

Como se mencionó anteriormente, el THOD se produce por la conversión del ácido linoleico por la acción de la LOX-1 de malta y la actividad de peroxigenasa de la malta en la etapa de braceado, pero puesto que se piensa que la actividad de peroxigenasa de la malta es la etapa limitante de la velocidad para la producción de THOD (Kuroda, H. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* 93, 73-77, 2002), no resultaba claro hasta qué punto la actividad de LOX-1 de malta reducida inhibe la producción de THOD. Sin embargo, los resultados de los ejemplos presentados en la presente memoria descriptiva han demostrado que el uso de la malta producida a partir de las semillas de cebada sin actividad de LOX-1 reduce la concentración de THOD en el mosto. Puesto el THOD sobrevive al producto final sin ser metabolizado por la levadura (Kobayashi, N., *et al.*, *J. Inst. Brew.* 106, 107-110 (2000)), el uso de la malta derivada de la cebada de acuerdo con la presente invención puede dar lugar claramente a la producción de bebidas alcohólicas de malta con buena calidad de sabor y calidad de espuma.

Ejemplo 6

Ensayo de elaboración de bebidas alcohólicas de malta

1. Producción y análisis de mosto

Se bracearon la malta de LOX-F4 y la malta de LOX+F4 obtenidas en el Ejemplo 4 anterior con un aparato de braceado a escala de 50 litros de acuerdo con los métodos de braceados estándares para la bebida alcohólica debajo contenido en malta espumante Happoshu (contenido de malta: 24%). Las condiciones de braceado fueron las siguientes.

Se bracearon 1,5 kg de cada malta sola con 15 litros de agua de braceado de acuerdo con un diagrama de 50°C durante 20 min, 65°C durante 30 min y 75°C durante 3 min. Después del malteado, se llevó a cabo la clarificación del mosto con un tonel de clarificación. Se obtuvieron 35 litros de mostos clarificados.

Antes de la ebullición, se mezcló el mosto clarificado con 5 kg de jarabe de almidón (75% de sacáridos). Se añadieron 13 g de pelets de lúpulo (unidad de amargor: 87,0 BU (EBC)) al mosto. Después de 70 minutos de ebullición, se enfrió el mosto hervido a 10°C. El contenido de extracto de los mostos enfriados se ajustó a 11,6-11,8% por adición de agua.

Los mostos obtenidos fueron analizados de acuerdo con el Método estándar de la EBC [(*European Brewery Convention* (Convención Europea de Cerveceros) Ed. Analytica EBC (4th Ed), 1987)]. Los valores del análisis están recogidos en la Tabla 1. Como se aprecia en la Tabla 1, no se encontraron diferencias marcadas entre LOX-F4 y LOX+F4 con respecto a los parámetros.

ES 2 312 984 T3

TABLA 1

Variedad	LOX+F4	LOX-F4
Densidad relativa	1,0475	1,0467
Extracto (%)	11,78	11,60
Extracto sin fermentar real (%)	3,45	3,38
Atenuación real (%)	70,7	70,9
Extracto sin fermentar aparente (%)	1,54	1,52
Límite de atenuación aparente (%)	86,9	86,9
pH	5,08	5,93
Color (°EBC)	2,1	2,1
BU	31,2	27,3
Nitrógeno total (mg/100 ml)	24	22
Polifenol (mg/l)	44	48
FAN (mg/l)	46	51

2. Producción de la bebida alcohólica de malta (*Happoshu*, bebida alcohólica con bajo contenido de malta)

El mosto obtenido anteriormente en el apartado 1 anterior se transfirió a un depósito cilíndrico-cónico a escala de 30 litros y luego se añadió levadura a una concentración inicial de 30 millones de células/ml para la fermentación principal a 13°C. Cuando el contenido del extracto en el líquido de fermentación cayó a 2,5%, se transfirió a un nuevo depósito similar para la etapa de conservación. La etapa de conservación se llevó a cabo a 13°C durante los primeros 6 días y luego a 0°C durante las 2 semanas posteriores.

Una vez concluida la etapa de conservación, se introdujo el líquido de fermentación en un aparato de filtración y llenado de cerveza. Luego la bebida alcohólica de malta se filtró y envasó en botellas.

3. Análisis de la bebida alcohólica de malta

La bebida alcohólica de malta obtenida en el apartado 2, precedente se analizó como sigue.

El análisis de acuerdo con el método estándar de la EBC no encontró diferencias significativas entre LOX-F4 y LOX+F4 en términos de parámetros de análisis general distintos de los parámetros de oxidación de lípidos (Tabla 2).

TABLA 2

Variedad	LOX+F4	LOX-F4
Densidad relativa	1,00562	1,00565
Extracto de mosto original (%)	11,82	11,56
Extracto real (%)	3,43	3,38
Atenuación real (%)	71	70,7
Extracto aparente (%)	1,44	1,45
Atenuación aparente (%)	87,8	87,4
Alcohol (% en vol)	5,5	5,35
Alcohol (% p/p)	4,33	4,21
pH	3,51	3,28
Presión de gas (20°C) (kg/cm ²)	2,35	2,55
Color (°EBC)	1,5	1,7
Nitrógeno total (mg/100 ml)	16	19
BU	11,6	9,5
Polifenol (mg/l)	45	43
FAN (mg/l)	10	12

ES 2 312 984 T3

La estabilidad de la espuma de la bebida alcohólica de malta obtenida en 2 precedentemente se analizó por el siguiente método.

El análisis de la estabilidad de la espuma se llevó a cabo por el método NIBEM. Después del análisis de la estabilidad de la espuma empleando un Analizador de la Estabilidad de Espuma Haffman (Tabla 3), la cebada LOX-F4 tenía claramente mayor estabilidad de la espuma, con un valor NIBEM de 21 puntos más que la cebada de LOX+F4.

Además, como resultado de la medición de la concentración de THOD por el método descrito en el Ejemplo 5 anterior, el contenido de THOD de LOX-F4 exhibió una reducción a menos de la mitad de la correspondiente a LOX+F4 (Tabla 3).

Estos resultados demostraron claramente que las bebidas alcohólicas de malta producidas por el método de producción de la presente invención permiten producir la bebida alcohólica de malta con contenido reducido de THOD y mejor retención de espuma.

TABLA 3

Variedad	LOX+F4	LOX-F4
NIBEM	239	260
THOD (mg/l)	3,6	1,7

Luego se sometió la bebida alcohólica de malta obtenida en el apartado anterior 2 al siguiente ensayo realizado por 13 catadores para comparar la estabilidad del sabor.

En primer lugar, se conservaron las bebidas alcohólicas de malta LOX-F4 y LOX+F4 a 37°C durante una semana. Luego se las vertió en copas a la temperatura normal de consumo y se las presentó a los catadores del ensayo sensorial para la evaluación de sabor desagradable y ranciedad total en una escala de 0-4 (en la que un valor más elevado representaba el envejecimiento progresivo) (Tablas 4A, B).

Como resultado, 10 de los 13 catadores asignaron menores puntuaciones a LOX-F4 en cuanto al sabor desagradable y, por lo tanto, LOX-F4 exhibió una puntuación menor (valor medio) que LOX+F4. Se determinó que la diferencia de acuerdo con una ensayo t pareado era significativa al nivel de probabilidad de 5% (Tabla 4A).

En cuanto a la ranciedad total, 11 de los 13 catadores asignaron puntuaciones menores a LOX-F4 y, por lo tanto, LOX-F4 exhibió una puntuación menor (valor medio) que LOX+F4. Se determinó que la diferencia de acuerdo con una ensayo t pareado era significativa al nivel de probabilidad de 5% (Tabla 4B).

El ensayo sensorial anterior y el análisis estadístico demostraron que LOX-F4 tenía menos sabor desagradable y ranciedad total que LOX+F4.

TABLA 4A

Sabor desagradable	LOX+F4	LOX-F4
Catador 1	3	2
Catador 2	1	2
Catador 3	3	2
Catador 4	2,5	2,5
Catador 5	2	2
Catador 6	2,5	2
Catador 7	2,5	1,5
Catador 8	2,5	1
Catador 9	1	0,5
Catador 10	2,5	2
Catador 11	2	1,5
Catador 12	2,5	2
Catador 13	2	1,5
Valor medio	2,2	1,7

ES 2 312 984 T3

TABLA 4B

Ranciedad total	LOX+F4	LOX-F4
Catador 1	2,5	2
Catador 2	1	2
Catador 3	3	2
Catador 4	3	2,5
Catador 5	2,5	2
Catador 6	2,5	2
Catador 7	2,5	1,5
Catador 8	2,5	1,5
Catador 9	1	0,5
Catador 10	2,5	2
Catador 11	2	1,5
Catador 12	2,5	2,5
Catador 13	2	1,5
Valor medio	2,3	1,8

Como resultado de la medición del contenido de trans-2-nonenal de la bebida alcohólica de malta obtenida en el punto 2 anterior, LOX-F4 tenía un menor contenido de trans-2-nonenal que LOX+F4 antes y después de la conservación a 37°C durante una semana. El contenido de trans-2-nonenal de LOX-F4 se redujo a aproximadamente un tercio en comparación con el de LOX+F4 después de la conservación (Tabla 5).

TABLA 5

Concentración de trans-2-nonenal	LOX+F4	LOX-F4
Antes de la conservación	0,02	0,014
Después de la conservación	0,35	0,12

Unidad: ppm

Estos resultados del ensayo sensorial y los resultados del análisis del contenido de trans-2-nonenal en las bebidas alcohólicas de malta demostraron que el método de producción de bebidas alcohólicas de malta de la presente invención permite la producción de bebidas alcohólicas de malta con estabilidad de sabor mejorada.

Por último, el cuerpo y la suavidad de la bebida alcohólica de malta obtenida en el apartado 2 anterior fueron analizados por un ensayo sensorial con un sensor de membrana lipídica.

En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo sensorial con 13 catadores expertos para la comparación de la calidad del sabor. Se ofrecieron bebidas alcohólicas de malta LOX-F4 y LOX+F4 para el ensayo sensorial, y se evaluaron el cuerpo y la suavidad en una escala de 0-4 (donde las puntuaciones más elevadas correspondían a cuerpo más completo y mejor suavidad (Tabla 6).

En cuanto al cuerpo, no se encontró diferencia significativa (nivel de probabilidades de 5%) entre LOX-F4 y LOX+F4 (Tabla 6A).

Con respecto a la suavidad, 8 de los 13 catadores asignaron puntuaciones más altas a LOX-F4 (Tabla 6B). LOX-F4 tuvo una puntuación más alta (valor medio) que LOX+F4 y se determinó que la diferencia de acuerdo con el ensayo t pareado era significativa en el nivel de probabilidad del 5%.

Estos resultados demostraron que la elaboración de bebidas alcohólicas de malta utilizando LOX-F4 puede mejorar la suavidad sin afectar el cuerpo.

ES 2 312 984 T3

TABLA 6A

Cuerpo	LOX+F4	LOX-F4
Catador 1	2	1
Catador 2	3	2
Catador 3	3	2,5
Catador 4	3,5	3,5
Catador 5	3	3
Catador 6	2	2
Catador 7	2	2
Catador 8	3	2
Catador 9	3	2
Catador 10	2,5	2,5
Catador 11	3	2
Catador 12	2	3
Catador 13	2	3
Promedio	2,6	2,3

TABLA 6B

Suavidad	LOX+F4	LOX-F4
Catador 1	1	2
Catador 2	1	3
Catador 3	1,5	3
Catador 4	3	3
Catador 5	1	1
Catador 6	2	2
Catador 7	2	3
Catador 8	1,5	3
Catador 9	1	2
Catador 10	1,5	2
Catador 11	2	3
Catador 12	3	2
Catador 13	3	2
Promedio	1,8	2,4

También se evaluaron el cuerpo y la suavidad utilizando un sensor de membrana lipídica de acuerdo con el método de Kaneda *et al.*, (Kaneda, H. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* 92, 221-226, 2001) (Tabla 7).

Se evaluó el cuerpo basándose en la adsorción en la membrana lipídica y los resultados no arrojaron diferencias significativas (nivel de probabilidad del 5%) entre la adsorción con LOX-F4 y LOX+F4 (Tabla 7A).

La suavidad se evaluó basándose en la duración de la absorción en la membrana lipídica (donde una mayor duración de la adsorción indicaba peor suavidad) y LOX-F4 exhibió un residuo de aproximadamente la cuarta parte en comparación con LOX+F4, con una diferencia significativa en el nivel de probabilidad del 1% (Tabla 7B).

ES 2 312 984 T3

TABLA 7A

Cuerpo	Adsorción	D.S.
LOX+F4	189	4
LOX-F4	187	3

(Unidad: Hz)

(Sin diferencia significativa en el nivel de probabilidad del 5%)

TABLA 7B

Suavidad	Residuo	D.S.
LOX+F4	12	3
LOX-F4	3	3

(Unidad: Hz)

(Diferencias significativas en el nivel de probabilidad del 1%).

Hasta ahora no se había encontrado ninguna correlación entre la actividad de LOX-1 de la cebada y los niveles de producción de THOD en las etapas de braceado (Kobayashi, N., *et al.*, (2000) *J. Biosci. Bioeng.* 90, 69-73), y no resultaba claro en qué medida se reduce la producción de THOD por la inhibición de la LOX-1 de la cebada. Más aún, no había sido posible en la técnica anterior predecir si se puede mejorar la suavidad como resultado de dicha inhibición de la LOX-1 de la cebada. Sin embargo, los resultados de los ensayos sensoriales y los análisis del cuerpo y suavidad del producto utilizando un sensor de membrana lipídica en los ejemplos descritos en la presente memoria descriptiva han demostrado, por primera vez, que se puede utilizar la cebada que contiene el gen reivindicado en la presente para mejorar la suavidad del producto sin afectar al cuerpo de dicho producto.

Ejemplo 7

Elaboración de ensayo de bebidas alcohólicas de malta usando cebada procesada

1. Producción y análisis de mosto

Usando cebada procesada de LOX-F5 y LOX+F5, las siguientes generaciones de las líneas de obtenidas en el Ejemplo 3 anterior, se llevó a cabo un braceado aditivo con un aparato de braceado a escala de 50 litros de acuerdo con los métodos de braceado estándares para Happoshu, bebida alcohólica de bajo contenido en malta (contenido en malta: 24%, contenido en cebada procesada: 76%). Las condiciones fueron como sigue.

1,2 kg de una malta comercialmente disponible para la cerveza y 38 kg de cada cebada procesada se bracearon con 20 litros de agua de braceado de acuerdo con un diagrama de 50°C durante 30 minutos, 65°C durante 60 minutos y 75°C durante 3 minutos (se añadieron enzimas, tales como α -amilasa y β -glucanasa debido al alto contenido de cebada procesada). Después del braceado, se llevó a cabo la clarificación del mosto con un tonel de clarificación. Se obtuvieron 40 litros de mostos clarificados.

Se añadieron 53 g de pellets de lúpulo (unidad de amargor: 25,6 BU (EBC)) a los mostos clarificados obtenidos. Después de ebullición durante 80 minutos, el mosto hervido se enfrió a 10°C. Los contenidos de extracto de los mostos se ajustaron por adición de agua hasta 7,5-7,6%.

Los mostos obtenidos se analizaron de acuerdo con el método estándar de EBC. Los valores del análisis se muestran en la Tabla 8. Como puede verse en la Tabla 8, no se encontraron diferencias distintas entre LOX-F5 y LOX+F5 con respecto a los parámetros.

ES 2 312 984 T3

TABLA 8

Variedad	LOX+F5	LOX-F5
Densidad relativa	1,0303	1,0296
Extracto (%)	7,63	7,46
Extracto no fermentado real (%)	2,00	2,06
Atenuación real (%)	73,8	72,4
Extracto no fermentado aparente (%)	0,67	0,71
Límite de atenuación aparente (%)	91,2	90,5
pH	5,69	5,71
Color (°EBC)	5,7	6,5
BU	31,7	30,9
Nitrógeno total (mg/100 ml)	45	47
Polifenol (mg/l)	159	137
FAN (mg/l)	72	72

2. Producción de bebida alcohólica de malta (*Happoshu*, bebida alcohólica de bajo contenido en malta)

El mosto obtenido en 1 anteriormente se transfirió a un depósito cilindro-cónico a escala de 30 litros, y luego se añadió levadura a una concentración inicial de 30 millones de células/ml para la fermentación principal a 15°C. Cuando el contenido de extracto en el líquido de fermentación cayó a 1,3%, se transfirió a un nuevo depósito similar para una etapa de conservación. La etapa de conservación se llevó a cabo a 13°C durante los primeros 5 días y luego a 0°C durante las 2 semanas siguientes.

Tras acabar la etapa de conservación, el líquido de fermentación se suministró a un aparato de filtración y llenado de cerveza. La bebida alcohólica de malta se filtró y envasó en botellas.

3. Análisis de la bebida de malta alcohólica

La bebida de malta alcohólica obtenida en 2 anteriormente se analizó como sigue.

El análisis de acuerdo con el método estándar de EBC muestra que no se encontraron diferencias significativas entre LOX-F5 y LOX+F5 en términos de los parámetros del análisis general distintos de los parámetros de la oxidación de lípidos (Tabla 9).

TABLA 9

Variedad	LOX+F5	LOX-F5
Densidad relativa	1,00307	1,00338
Extracto de mosto original (%)	7,77	7,60
Extracto real (%)	2,11	2,14
Atenuación real (%)	73,7	72,7
Extracto aparente (%)	0,79	0,87
Atenuación aparente (%)	89,9	88,6
Alcohol (% en vol)	3,62	3,49
Alcohol (% en p/p)	2,86	2,75
pH	4,58	4,59
Presión de gas (Kg/cm ²)	2,99	2,38
Color (°EBC)	4,0	4,2
Nitrógeno total (mg/100 ml)	28	27
BU	16,8	15,3
Polifenol (mg/l)	111	91
FAN (mg/l)	16	16

ES 2 312 984 T3

La estabilidad de espuma de la bebida de alcohólica de malta obtenida en 2 se analizó por el método siguiente.

El análisis de estabilidad de la espuma se realizó por el método NIBEM. Por el análisis de estabilidad de la espuma usando un aparato de ensayo de Estabilidad de la espuma Haffmans (Tabla 10), la cebada de LOX-F5 tenía claramente superior estabilidad de la espuma, con un valor NIBEM de 17 puntos más que la cebada de LOX+F5.

También como resultado de medir la concentración de THOD por el método descrito en el Ejemplo 5 anterior, el contenido de THOD en la bebida alcohólica de malta de LOX-F5 exhibió una reducción hasta menos de la mitad del valor de la LOX+F5.

Estos resultados demuestran claramente que el método de producción de bebida alcohólica de malta de la invención permite producir la bebida alcohólica de malta con contenido de THOD reducido y retención de espuma mejorada.

TABLA 10

Variedad	LOX+F5	LOX-F5
NIBEM	279	296
THOD (mg/l)	728	237

Los valores de THOD indican los valores relativos, en donde las áreas de los picos de los patrones internos son 100.

La bebida alcohólica de malta obtenida en 2 anteriormente se sometió luego al siguiente ensayo sensorial por 13 catadores para comparación de la estabilidad del sabor. El método específico del ensayo sensorial es el mismo que el descrito en el Ejemplo 6.

Como resultado, 11 de los 13 catadores asignaron puntuaciones inferiores a LOX-F5 para el sabor desagradable, y por lo tanto LOX-F5 exhibió una puntuación inferior (valor medio) que LOX+F5. La diferencia de acuerdo con un ensayo t pareado se determinó que era significativa en una probabilidad de 5% (Tabla 11A).

Para la ranciedad total, 12 de los 13 catadores asignaron puntuaciones inferiores a LOX-F5, y por tanto LOX-F5 exhibió una puntuación inferior (valor medio) que LOX+F5. La diferencia de acuerdo con un ensayo t pareado se determinó que era significativa a un nivel de probabilidad de 5% (Tabla 11B).

El ensayo sensorial y el análisis estadístico demostraron que LOX-F5 tenía un valor inferior del sabor desagradable y de la ranciedad total que LOX+F5.

TABLA 11A

Sabor desagradable	LOX+F5	LOX-F5
Catador 1	2	5
Catador 2	3	2
Catador 3	3	2
Catador 4	2	1,5
Catador 5	3	2
Catador 6	2	1
Catador 7	2,5	3
Catador 8	2	1
Catador 9	2,5	2
Catador 10	2	1
Catador 11	3	2
Catador 12	2,5	1,5
Catador 13	2	3
Valor medio	2,4	1,8

ES 2 312 984 T3

TABLA 11B

Ranciedad total	LOX+F5	LOX-F5
Catador 1	2	1,5
Catador 2	3	1
Catador 3	3,5	1,5
Catador 4	2	1,5
Catador 5	3	2
Catador 6	2	1
Catador 7	2,5	3
Catador 8	2	1
Catador 9	3	2
Catador 10	2	1
Catador 11	3	2
Catador 12	2,5	1,5
Catador 13	3	1,5
Valor medio	2,6	1,6

Como resultado de medir el contenido de trans-2-nonenal de la bebida alcohólica de malta obtenida en 2 anteriormente, antes y después de la conservación a 37°C durante un semana, LOX-F5 tenía un contenido similar de trans-2-nonenal al de LOX+F5 antes de la conservación. El contenido de trans-2-nonenal de LOX-F5 se redujo a aproximadamente la mitad comparado con el de LOX+F5 después de la conservación (Tabla 12).

TABLA 12

Concentración de trans-2-nonenal	LOX+F5	LOX-F5
Antes de la conservación	0,06	0,06
Después de la conservación	0,16	0,09

Ejemplo 8

Elaboración de ensayo de bebidas alcohólicas de malta

1. Producción y análisis de mosto

La malta de LOX-F4 y la malta de LOX+F4 obtenidas por el mismo método que el descrito en el Ejemplo 4 anterior se bracearon con un aparato a escala de 50 litros de acuerdo con los métodos de braceado estándares para cerveza (contenido de malta: 71%). las condiciones de braceado fueron como sigue.

5,0 kg de la malta de ensayo anterior y 2,0 kg de material aditivo (almidón de maíz, sémola de maíz y arroz triturado) se bracearon con 23 litros de agua de braceado de acuerdo con un diagrama de 50°C durante 20 minutos, 65°C durante 40 minutos y 75°C durante 3 minutos. Después de bracear, se llevó a cabo la clarificación del mosto con un tonel de clarificación. Se obtuvieron 40 litros de mostos clarificados.

Se añadieron 40 g de pelets de lúpulo (unidad de amargor: 44.9 BU (EBC)) a los mostos clarificados obtenidos. Después de hervir durante 90 minutos, el mosto hervido se enfrió a 10°C. El contenido de extracto de los mostos enfriados se ajustó por adición de agua a 10,8-11.1%.

Los mostos obtenidos se analizaron de acuerdo con el método estándar de EBC. Los valores del análisis se muestran en la Tabla 13. Como se ve en la Tabla 13, no se encontró una diferencia significativa entre LOX-F4 y LOX+F4 con respecto a los parámetros.

ES 2 312 984 T3

TABLA 13

Variedad	LOX+F4	LOX-F4
Densidad relativa	1,0444	1,0433
Extracto (%)	11,05	10,79
Extracto no fermentado real (%)	3,05	3,05
Atenuación real (%)	72,4	71,7
Extracto no fermentado aparente (%)	1,25	1,31
Límite de atenuación aparente (%)	88,7	87,9
pH	5,71	5,68
Color (°EBC)6,3	6,3	6,5
BU	38,0	38,2
Nitrógeno total (mg/100 ml)	77	78
Polifenol (mg/l)	150	147
FAN (mg/l)	153	148

2. Producción de bebida alcohólica de malta (cerveza)

El mosto obtenido en 1 anterior se transfirió a un depósito cilindro-cónico esterilizado con vapor de agua a escala de 30 litros, y luego se añadió levadura a una concentración inicial de 15 millones de células/ml para la fermentación principal a 10,5°C. Cuando el contenido de extracto en el líquido de fermentación cayó a 2,5%, se transfirió a un nuevo depósito similar para una nueva etapa de conservación. La etapa de conservación se llevó a cabo a 8°C durante los primeros 8 días y luego a 0°C durante 2 semanas más.

Tras terminar la etapa de conservación, el líquido de fermentación se suministró a un aparato de filtración y envasado de cerveza. La bebida alcohólica de malta se filtró y envasó en botellas.

3. Análisis de la bebida alcohólica de malta

La estabilidad de la espuma de la bebida alcohólica de malta obtenida en 2 anterior se analizó por el método siguiente. El análisis de estabilidad de la espuma se realizó por el método NIBEM. Tras el análisis de la estabilidad de la espuma usando un aparato de ensayo de estabilidad de la espuma Haffinans (Tabla 14), la cebada de LOX-F4 tenía claramente mayor estabilidad, con un valor NIBEM de 30 puntos más que la cebada de LOX+F4.

También, como resultado de medir la concentración de THOD por el método descrito en el Ejemplo 5 anterior, el contenido de THOD de la bebida de malta alcohólica de LOX-F4 exhibió una reducción a menos de la mitad del correspondiente a LOX+F4.

Estos resultados demuestran claramente que el método de producción de bebidas de alcohólicas de malta de la invención permite producir la bebida alcohólica de malta con un contenido reducido de THOD y retención de espuma mejorada.

TABLA 14

Variedad	LOX+F4	LOX-F4
NIBEM	273	303
THOD (relación de área de pico)	499	221

Los valores de THOD indican los valores relativos, donde las áreas de los picos de los patrones internos son 100.

La bebida alcohólica de malta obtenida en 2 anteriormente se sometió luego al siguiente ensayo sensorial por 13 catadores para la comparación de la estabilidad del sabor. El método específico del ensayo sensorial es el mismo que el descrito en el Ejemplo 6.

ES 2 312 984 T3

Como resultado, 11 de los 13 catadores asignaron puntuaciones inferiores a LOX-F4 en cuanto a sabor desagradable, y por tanto la LOX-F4 exhibió una puntuación inferior (valores medios) a la LOX+F4. La diferencia de acuerdo con un ensayo t pareado se determinó que era significativa a una probabilidad de 5% (Tabla 15A).

5 Para la ranciedad total, 12 de los 13 catadores asignaron puntuaciones inferiores a LOX-F4, y por lo tanto LOX-F4 exhibió una puntuación inferior (valor medio) a la LOX+F4. La diferencia de acuerdo con el ensayo t pareado se determinó que era significativa a un nivel de probabilidad de 5% (Tabla 15B).

10 El ensayo sensorial anterior y el análisis estadístico demostró que LOX-F4 tenía menores sabor desagradable y ranciedad total que LOX+F4.

TABLA 15A

Sabor desagradable	LOX+F4	LOX-F4
Catador 1	2,3	2
Catador 2	3	3,5
Catador 3	3,5	2
Catador 4	2,5	2
Catador 5	1,5	1
Catador 6	3	1
Catador 7	2,5	3
Catador 8	3	2
Catador 9	2	1,5
Catador 10	2	1
Catador 11	3	1,5
Catador 12	1,5	1
Catador 13	2	1
Valor medio	2,5	1,7

TABLA 15B

Ranciedad total	LOX+F4	LOX-F4
Catador 1	3	2
Catador 2	3	3,5
Catador 3	3	1,5
Catador 4	2,5	2
Catador 5	1,5	1
Catador 6	3	1
Catador 7	3	2,5
Catador 8	3	2
Catador 9	2	1
Catador 10	2	1
Catador 11	3	1
Catador 12	1,5	1
Catador 13	2	1
Valor medio	2,5	1,6

65 Estos resultados del ensayo sensorial y los resultados del análisis del contenido de trans-2-nonenal en las bebidas alcohólicas de malta demostraron que el método de producción de las bebidas alcohólicas de malta de la invención permite producir bebidas alcohólicas de malta con estabilidad de sabor mejorada.

ES 2 312 984 T3

Aplicabilidad industrial

Es posible producir un gen LOX-1 mutante ventajoso para la producción de bebidas alcohólicas de malta que exhiben estabilidad del sabor y estabilidad de la espuma mejoradas sin manipulación génica, un método de selección de la cebada deficiente en LOX-1, materiales para bebidas alcohólicas de malta derivados de la cebada obtenidos por el método de selección y un método para la producción de bebidas alcohólicas de malta usando los materiales para bebidas alcohólicas de malta.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un gen mutante de lipoxigenasa-1 de cebada, en donde la guanina del sitio donador de empalme (5'-GT-3') del 5° intrón del gen de lipoxigenasa-1 de la cebada está mutada a una base diferente.
2. Un gen mutante de lipoxigenasa-1 de cebada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la base diferente es adenina.
- 10 3. Un método de selección para cebada deficiente en lipoxigenasa-1 de cebada, que comprende una etapa de distinguir la cebada deficiente en lipoxigenasa-1 de cebada comprobando sí o no la guanina del sitio donador de empalme del 5° intrón del gen de lipoxigenasa-1 de cebada está mutada a una base diferente.
- 15 4. Un método de selección de cebada deficiente en lipoxigenasa-1 de la cebada de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la base diferente es adenina.
- 20 5. Un método de selección de cebada deficiente en lipoxigenasa-1 de cebada de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, que comprende:
una etapa de extracción de DNA genómico en donde el DNA genómico se extrae de una muestra de cebada,
una etapa de amplificación de un fragmento de DNA en donde, a partir del DNA genómico extraído, se amplifica un fragmento de DNA que contiene el sitio donador de empalme del 5° intrón del gen de lipoxigenasa-1 de cebada y
25 una etapa de detección del fragmento de DNA en donde, se escinde con una enzima de restricción, el fragmento de DNA que contiene el sitio donador de empalme del 5° intrón del gen lipoxigenasa-1 de cebada amplificado en la etapa de amplificación de un fragmento de DNA, se detecta el fragmento de DNA que tiene el número de bases prescrito y se diferencia la cebada deficiente en lipoxigenasa-1 de cebada comprobando sí o no la guanina situada en el sitio donador de empalme está mutada a una base diferente.
- 30 6. Un método de selección de cebada deficiente en lipoxigenasa-1 de cebada de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enzima de restricción utilizada en la etapa de detección de fragmentos de DNA es AfaI y/o RsaI, que reconocen la secuencia de nucleótidos 5'-GTAC-3'.
- 35 7. Un material para bebidas alcohólicas de malta, en donde el material se selecciona del grupo que consiste en una semilla, una malta, un extracto de malta, un producto de descomposición de la cebada o un derivado de cebada procesada, derivado de una cebada que contiene un gen mutante de lipoxigenasa-1 de la cebada de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha cebada es completamente deficiente en actividad de LOX-1.
- 40 8. Un material para bebidas alcohólicas de malta, en donde el material se selecciona del grupo que consiste en una semilla, una malta, un extracto de malta, un producto de descomposición de cebada o un derivado de cebada procesada, de cebada seleccionada por un método de selección de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicha cebada es completamente deficiente en actividad de LOX-1.
- 45 9. Un método para la producción de bebidas alcohólicas de malta, **caracterizado** por utilizar un material para bebidas alcohólicas de malta de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
- 50 10. Un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos desde la posición 1 hasta 1554 como se expone en la SEQ ID NO: 10.
11. Un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que se expone en la SEQ ID NO: 11.
12. Un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de 10 a 60 bases continuas, incluyendo la base 3178^a en la secuencia de nucleótidos que se expone en la SEQ ID NO: 11.
- 55 13. Un método para detectar la ausencia de actividad de LOX-1 en cebada, que comprende:
una etapa de aislar un DNA genómico de una muestra de cebada, y
60 una etapa de detectar la base 3178^a de la secuencia de nucleótidos que se expone en la SEQ ID NO: 11, en donde la presencia de la base es un indicador de la ausencia de actividad de LOX-1 en la cebada.
- 65

Fig.1

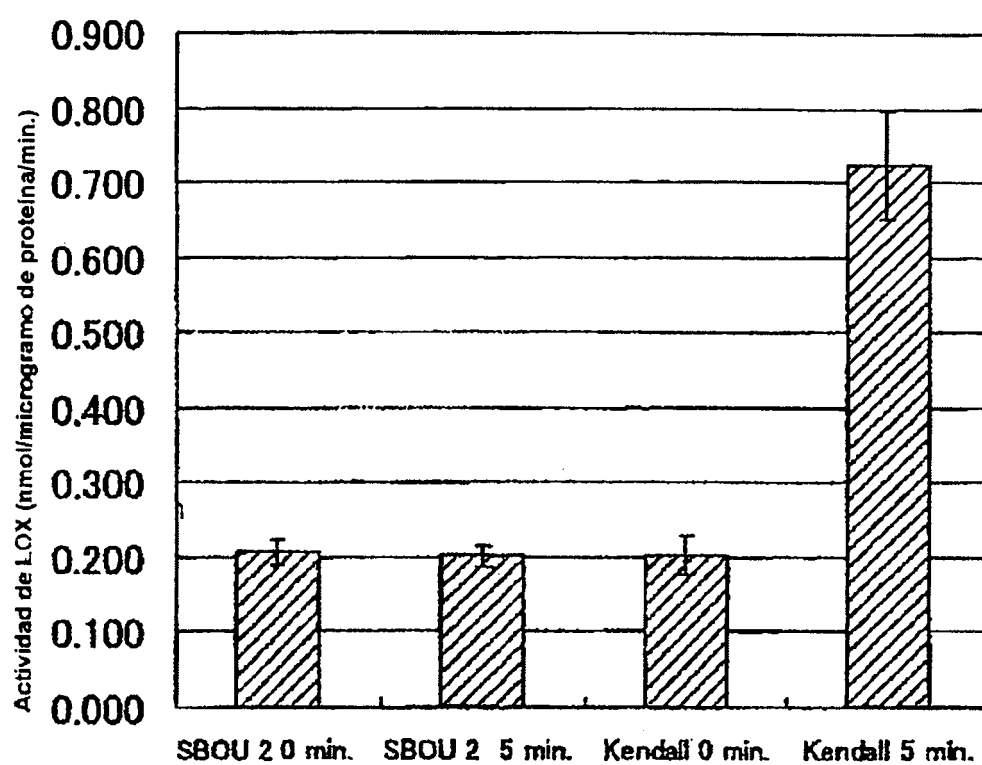


Fig.2

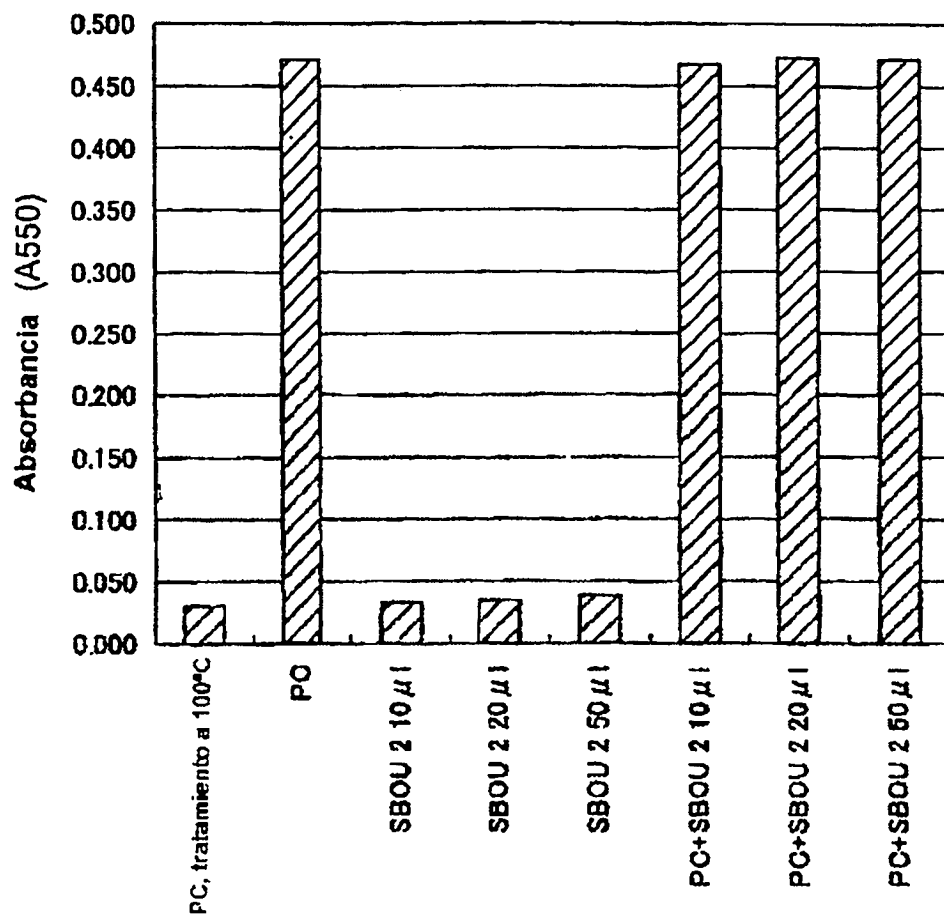


Fig.3

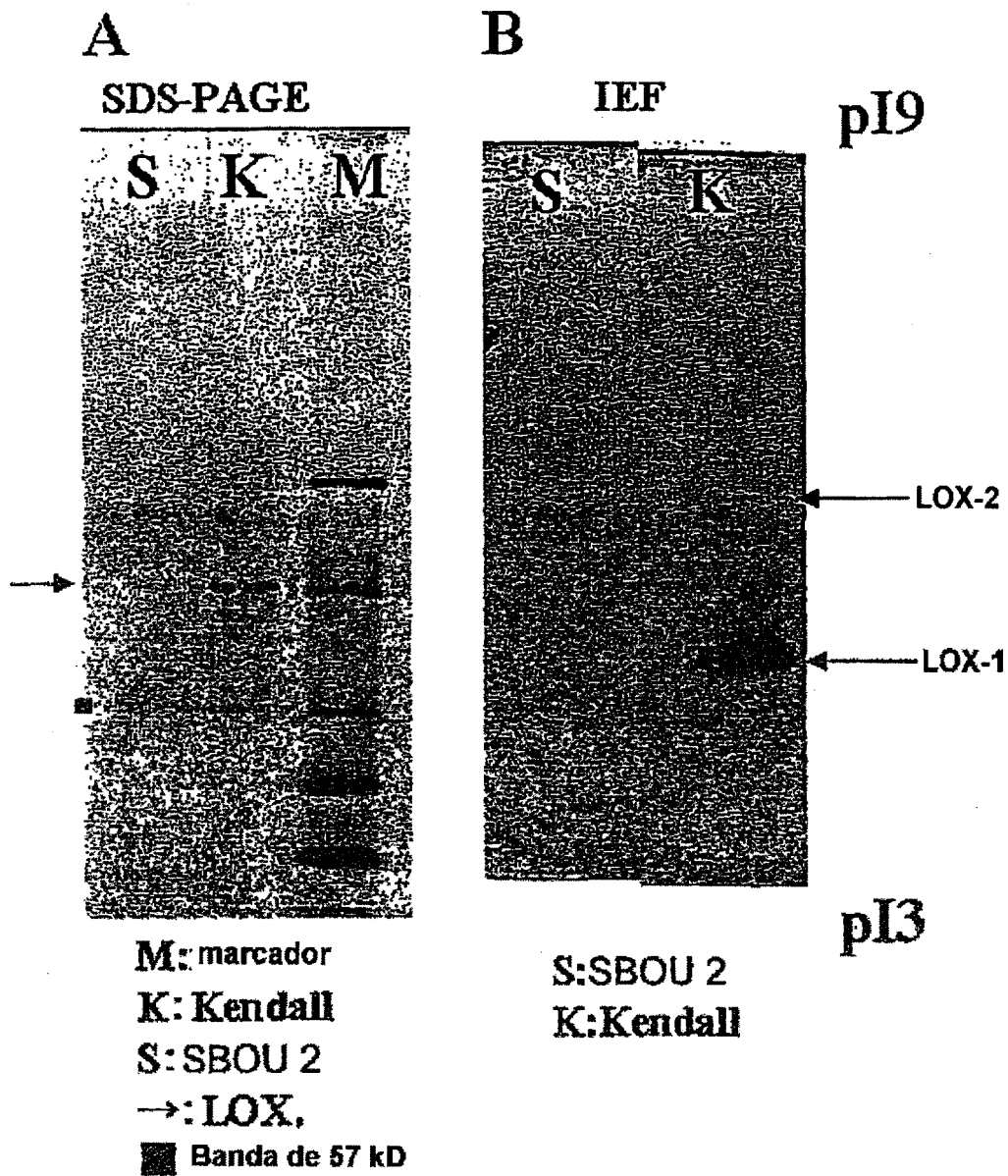


Fig.4

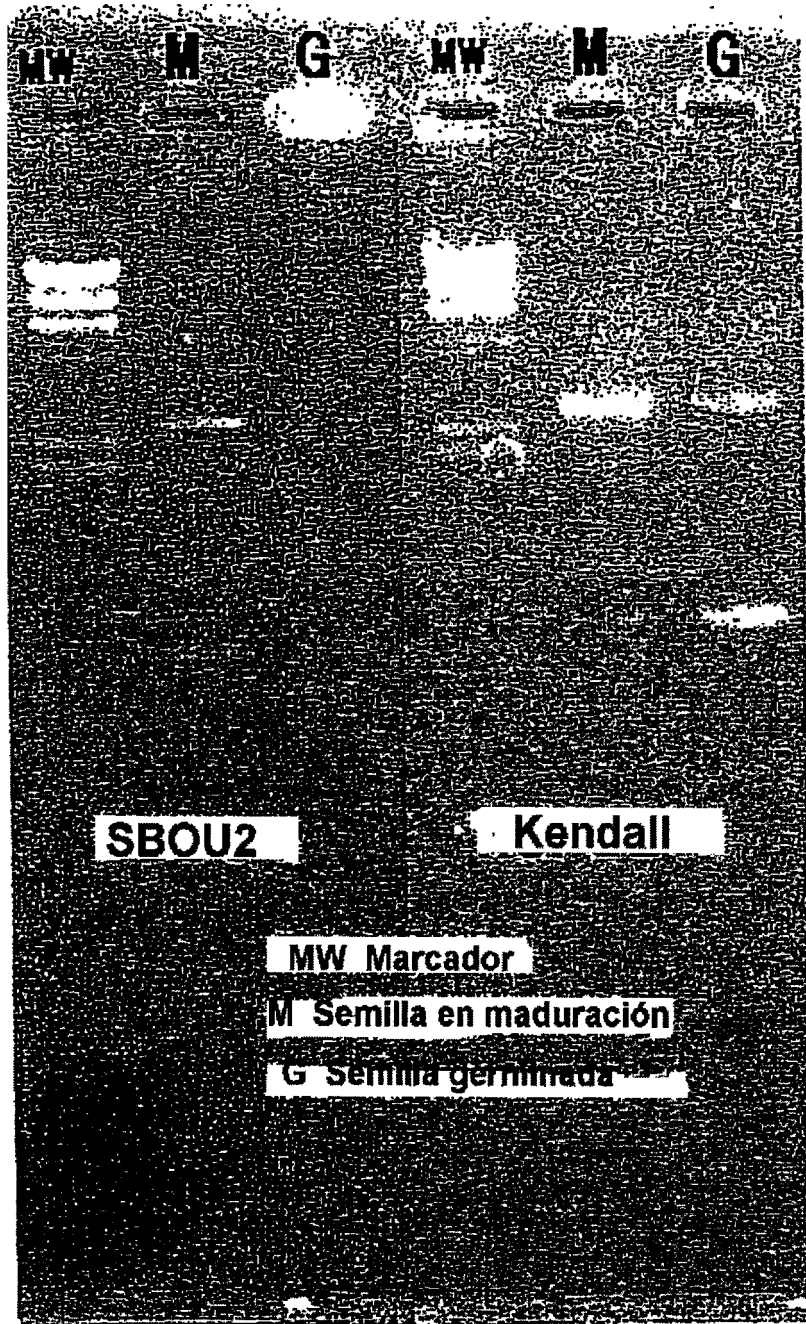
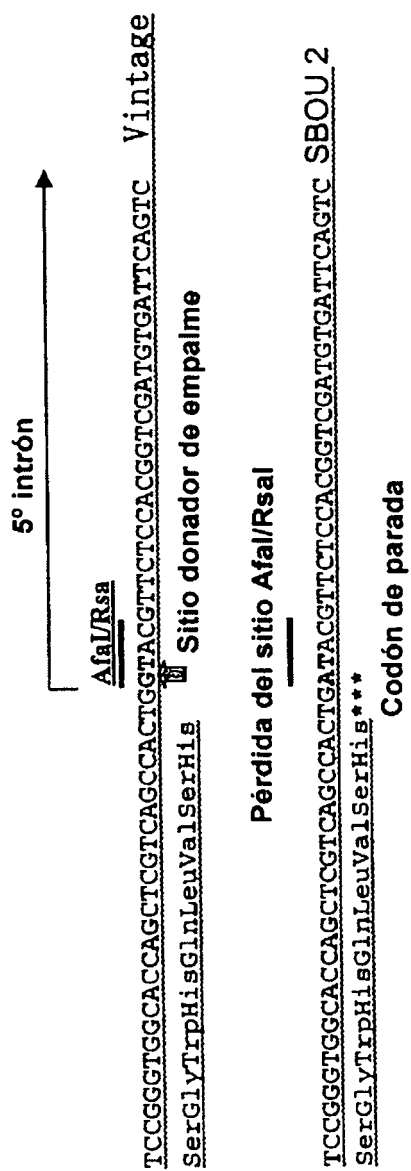
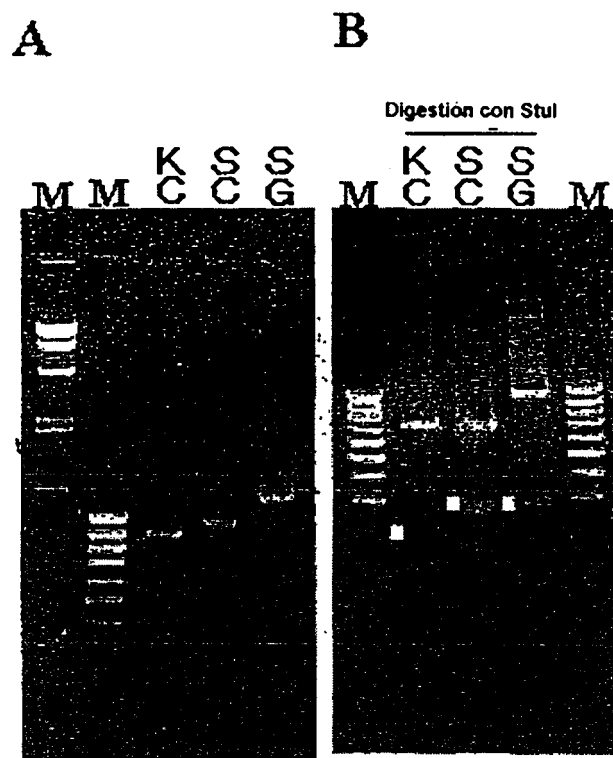


Fig.5



Secuencias de nucleótidos del gen LOX-1, las regiones del sitio donador de empalme del 5° intrón

Fig.6



M: Marcador
KC: cDNA molde de Kendall
SC: cDNA molde de SBOU 2
SG: DNA molde genómico de SBOU 2

Fig.7

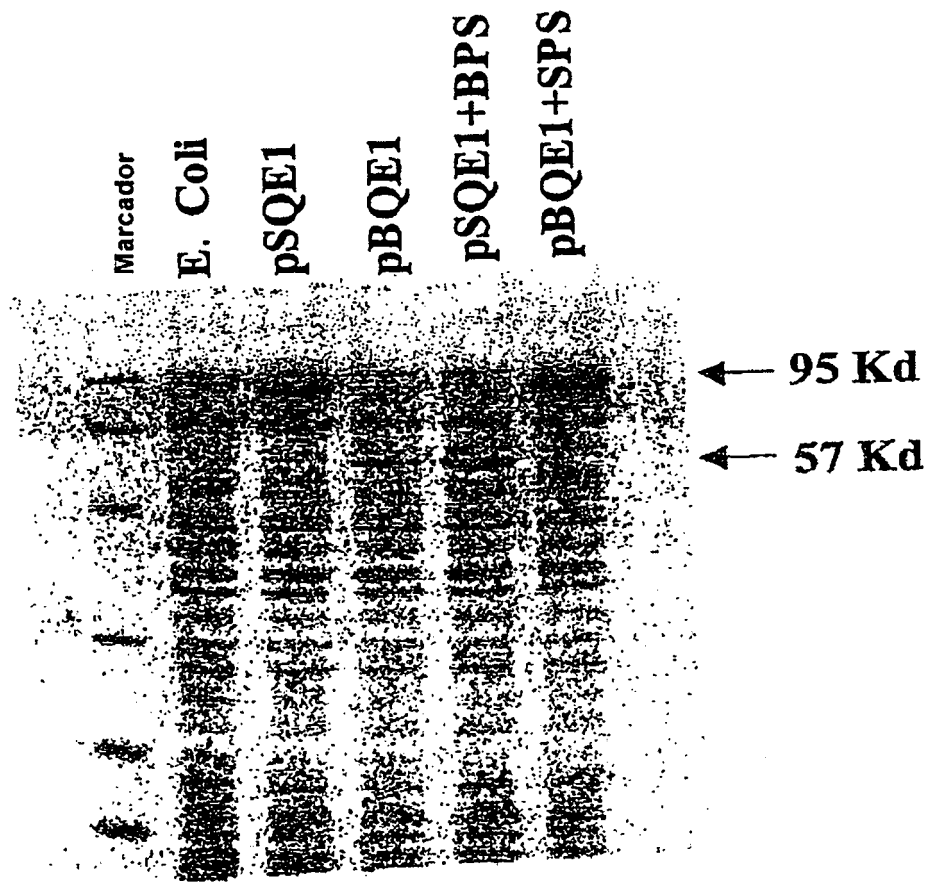


Fig.8

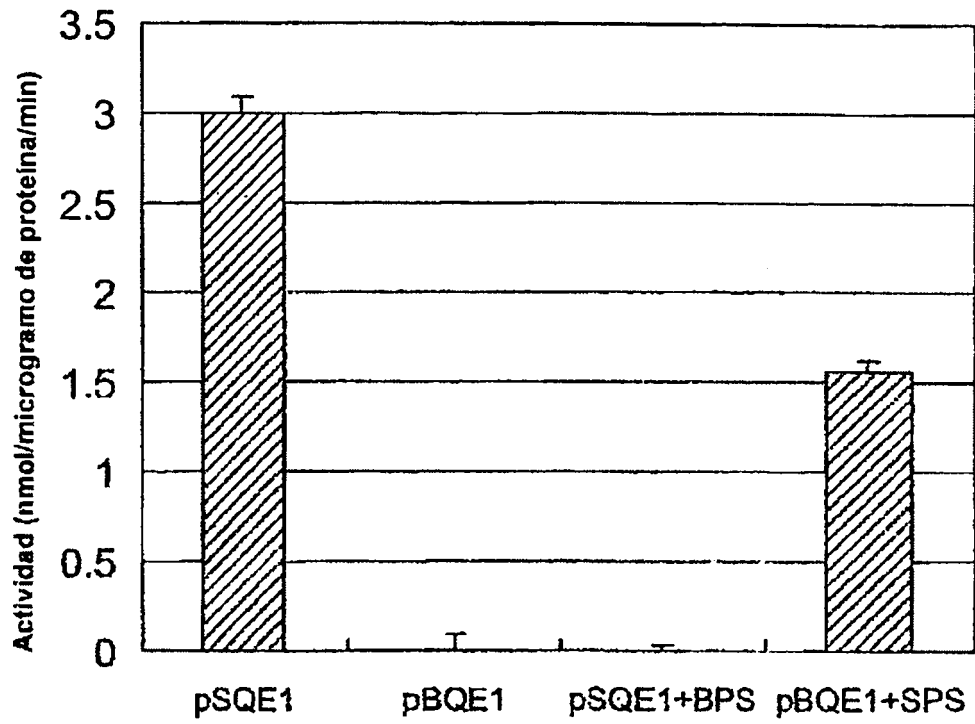
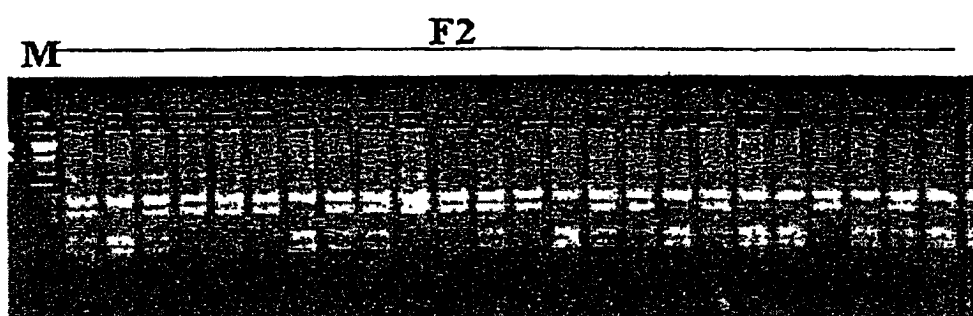


Fig.9



M: Marcador

**F2: Análisis por el método Afal del DNA de la F2
Kendall x SBOU 2**

Fig. 10

F2	Actividad	Método	JBC970	F2	Actividad	Método	JBC970
		CAPS				CAPS	
1	+	KB	KB	73	+	KB	KB
2	+	KK	KK	74	+	KB	KB
3	+	KB	KB	75	+	KK	KK
4	-	BB	KB	76	+	KB	KB
5	-	BB	BB	77	+	KK	KK
6	-	BB	BB	78	-	BB	BB
7	+	KK	KK	79	+	KB	KB
8	+	KB	KB	80	-	BB	BB
9	+	KB	KB	81	-	BB	BB
10	-	BB	BB	82	+	KB	KB
11	-	BB	KB	83	+	KK	KK
12	+	KB	KB	84	+	KK	KK
13	-	BB	BB	85	-	BB	BB
14	+	KK	KK	86	-	BB	BB
15	+	KB	KB	87	-	BB	BB
16	+	KB	KB	88	+	KB	KB
17	+	KK	KK	89	-	BB	BB
18	+	KB	KB	90	-	BB	BB
19	+	KK	KK	91	+	KK	KK
20	+	KK	KK	92	+	KB	KB
21	-	BB	KB	93	+	KB	KB
22	+	KK	KK	94	+	KK	KK
23	+	KB	KB	95	+	KB	KB
24	+	KK	KK	96	+	KB	KB
25	+	KB	KB	97	+	KK	KK
26	+	KB	KB	98	+	KB	KB
27	+	KK	KK	99	+	KB	KB
28	+	KK	KK	100	+	KB	KB
29	+	KK	KK	101	-	BB	BB
30	+	KB	KB	102	+	KB	KB
31	+	KB	KB	103	+	KB	KB
32	-	BB	KB	104	+	KB	KB
33	+	KB	KB	105	+	KB	KB
34	+	KB	KB	106	+	KK	KK
35	+	KK	KB	107	+	KK	KK
36	+	KB	KB	108	+	KK	KK
37	+	KB	KB	109	+	KB	KB
38	+	KK	KK	110	-	BB	BB
39	+	KB	-	111	-	BB	BB
40	+	KB	-	112	+	KB	KB
41	-	BB	BB	113	+	KB	KB
42	+	KB	KB	114	+	KB	KB
43	+	KK	KK	115	-	BB	BB
44	+	KB	KB	116	+	KB	KB
45	-	BB	BB	117	-	BB	BB

Fig. 10 (continuación)

46	+	KK	KK		118	+	KK	KK
47	-	BB	BB		119	+	KB	KB
48	+	KK	KB		120	+	KK	KK
49	+	KB	KB		121	+	KB	KB
50	-	BB	BB		122	+	KB	KB
51	+	KB	KB		123	+	KK	KK
52	+	KB	KB		124	+	KB	KB
53	+	KK	KK		125	-	BB	BB
54	-	BB	BB		126	+	KK	KK
55	+	KK	KK		127	+	KB	KB
56	-	BB	BB		128	+	KB	BB
57	+	KB	KB		129	+	KB	KB
58	+	KB	KB		130	+	KB	KB
59	-	BB	BB		131	+	KK	KB
60	-	BB	BB		132	+	KK	KK
61	+	KK	KK		133	-	BB	BB
62	+	KK	KK		134	-	BB	BB
63	+	KK	KK		135	+	KK	KK
64	+	KB	KB		136	+	KB	KB
65	+	KB	KB		137	+	KB	KK
66	+	KK	KK		138	+	KB	KB
67	+	KB	KB		139	-	BB	BB
68	+	KK	KK		140	+	KK	KK
69	+	KB	KB		141	+	KB	KB
70	-	BB	BB		142	+	KB	BB
71	+	KB	KB		143	+	KK	KK
72	-	BB	BB		144	+	KB	KB

Fig.11

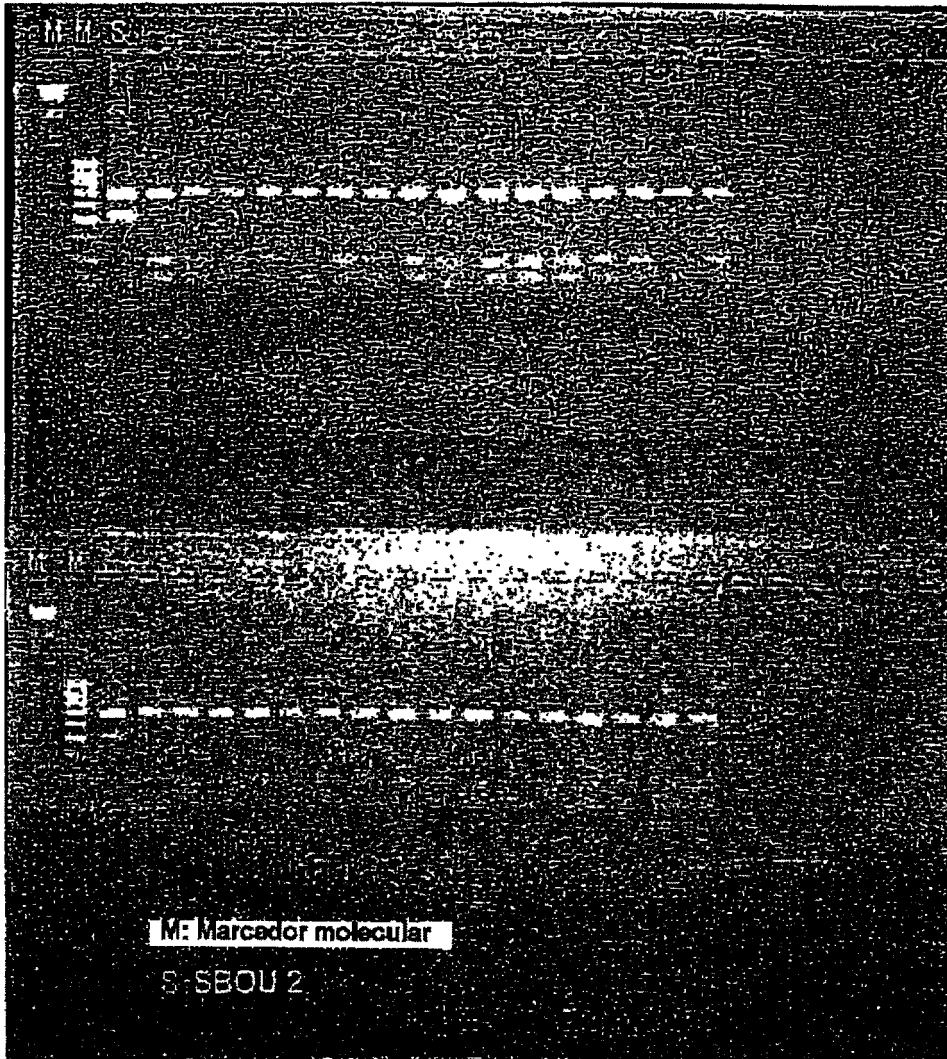
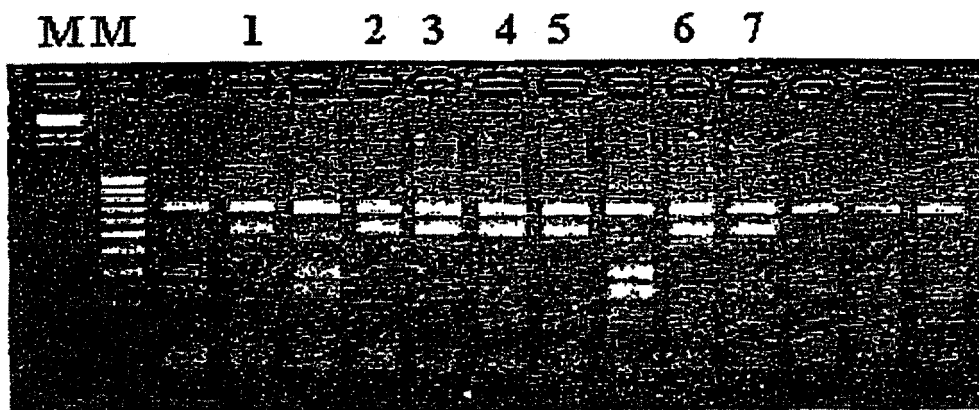


Fig.12



M: Marcador

1 y 5:SBOU2, 2:SBOU 5, 3:SBOU 6
4:SBOU 1, 6:SBOU 3, 7:SBOU 4

Fig.13A

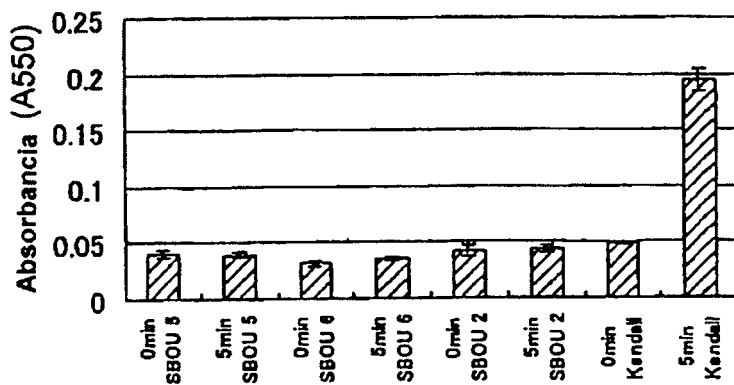


Fig.13B

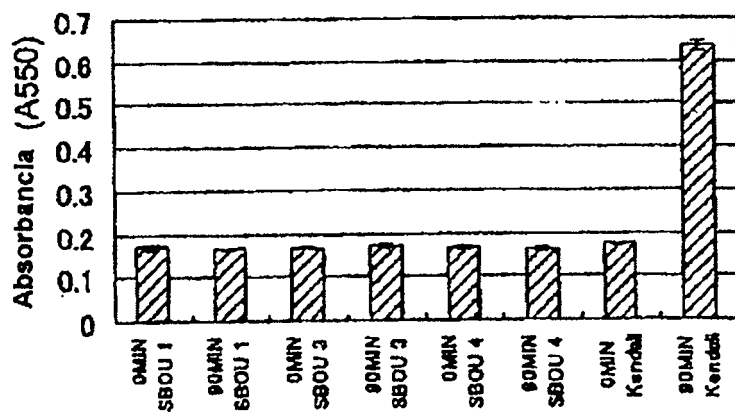
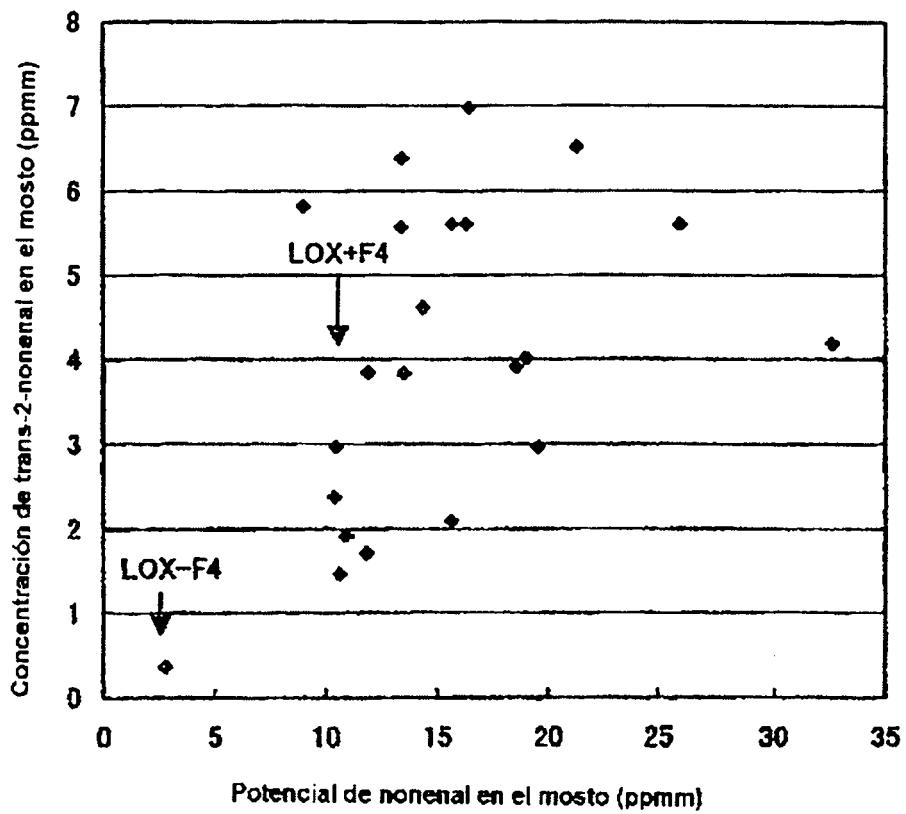


Fig. 14

Variedad	LOX-F4	LOX+F4
Contenido de humedad de la cebada (%)	10,9	11
Peso de la cebada (g)	3000	3000
Maceración (%)	44,8	44,5
Tiempo de maceración (h)	82	82
Producción de malta, peso (g)	2571,6	2572,2
Porcentaje de la producción de malta (% ad)	85,7	85,7
Porcentaje de la producción de malta (% db)	90,3	90,7
Contenido de humedad (%)	6,1	6,8
Tiempo de braceado (min)	9-15	9-15
Velocidad de clarificación (min)	8	17
Transparencia	2	2
Color (EBC)	2,1	2,2
Color a ebullición (EBC)	3,2	3,3
Extracto secado al aire (%)	67	69,3
Extracto anhidro (%)	71,4	73,5
TN (%)	2,49	2,291
SN (%)	0,648	0,645
Proteínas en bruto (%)	15,6	14,3
KZ	26	28,1
EVG (%)	78,8	79
DP (WK)	348	377
DP (WK/TN)	140	165
Viscosidad (mPa.s)	1,87	1,89
β -glucano (mg/l)	427	392
pH	5,97	6
Producción de extracto (%)	64,5	66,7

Fig.15



ES 2 312 984 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SAPPORO BREWERIES LTD.

5 <120> Gen de lipoxigenasa-1 de cebada. Método de selección para cebada. Materiales para bebidas alcohólicas de malta y Método para la producción de bebidas alcohólicas de malta

<130> FP04-0052

10

<150> JP 2003-083924

<151> 2003-03-25

15 <160> 11

<170> Versión PatentIn 3.1

20 <210> 1

<211> 240

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare*

25

<400> 1

otcgccaagg cctacgtcgc cgtcaatgac tccgggtggc accagctcgt cagccactgg 60

30

tacgttcctc acggtcgtg tgattcagtc agtcgatgca caacaactga tcgaaatag 120

attgattgaa acgctcagtc tgaacctca cgcggtgatg gagccgttcg tgatctcgac 180

gaaccggcac cttagcgtga cgcacccggt gcacaagctg ctgagcccgc actaccgga 240

35

<210> 2

<211> 240

<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare*

40

<400> 2

ctcgccaagg cctacgtcgc cgtcaatgac tccgggtggc accagctcgt cagccactga 60

45

tacgttcctc acggtcgtg tgattcagtc agtcgatgca caacaactga tcgaaatag 120

attgattgaa acgctcagtc tgaacctca cgcggtgatg gagccgttcg tgatctcgac 180

gaaccggcac cttagcgtga cgcacccggt gcacaagctg ctgagcccgc actaccgga 240

50

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

55

<220>

<223> Cebador

60

<400> 3

ggagaggagg ccaagaaca gatg 24

65

<210> 4

<211> 19

ES 2 312 984 T3

<212> DNA
<213> Artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 4

10 **ggttgccgat ggcttagat** **19**

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 5

25 **cacgtgccg tccgatccat c** **21**

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 6

40 **ccatcagca gggcatcctg** **20**

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

45 <220>
<223> Cebador

<400> 7

55 **gcgttgatga gcgtctgccg** **20**

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

60 <220>
<223> Cebador para LOX-1 con sitio BamHI

65

ES 2 312 984 T3

<400> 8

ggatccatgc tgctgggagg gctg **24**

5

<210> 9

<211> 25

10 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador para LOX-1 con sitio BamHIII

<400> 9

20 **aagcttttag atggagatgc tgttg** **25**

<210> 10

<211> 2668

25 <212> DNA

<213> *Hordeum vulgare*

<400> 10

30

atgctgctgg gagggtgat cgacaccctc acgggggcga acaagagcgc cgggctcaag **60**

ggcacggtgg tgctcatgcg caagaacgtg ctggacctca acgacttcgg cgccaccatc **120**

35

atcgacggca tcggcgagtt cctcggcaag ggcgtcacct gccagcttat cagctccacc **180**

gccgtcgacc aagacaacgg cggtcgcggg aaggtggcgg cggaggcggg gctggagcag **240**

40

tgggtgacga gcctgccgtc gctgacgacg ggggagtcca agttcggcct caccttcgac **300**

tgggaggtgg agaagctcgg ggtgccgggc gccatcgtcg tcaacaacta ccacagctcc **360**

gagttcctgc ttaaaacat caccctccac gacgtccccg gccgcagcgg caacctcacc **420**

45

ttcgtcgcca actcatggat ctaccccgcc gccaaactacc gatacagcgg cgttttcttc **480**

gccaacgaca cgtacctgcc gagccagatg ccggcggcgc tgaagccgta ccgcgacgac **540**

50

55

60

65

ES 2 312 984 T3

gagctcggga acctgcgtgg cgacgaccag cagggcccgt accaggagca cgaccgcac 600
 taccgctacg acgtctacaa cgacctcggc gagggccgce ccatcctcgg cggcaactcc 660
 5 gaccaccctt acccgcgcgg cggccgcacg gagcgaage ccaacgccag cgacccgagc 720
 ctggagagcc ggctgtcgt gctggagcag atctacgtgc cgcgggacga gaagttcggc 780
 cacctcaaga cgtccgactt cctgggtac tccatcaagg ccatcacgca gggcatcctg 840
 10 ccggccgtgc gcacctacgt ggacaccacc ccggcgaggt tgcactcctt ccaggacatc 900
 atcaacctct atgagggcgg catcaagctg cccaaggtgg ccgccctgga ggagctccgt 960
 aagcagttcc cgtccagct catcaaggac ctctccccg tcggcggcga ctccctgctt 1020
 15 aagctccccg tgccccacat catccaggag aacaagcagg cgtggaggac cgacgaggag 1080
 ttgcacggg aggtgtcgc cggcgtcaac ccggtcatga tcacgcgtct cacggagttc 1140
 ccgcaaaaa gtagtctgga ccctagcaag ttigtgacc acaccagcac catcacggcg 1200
 20 gaggacatag agaagaacct cgaggccctc acggtgcagc aggcgctgga aagcaacagg 1260
 ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc atgcocttcc tgatcgacgt caacaacctg 1320
 ccggcaact tcatctacgc caccaggacc ctcttcttcc tgcggcggca cggcaggctc 1380
 25 acgcccctcg ccatcgagct gagcggccc atcatccagg gcggccttac caccgccaag 1440
 agcaaggttt acacgcgggt gccacgggc tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgc 1500
 aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg tggcaccagc tcgtcagcca ctgatacgtt 1560
 30 ctccaccggtc gatgtgattc agtcagtcga tgcacaacaa ctgatcgaaa tatgattgat 1620
 tgaaacgcgc aggtgaaca ctacgcggt gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg 1680
 gcaccttagc gtgaccgacc cggtgacaaa gctgctgagc ccgcactacc gcgacacat 1740
 35 gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgt catcaacgcc ggcggcatct tcgagatgac 1800
 ggtgttccc ggcaagttc cgttgggat gtcggccgtg gttacaagg actggaagtt 1860
 caccgagcag ggaactcggg acgatctcat caagaggggc atggcggtg aggaccctc 1920
 40 gagcccgtac aaggtgcggt tgcgtggtgc ggactaccg tacgcggcgg acgggctggc 1980
 gatctggcac gccattgagc agtacgtgag cgagtacctg gccatctact acccgaacga 2040
 cggcgtgctg cagggcgata cggaggtgca ggcgtggtg aaggagacgc gcgaggtcgg 2100
 45 gcacggcgac ctcaaggacg cccatggtg gcccaagat caaagtgtc cggagctggc 2160
 caaggcgtgc accaccatca tctggatcgg gtcggcgtc catcggcag tcaactcgg 2220
 gcagtacccc tacgcccggg tcctcccga cggccgacg gtgagccggc gccgatgcc 2280
 50 ggagccggc acggaggagt acgaggagct ggagcgcgac ccggagcggc ccttcatcca 2340
 caccatcacg agccagatcc agaccatcat cggcgtgtc ctgctggagg tgctgtcga 2400
 gcactcctcc gacgagctgt acctcgggca cggggacacg ccggagtgga cctcggacc 2460
 55 aaaggccctg gaggtgttca agcggttcag cgaccgctg gtggagatcg agagcaaggt 2520
 ggtgggatg aacctgacc cggagctcaa gaaccgcaac gcccgggcta agttcccta 2580
 catgctgctc tacccaaca cctccgacca caaggcgcc gctgccgggc ttaccgcaa 2640
 60 gggcatcccc aacagcatct ccatctaa 2668

<210> 11

<211> 4393

65 <212> DNA

<213> *Hordeum vulgare*

ES 2 312 984 T3

<400> 11

	cacgtcgcg	tccgatccat	ctctccaaag	ccgagcgcca	caccaccggg	accggacccg	60
5	gaccggccta	taaattgcc	ggaccgagct	gcaagcagct	cctcacacac	actcacgcaa	120
	cacacatcca	tcttcaactga	aaagtgaaaa	acagtgtgct	ggtgccattg	gttgagcag	180
	tgaagcgag	gagaggaggc	caagaacaag	atgctgctgg	gagggctgat	cgacaccctc	240
10	acgggggoga	acaagagcgc	ccggctcaag	ggcacgggtg	tgctcatcgc	caagaacgtg	300
	ctggacctca	acgacttcgg	cgccaccatc	atcgacggca	tggcgaggtt	cctcggcaag	360
	ggcgtcacct	gccagcttat	cagctccacc	gccgtcgacc	aaggtaatca	ctaccctcct	420
15	ccggccttct	cctctgttta	caagatatag	tatttcttct	gtgtgggccc	gcggccatgg	480
	atggatggat	gigtctggat	cggttaaaga	agataggata	gctagccctg	gccggtcgtc	540
	tttacctgag	catgggcata	tgccatcgaa	aaaagagaca	acagcatgca	tgcatggtgc	600
20	gcgaccaga	ccacgcagag	caccggatgc	tcgagacaaa	gcaacacaac	aagcaaggac	660
	gacacgtcaa	aagcaacaca	acaagcaagg	acggcacgtc	aaaagcaaca	caaacctaaa	720
	ctaaagcaca	aagacgtaag	agcaagcaca	caatcagcag	gctataaaca	gttgtcatca	780
25	aaaacaacgc	tggaagagag	agagaaggaa	ggaagtagta	gccatgaaaa	attaatcac	840
	cgggcgttgc	tcittgcccc	acaattaatc	aagcagggta	cgtagcatgt	atagtcttg	900
	taagtaaac	aagcatgtga	tatgagaagg	tacgtggtgg	tgacagacaac	ggcggtcgcg	960
30	ggaaggtggg	cgcgaggcgc	gagctggagc	agtgggtgac	gagcctgccg	tcgctgacga	1020
	cgggggagtc	caagttcggc	ctcaccttcg	actgggaggt	ggagaagctc	ggggtgccgg	1080
	gcgccatcgt	cgtaacaac	taccacagct	ccgagttcct	gcttaaaacc	atcacctcc	1140
35	acgacgtccc	cgccgcagc	ggcaacctca	ccttcgtcgc	caactcatgg	atctaccccg	1200
	ccgccaacta	ccgatacagc	cgctcttct	tcgccaacga	cgtagcgtgga	ttttcctcta	1260
	ctttcctctc	ctttcatttt	caccgccttc	gtcattcatg	gtcgtcatt	aagtcttgcc	1320
40	aggacaatag	atgatgagct	aggagtgggt	accacttagc	agtacgtaca	ttatttattc	1380
	cggtttgta	gaaaaggata	tggtttggg	cagatcgaca	caagattgaa	tgaaagttgc	1440
	accgtggcac	cgtaggcagc	tggtaggtag	aaataactgt	tgacaggatc	caccacatg	1500
45	attgttttca	tgaataaac	tttaaggat	gtgtctagcc	acatctagat	gcatgtcaca	1560
	taattattgc	ataccaaaac	gattaaatta	agcataaaaa	gaaaaggaaa	aaaatactca	1620
	catatctcga	cgtaagatca	atgatatagt	atitagatat	gcaatattta	tcttacctct	1680
50	aaacctttct	tcattccfaa	atataagaca	tttgtaagat	ttcactatgg	acaacatacg	1740
	aaacaaaalc	agtggatctc	tcctatgcat	cattatgtag	tcctataataa	aatctttaaa	1800
	agatcgtata	ttttgcaacg	gagggagtaa	aacataactt	tttaatagta	atgttgcacg	1860
55	gctccacact	cgagacgta	cctgccgagc	cagatgccgg	cgggcgtgaa	gccgtaccgc	1920
	gacgacgagc	tcggaaacct	gcgtggcgac	gaccagcagg	gcccgtacca	ggagcagcac	1980
	cgcatctacc	gtacagcgt	ctacaacgac	ctcggcggagg	gcccgcccat	cctcggcggc	2040
60	aaactccgacc	acccttacc	gcgccgcggc	cgcacggagc	gcaagcccaa	cgccagcgac	2100
	ccgagcctgg	agagccggct	gtcgtctgtg	gagcagatct	acgtgccggc	ggacgagaag	2160
	ttcggccacc	tcaagacgtc	cgacttccctg	ggctactcca	tcaaggccat	cacgcagggc	2220
65	atcctgccgg	ccgtgcgcac	ctacgtggac	accacccccg	gcgagttcga	ctccttccag	2280

ES 2 312 984 T3

gacatcatca acctctatga gggcggcatc aagctgccc aaggaggccg cctggaggag 2340
 ctccgtaagc agttcccgt ccagctcacc aaggacctcc tccccgtcgg cggcgactcc 2400
 5 ctgcttaagc tccccgtgcc ccacatcacc caggagaaca agcaggcgtg gaggaccgac 2460
 gaggagtccg cacgggagggt gctcggccgc gtaaccggg tcatgatcac gcgtctcacg 2520
 gtgagtacgc gattatttgt tcattgtgtg tgtatgggtt ccatgggtgag aaagtgcaga 2580
 10 tcttgatttg cgttgggtcg catgcacgaa tctctcatgc atgcaggagt tcccccaaaa 2640
 aagtagtctg gaccctagca agtttggta ccacaccagc accatcacgg cggagcacat 2700
 15 agagaagaac ctccgaggcc tcacgggtca gcagtaatt ggtccaagcc atcgacatca 2760
 actatgattt acctaggagt aattggtagc ttagataat ttggcttcgt tgcaattaat 2820
 ttgatctcgg ccgatcaagt gatcgtattg ggtttgaaat ttgcaggcgc tggaaagcaa 2880
 20 caggctgtac atccttgacc acctgaccg gttcatgccg ttctctgatc acgtcaacaa 2940
 cctgccccgc aacttcacct agcccagag gaccctctc ttctctggcg ggcagggcag 3000
 gctcacggcg ctcccatcgc agctgagcga gccatcacc caggggcgcc ttaccacggc 3060
 25 caagagcaag gtttacacgc cggtgcccag cggctccgtc gaaggctggg tgtgggagct 3120
 cgcaaggcc tacgtcggcg tcaatgactc cgggtggcac cagctcgtca gccactgata 3180
 cgttctcac gtcgatgtg attcagtcag tcgatgcaca acaactgatc gaaatgatg 3240
 30 tgattgaaac gcgcaggctg aacctcacc cgggtgatgga gccgttcgtg atctcgacga 3300
 accggcacct tagcgtgacg caccgggtgc acaagctgct gagcccgcac taccgcgaca 3360
 35 ccatgaccat caacgcgctg gcgcggcaga cgtctatcaa cgcggcgccg atcttcgaga 3420
 tgacgggtgt cccgggcaag ttccggttgg ggaatgcggc cgtgggtgac aaggactgga 3480
 agttcaccga gcagggactg cgggacgac tcacaaagag gtacgtacct ggtaaatggt 3540
 40 atgaatgtgt aaaaaaatt gggcgtctcg ctcaactgaca ggaacgtggt aaaaaaatg 3600
 caggggcatg gcggtggagg acccgtcagc cccgtacaag gtgcggttgc tgggtcggga 3660
 ctaccctgac gcgggggacg gctgggggat ctggcacgcc attgagcagt acgtgagcga 3720
 45 gtacctggcc atctactacc cgaacgacgg cgtgctgacg ggcgatacgg aggtgcaggc 3780
 gtggtggaag gagacgcgcg aggtcgggca cggcgacctc aaggacgccc catggtggcc 3840
 50 caagatgcaa agtgtccggg agctggccaa ggcgtgcacc acctatctct ggatcgggtc 3900
 ggcgtgcat gcggcagtca acttcgggca gtaccctac gcggggttcc tccgaaccg 3960
 gccgacggtg agccggcgcc gcatgccgga gcccggcacg gaggagtacg cggagctgga 4020
 55 gcgcgacccg gagcgggctt tcatccacac catcacgagc cagatccaga ccatcatcgg 4080
 cgtgtcgtg ctggagggtg tctcgaagca ctctccgac gagctgtacc tcgggcagcg 4140
 ggacacggcg gagtggacct cggacccaaa ggcctggag gtgttcaagc ggttcagcga 4200
 60 ccggctggtg gagatcgaga gcaaggtggt gggcatgaac catgaccggg agctcaagaa 4260
 ccgcaaccgc ccgctaagt ttccctacat gctgctctac cccaacacct ccgaccacaa 4320
 65 gggcggcgtt gccgggctta ccgcaaggg catcccaac agcatctcca tctaatttaa 4380
 gccatcggca acc 4393