



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102333440 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 23

(21) 申请号 200980157631. 1

代理人 吴小瑛 任晓华

(22) 申请日 2009. 12. 28

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A01H 5/10 (2006. 01)

PA200801851 2008. 12. 30 DK

C12C 1/18 (2006. 01)

C12C 7/00 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12C 12/00 (2006. 01)

2011. 08. 26

C12N 15/01 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/DK2009/050355 2009. 12. 28

CN 1981041 A, 2007. 06. 13, 第10, 34-35页.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/075860 EN 2010. 07. 08

Kuroda H. Characterization of factors involved in the production of 2 (E)-nonenal during mashing. 《Biosci. Biotechnol. Biochem》. 2003, 第64卷(第4期), 第691-697页.

(83) 生物保藏信息

ATCC PTA-9640 2008. 12. 04

审查员 姜岚

(73) 专利权人 嘉士伯酿酒有限公司

地址 丹麦哥本哈根

专利权人 海尼肯供应链股份有限公司

(72) 发明人 伯吉特·斯卡德豪奇 芬恩·洛克

克劳斯·布雷达姆 奥利·奥尔森

莱恩·M·贝克 索伦·克努森

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

公司 72003

权利要求书2页 说明书48页

序列表13页 附图23页

(54) 发明名称

脂加氧酶活性降低的大麦

(57) 摘要

本发明提供了功能性脂加氧酶 (LOX)-1 和 LOX-2 完全丧失的大麦和由其生产的植物产品, 例如利用脂肪酸双加氧酶 LOX-1 和 LOX-2 的合成具有缺陷的大麦粒制备的麦芽。所述酶的主要活性分别涉及将亚油酸转化为 9- 氢过氧化十八碳二烯酸和 13- 氢过氧化十八碳二烯酸的双加氧作用。9- 氢过氧化十八碳二烯酸代表了 LOX 通路代谢物, 其可通过进一步酶促或自发反应导致反式 -2- 壬烯醛 (T2N) 的出现。本发明能够使酿酒者生产出即使在长期饮料储藏后, T2N 特异性的陈腐异味水平仍不显著的啤酒。

1. 由大麦植物或其部分制备的饮料,其中所述饮料包含与以相同方式由大麦 cv. Power 制备的饮料的 T2N 潜能相比小于 50% 的 T2N 潜能,并且其中所述大麦植物或其部分包含导致功能性脂加氧酶(LOX)-1 酶完全丧失的第一突变和导致功能性 LOX-2 酶完全丧失的第二突变,并且其中 T2N 潜能是指在 100°C、pH4.0 温育 2 小时的过程中释放至溶液中的 T2N 的浓度,并且其中 T2N 是指反式-2-壬烯醛。

2. 如权利要求 1 所述的饮料,其中所述饮料为麦芽饮料。

3. 如权利要求 1 所述的饮料,其中所述饮料是啤酒。

4. 如权利要求 1 所述的饮料,其中所述饮料是大麦啤酒。

5. 如权利要求 1 所述的饮料,其中在 37°C 储藏 8 周后,与以相同方式由大麦 cv. Power 制备的饮料相比,所述饮料包含小于 50% 的游离 T2N。

6. 大麦植物细胞或所述大麦植物的部分,所述大麦植物细胞或所述大麦植物的部分不是繁殖材料且其包含导致功能性 LOX-1 酶完全丧失的第一突变和导致功能性 LOX-2 酶完全丧失的第二突变。

7. 如权利要求 6 所述的大麦植物细胞或所述大麦植物的部分,其中在所述植物的所述 LOX-1 编码基因中包含提前终止密码子。

8. 如权利要求 7 所述的大麦植物细胞或所述大麦植物的部分,其中所述植物的所述 LOX-1 编码基因包含无义密码子,所述密码子对应于 W02005/087934 的 SEQ ID NO:2 的第 3572-3574 位碱基。

9. 如权利要求 6 所述的大麦植物细胞或所述大麦植物的部分,其中所述植物的所述 LOX-2 编码基因包含提前终止密码子。

10. 如权利要求 9 所述的大麦植物细胞或所述大麦植物的部分,其中所述植物的所述 LOX-2 编码基因包含位于 SEQ ID NO:1 的第 2689 位核苷酸的突变,导致形成终止密码子。

11. 如权利要求 6 所述的大麦植物细胞或所述大麦植物的部分,其中大麦植物的部分是麦粒。

12. 如权利要求 1-5 中任一项所述的饮料,其中所述饮料是由权利要求 6-11 中任一项所述的大麦植物细胞或所述大麦植物的部分制备的。

13. 包含经加工的大麦植物细胞或所述大麦植物的部分的植物产品,其中所述大麦植物细胞是权利要求 6-11 中任一项所述的大麦植物细胞。

14. 如权利要求 13 所述的植物产品,其中所述植物产品是包含经加工的大麦植物细胞或所述大麦植物的部分的麦芽组合物,其中所述大麦植物细胞是权利要求 6-11 中任一项所述的大麦植物细胞。

15. 如权利要求 13 所述的植物产品,其中所述植物产品是利用权利要求 6-11 中任一项所述的大麦植物细胞或所述大麦植物的部分制备的麦芽汁组合物,或者是利用由所述大麦植物细胞或所述大麦植物的部分制备的麦芽组合物制备的麦芽汁组合物,或其混合物。

16. 如权利要求 15 所述的麦芽汁组合物,其中所述麦芽汁组合物是大麦麦芽汁。

17. 如权利要求 1-5 中任一项所述的饮料,其中所述饮料是由权利要求 14 所述的麦芽组合物或者权利要求 15 或 16 所述的麦芽汁组合物制备的。

18. 如权利要求 13 所述的植物产品,其中所述植物产品选自大麦糖浆、麦芽糖浆、大麦提取物和麦芽提取物组成的组。

19. 生产与以相同方式由大麦 cv. Power 制备的饮料的 T2N 潜能相比 T2N 潜能水平小于 50% 的饮料的方法, 其中所述方法包括以下步骤:

(i) 制备包含权利要求 6-11 中任一项所述的大麦植物细胞或所述大麦植物的部分的组合物; 和

(ii) 将 (i) 的所述组合物加工成饮料;

由此获得所述饮料,

其中 T2N 潜能是指在 100°C、pH4.0 温育 2 小时的过程中释放至溶液中的 T2N 的浓度, 并且其中 T2N 是指反式 -2- 壬烯醛。

20. 生产包含与以相同方式由大麦 cv. Power 制备的麦芽组合物的 T2N 潜能相比小于 50% 的 T2N 潜能的麦芽组合作的方法, 其中所述方法包括以下步骤:

(i) 提供权利要求 11 所述的麦粒;

(ii) 浸泡所述麦粒;

(iii) 在预定条件下萌芽所述经浸泡的麦粒;

(iv) 用热处理所述萌芽的麦粒;

由此产生所述麦芽组合物,

其中 T2N 潜能是指在 100°C、pH4.0 温育 2 小时的过程中释放至溶液中的 T2N 的浓度, 并且其中 T2N 是指反式 -2- 壬烯醛。

21. 如权利要求 20 所述的方法, 其中与以相同方式由大麦突变体 D112 制备的麦芽组合物中的游离 T2N 相比, 所述游离 T2N 的水平为最多 50%T2N, 其中所述大麦突变体 D112 的 ATCC 保藏编号为 PTA-5487。

脂加氧酶活性降低的大麦

[0001] 本申请中引用的所有专利和非专利文献都通过引用整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及植物生物技术领域的进展,其公开了两个脂加氧酶 (LOX) LOX-1 和 LOX-2 的合成具有缺陷的大麦植物及其产品,由此提供了用于多种用途的新原料。当例如用于饮料生产中时,所述原料有利于开发用于生产更具特色且风味更稳定的啤酒的新生产能力,所述啤酒中累积的异味化合物反式-2-壬烯醛 (T2N) 水平显著降低,并且还仅具有仅包含低水平 T2N 潜能 (T2Npotential) 的额外优点。

背景技术

[0003] 大部分啤酒是以生长于世界许多地方的单子叶作物大麦 (*Hordeum vulgare*, L.) 为基础生产的。大麦的种植不仅是因为其作为工业产品 (例如啤酒) 的来源的经济重要性,而且还因为它是动物饲料的来源。

[0004] 遗憾的是,还没有用于制备完全缺乏给定基因和相应蛋白的表达的转基因大麦植物的方法。通常,对于大麦,反义技术的运用可用于产生仍然表达一些所述蛋白的转基因植物 (参见,例如 Robbins 等人,1998 ;Stahl 等人,2004 ;Hansen 等人,2007)。此外,还没有开发出在大麦植物中利用嵌合 RNA/DNA 或定点突变产生方法制备特定突变体的有效方法。事实上,没有报道在大麦中由寡核苷酸成功引导基因靶向的单个实例。Iida 和 Terada (2005) 指出已经在玉米、烟草和水稻中进行了由寡核苷酸引导的基因靶向,但却没有在大麦中进行,并且所有这些情况下都使用 ALS 基因作为靶标。部分研究结论是,经适当改进的策略是否可用于可直接选择性基因 (例如 ALS 基因) 以外的其它基因中还有待观察。利用锌指核酶的靶向诱变代表了可在将来用于研究基础植物生物学或修饰农作物的另一个工具 (Durai 等人,2005 ;Tzfira and White,2005 ;Kumar 等人,2006)。在这种情况下,诱变也没有继续进行或者成功地应用于大麦。

[0005] 然而,可以通过利用化学处理或辐射,例如利用叠氮化钠 (NaN_3 , 图 1) 处理的随机诱变法制备大麦突变体。一个实例是为了鉴定低肌醇六磷酸 (phytate) 突变体而用 NaN_3 诱变大麦粒并选择高水平游离磷酸 (Rasmussen and Hatzack,1998) ;从 2,000 个筛选的麦粒中总共鉴定出 10 个突变体。然而,在 NaN_3 处理后鉴定特定突变体需要有效的筛选方法,且并非总能成功。

[0006] 1970 年,分离出了造成啤酒中纸板样风味的分子,经鉴定为 T2N,这是一种挥发性 C_9 烯醛 (Jamieson and Gheluwe,1970)。由于人体内 T2N 的味觉阈值极低 (之前测定为约 0.7nM 或 0.1ppb (Meilgaard,1975)),因此即使醛水平极低的产品也会因为该产品的异常味道而被认为是老化产品。然而,在新鲜啤酒中 T2N 水平通常非常低 (Lermusieau 等人,1999),因此推测在储藏过程中,可从 T2N 加合物释放游离 T2N (Nyborg 等人,1999)。随后观察到麦芽汁中的 T2N 潜能与产品储藏后的 T2N 形成相关 (Kuroda 等人,2005),该观察结果支持了上述推测。

[0007] 大麦粒包含三种 LOX 酶: LOX-1、LOX-2 和 LOX-3 (van Mechelen 等人, 1999)。LOX-1 催化由亚油酸形成 T2N 和三羟基十八碳烯酸 (缩写为 THA) 两者的前体 9- 氢过氧化十八碳二烯酸 (9-HPODE; 参见图 2 中 LOX 通路的部分综述)。LOX-2 主要催化由亚油酸转化为 13-HPODE, 其进一步被代谢成具有约 0.4-ppm 高味觉阈值的 C₆ 醛 (Meilgaard, 见上文)。LOX-3 作用可能与本申请无关, 原因有两个: 大麦粒中相应基因的表达水平非常低, 和 LOX-3 的产物特异性仍不清楚。

[0008] 作为对上述数据的支持, 数个报道已经指出 T2N 经由以下生化途径而产生, 其包括先通过 LOX-1 的催化将亚油酸转化为 9-HPODE, 然后通过 9- 过氧化氢物裂解酶作用裂解 9-HPODE (参见, 例如 Kuroda 等人, 2003, 2005; Noodermeer 等人, 2001)。

[0009] 麦芽中的总 LOX 活性和麦芽汁的壬烯醛潜能之间似乎没有关联。然而, 推测 LOX-1 活性和麦芽汁 T2N 潜能之间具有显著关联, 原因主要是认为 LOX-2 在麦芽汁中形成 T2N 潜能方面的活性较差 (Kuroda 等人, 2005)。

[0010] 如上文所述, 在图 2 中显示了集中于由亚油酸至 T2N 的生化反应的部分 LOX 通路。LOX-1 酶的主要活性涉及亚油酸至 9-HPODE 的转化, 而 9-HPODE 是导致 T2N 形成的生化通路的上游代谢物。相比之下, LOX-2 的主要活性涉及亚油酸至 13-HPODE 的转化, 而 13-HPODE 独立于上文提及的形成 T2N 的生化通路。注意, LOX-1 和 LOX-2 酶可利用亚麻酸作为底物, 但由于相应通路不导致 T2N 形成, 而使该活性在本申请的范围之外。

[0011] 认为麦芽中的主要 LOX 活性由 LOX-1 产生 (参见, 例如 Kuroda 等人, 2003)。

[0012] 已经开发出了特征在于 LOX-1 活性降低或者没有 LOX-1 活性的数种不同的大麦植物。例如, Douma, A. C. 等人的 PCT 申请 WO 02/053721 中公开了低 LOX-1 活性的大麦粒和大麦植物。并且, 在 Breddam, K. 等人的 WO2005/087934 中关注了 LOX-1 活性有缺陷的两种不同大麦突变体: 剪接突变体和具有提前终止密码子 (premature translational stop codon) 的突变体。如图 1 所示, 通过突变植物的繁殖和选择鉴定出了这些突变体。上述突变体是通过筛选 NaN₃ 诱变的大麦而鉴定出的, 而 Hirota, N. 等人在 EP 1609866 中描述了通过筛选收集的大麦当地品种鉴定出的没有 LOX-1 活性的大麦植物。

[0013] 已知合成低水平 LOX 的数个突变植物样本。然而, 没有描述数个脂加氧酶活性具有缺陷的大麦植物, 例如没有描述 LOX-1 和 LOX-2 活性均有缺陷的大麦植物。能够对植物进行遗传操作的方法常特异于特定的植物种类, 因此, 尽管已知少数水稻植物、大豆植物或拟南芥植物包含低水平的 LOX, 但用于制备此类植物的方法不能用于产生低 LOX 活性或无 LOX 活性的大麦植物。此外, 一个植物物种的 LOX 突变体与另一植物物种的 LOX 突变体相比可能具有不同的性质。

[0014] 发明概述

[0015] 麦芽汁是生产基于麦芽的饮料 (例如啤酒) 过程中关键的复杂液体 (参见图 3, 其提供了对整个啤酒制备过程的概述)。由 LOX-1 活性具有缺陷的大麦植物制备的麦芽汁的实际特征在于包含显著水平的 T2N 潜能, 虽然所述水平低于由野生型大麦制备的麦芽汁。由于麦芽汁中的所述潜能与储藏后啤酒中形成的 T2N 相关 (Kuroda 等人, 2005), 因此需要可用于生产 T2N 潜能的水平显著降低的麦芽汁的大麦植物。

[0016] 已经描述了通过热处理降低 LOX 活性的方法。然而, 所述热处理通常在大麦发芽 (malting) 和 / 或麦芽汁的制备过程中进行, 因此, LOX 活性的产物可以在大麦中聚集直至

进行热处理。大麦的分析表明,大麦中存在显著量的 LOX 活性产物,甚至在大麦发芽前也是如此 (Wackerbauer and Meyna, 2002)。

[0017] 本发明提供了 LOX-1 和 LOX-2 活性具有缺陷的大麦植物,并公开了所述大麦植物具有数个意义深远且惊人的优势。如上文所述,Kuroda 等人(见上文)描述了麦芽中的 LOX 活性与麦芽汁中的 T2N 潜能之间缺乏关联性,并将此归因于 LOX-2 活性的存在。Kuroda 等人(2005)因此认为 LOX-2 在 T2N 潜能形成方面的作用无关紧要。

[0018] 酿造领域的研究者已致力于了解控制游离 T2N 和 T2N 潜能形成的要素。因此,当本发明提供试验证据以公开利用 LOX-1 和 LOX-2 活性均有缺陷的大麦植物在用于生产显示出非常低水平的 T2N 潜能的麦芽汁中的有益作用时,这非常令人意外,甚至令人困惑。同时还发现,由 LOX-1 和 LOX-2 活性均有缺陷的大麦植物制备的麦芽汁中的游离 T2N 水平低于由 LOX-1 无效大麦制备的麦芽汁。

[0019] 本发明的一个目的是提供由大麦植物或其部分制备的饮料,其中所述饮料包含非常低水平的 T2N 潜能,并且其中所述大麦植物或其部分包含导致 LOX-1 活性的功能完全丧失(例如功能性 LOX-1 酶完全丧失)的第一突变,和导致 LOX-2 活性的功能完全丧失(例如活性 LOX-2 酶完全丧失)的第二突变。

[0020] 本发明还旨在提供用于制备本发明的饮料的大麦植物。因此,本发明描述了大麦植物或其部分的产生,其中,所述大麦植物或其部分包含导致 LOX-1 活性的功能完全丧失(例如功能性 LOX-1 酶完全丧失)的第一突变,和导致 LOX-2 活性的功能完全丧失(例如功能性 LOX-2 酶完全丧失)的第二突变。

[0021] 此外,本发明还提供了包含经加工的大麦植物或其部分的植物产品,其中所述植物包含导致 LOX-1 活性功能完全丧失(例如功能性 LOX-1 酶完全丧失)的第一突变和导致 LOX-2 活性功能完全丧失(例如功能性 LOX-2 酶完全丧失)的第二突变。不受限制地,上述植物产品可以为,例如麦芽组合物,或麦芽汁组合物,或饮料(例如基于麦芽的饮料,如啤酒或基于无醇麦芽的饮料),或者基于大麦的饮料,或者基于麦芽和大麦和任选地其它成分的混合物的饮料。所述植物产品还可以为大麦糖浆、麦芽糖浆、大麦提取物和麦芽提取物。

[0022] 此外,本发明还涉及用于生产特征在于 T2N 潜能水平非常低的饮料的方法,所述方法包括以下步骤:

[0023] (i) 制备包含大麦植物或其部分的组合物,其中所述大麦植物或其部分包含导致 LOX-1 活性功能完全丧失(例如功能性 LOX-1 酶完全丧失)的第一突变和导致 LOX-2 活性功能完全丧失(例如功能性 LOX-2 酶完全丧失)的第二突变;

[0024] (ii) 将 (i) 的组合物加工成饮料;

[0025] 由此获得特征在于 T2N 潜能水平非常低的饮料。

[0026] 本发明还涉及大麦植物,其除了包含导致 LOX-1 活性功能完全丧失的第一突变和导致 LOX-2 活性功能完全丧失的第二突变外,还包含一个或多个其它有用的突变。

附图说明

[0027] 图 1 显示了如何繁殖 NaN_3 - 诱变的大麦粒的一个实例。M0 代的麦粒生长成为产生 M1 代麦粒的植物。可以播种这些麦粒用于形成产生 M2 代新麦粒的 M1 植物。接着,培育 M2 代植物并产生 M3 代麦粒。可以使 M3 代麦粒萌芽,用于例如分析萌芽 M3 植物的胚鞘。此外,

还可以将源于 M3 植物的麦粒的花用在与大麦系或栽培品种的杂交中以获得 M4 代植物。类似的附图显示在 Breddam, K. 等人的 PCT 专利申请 WO2005/087934 的图 1A 中。

[0028] 图 2 显示了用于亚油酸至 T2N 的转化和降解的生化通路的图示。LOX-1 主要催化亚油酸转化为 9-HPODE, 9-HPODE 被酶促降解为顺式壬烯醛。该化合物经自发的化学异构化成为 T2N。LOX-2 主要催化亚油酸转化为 13-HPODE, 13-HPODE 可以转化为 2-E-己烯醛(未显示)。

[0029] 图 3 显示了优选的啤酒生长工艺的简化图示概要, 其包括浸泡大麦谷粒 (1)、发芽 (2)、烘干 (3)、研磨干燥的麦芽 (4)、糖化 (5)、过滤 (6)、在添加酒花的情况下煮沸麦芽汁 (7)、在存在酵母的情况下发酵 (8)、啤酒熟化 (9)、啤酒过滤 (10)、包装, 例如包装到瓶、罐等中 (11) 和贴标签 (12)。这些独立的步骤可以分组成包括生产麦芽 (1-3)、生产麦芽汁 (4-7)、发酵 (8-9) 和制备成品啤酒 (10-12) 的部分。虽然图示的是优选的方法, 但也可以涉及省略一些所述步骤 (例如可以省略过滤或者可以不加入酒花), 或者加入额外步骤 (例如添加辅料、糖、糖浆或碳酸盐) 的其他方法。

[0030] 图 4 显示了 M3 代 (A)、M4 代 (B) 和 M5 代 (C) 的萌芽麦粒中总 LOX 活性的比较结果。在从双无效 LOX 突变体 A689、LOX-1 无效突变体 D112 和 LOX-1 无效育种系 Ca211901 的萌芽麦粒分离的胚的提取物中测定所述活性。将相同样本的热失活提取物试样作为试验对照 [C 中 : LOX-1 无效原始突变体 D112(*), LOX-1 无效育种系 Ca211901(**)]。还显示了所分析的植物样本的 LOX-1 和 LOX-2 基因型 (wt : 野生型)。

[0031] 图 5 显示了用于测定萌芽 48 小时的大麦胚中形成的 9-HPODE 和 13-HPODE 的 HPLC 分析的色谱图。通过测定 234nm 的吸光度来检测 HPODE, 结果以相对吸光度单位 (AU) 表示。与 9-HPODE 和 13-HPODE 对应的洗脱谱的峰用箭头显示。(A) 9-HPODE 和 13-HPODE 标准品的色谱图。(B) 在由 LOX-1 无效突变体 D112 的萌芽胚制备的提取物中形成的 HPODE 的色谱图。(C) 在由双无效 LOX 突变体 A689 (M4 代) 的萌芽胚制备的提取物中形成的 HPODE 的色谱图。

[0032] 图 6 显示了用于测定微发芽 (micro-malted) 72 小时的麦粒的胚中形成的 9-HPODE 和 13-HPODE 的 HPLC 分析的色谱图。通过测定 234nm 的吸光度来检测 HPODE, 结果以相对吸光度单位 (AU) 表示。与 9-HPODE 和 13-HPODE 对应的洗脱谱的峰用箭头显示。(A) 在野生型 cv. Barke 中形成的 9-HPODE 和 13-HPODE 的色谱图。(B) 在 LOX-1 无效突变体 D112 的胚的提取物中形成的 HPODE 的色谱图。(C) 在双无效 LOX 突变体 A689 (M5 代) 的提取物中形成的 HPODE 的色谱图。

[0033] 图 7 显示了在野生型大麦 cv. Power、LOX-1 无效突变体 D112 和突变体 A689 的三个潜在双无效 LOX 系 (M5 代) 的微发芽样本中形成的游离 T2N 的水平。图中还包括所分析的大麦样本的 LOX-1 和 LOX-2 基因型 (wt : 野生型)。

[0034] 图 8 显示了在由野生型 cv. Power、LOX-1 无效突变体 D112 和双无效 LOX 突变体 A689 (M5 代) 的微发芽麦粒产生的煮沸麦芽汁样本中形成的游离 T2N 的水平。还显示了所分析的大麦样本的 LOX-1 和 LOX-2 基因型 (wt : 野生型)。

[0035] 图 9 显示了在由野生型 cv. Power、LOX-1 无效突变体 D112 和双无效 LOX 突变体 A689 (M5 代) 的微发芽麦粒产生的煮沸麦芽汁样本中的 T2N 前体水平。

[0036] 图 10 显示了在利用 cv. Power、LOX-1 无效突变体 D112 和双无效 LOX 突变体 A689

的麦芽的 200 升规模的酿造试验中产生的啤酒中的 T2N 前体水平。显示了所使用的麦芽的 LOX-1 和 LOX-2 基因型 (wt :野生型)。

[0037] 图 11 显示了从通过大麦酿造产生的,或者通过常规发芽和糖化产生的 200 升规模的煮沸麦芽汁中采集的所示样本的试样中游离 T2N 水平的比较。显示了所使用的原材料的 LOX-1 和 LOX-2 基因型 (wt :野生型)。

[0038] 图 12 显示了从通过大麦酿造产生的,或者通过常规发芽和糖化产生的 200 升规模的煮沸麦芽汁 (参见图 11) 中采集的所示样本的试样中 T2N 前体水平的比较。还显示了所使用的原材料的 LOX-1 和 LOX-2 基因型 (wt :野生型)。

[0039] 图 13 显示了利用所示大麦栽培品种和突变体作为原材料的 200 升规模的酿造试验获得的啤酒中 T2N 的形成。(A) 单独的大麦酿造啤酒分析,集中于强制老化 (forced aging) 过程中游离 T2N 的形成。水平虚线表示 T2N 的品尝阈值水平 (50ppt)。在独立试验中比较了大麦酿造和常规酿造的新鲜啤酒中 T2N 前体的水平 (B);在 (C) 中显示了与在 37°C 下保藏 2 周后的啤酒中游离 T2N 水平 (黑柱) 相比,新鲜啤酒中游离 T2N 的水平 (白柱)。还显示了所使用的原材料的 LOX-1 和 LOX-2 基因型 (wt :野生型)。

[0040] 图 14 显示了在大麦酿造啤酒 (A) 和利用正常麦芽生产的啤酒 (B) 中 THA 的水平和比例的比较。9,12,13-THA 和 9,10,13-THA 分别通过 LOX-1 和 LOX-2 通路的部分未知的反应产生。

[0041] 图 15 显示了利用 cv. Power (黑柱)、LOX-1 无效 (灰柱) 和双无效 LOX (白柱) 原料的 200 升规模的大麦酿造啤酒中,随时间形成的“纸质”异味 (A) 和“老化”异味的图示。专业啤酒品尝小组利用 0 (无异味) 至 5 (异味极大) 的评分对啤酒进行了评价。

[0042] 图 16 显示了在大麦酿造啤酒 (A) 和基于麦芽的啤酒 (B) 中如何形成泡沫。在这两个试验中,利用商业化的储藏啤酒作为对照 (粗虚线),对利用 cv. Power (细虚线)、LOX-1 无效 (细实线) 和双无效 LOX (粗实线) 为原料生产的啤酒进行了比较。

[0043] 图 17 显示了大麦基因组基因 LOX-2 的结构,集中于跨越起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA) 的区域。发现这个 3229-bp 序列由 6 个外显子 (实心框) 和 5 个内含子 (线) 组成。双无效 LOX 突变体 A689 中经鉴定的 LOX-2 基因的突变用垂直箭头表示。值得注意的是,双无效 LOX 突变体 A689 在 LOX-1 基因中还包含提前终止密码子 (参见美国专利第 7,420,105 号图 15 例示的突变体 D112)。

[0044] 图 18 显示了基因型分析如何能够用于鉴定 LOX 无效突变体。焦点涉及双无效 LOX 大麦植物的 SNP 辅助检测,即实现 LOX-1 基因的第 3474 位的 G → A 突变和 LOX-2 基因的第 2689 位的 G → A 突变的组合检测的方式。(A) 利用所示引物对由所示模板 DNA 扩增的 PCR 片段 (即,可以使用引物 FL1035 和 FL1039 扩增野生型 LOX-2 基因,而可以使用引物 FL1034 和 FL1039 扩增无效 LOX-2 突变基因) 的琼脂糖凝胶电泳图。(B) 说明在存在所述无效 LOX 突变的情况下,分别利用引物对 FL820 和 FL823 (包含与如星号所示的无效 LOX-1 特异性突变互补的 3' 碱基),和引物对 FL1034 (包含与如星号所示的无效 LOX-2 突变互补的 3' 碱基) 和 FL1039 的 PCR 如何能够产生 166bp 和 200bp 的 PCR 产物的示意图。(C) 标准 DNA (泳道 1 和 4) 以及利用上述用于检测无效 LOX-1 和无效 LOX-2 突变的引物组合,对双无效 LOX 突变体 A689 进行 PCR 扩增的 DNA (泳道 2) 的琼脂糖凝胶电泳结果的描述。野生型大麦的 PCR 反应不产生相应的 PCR 产物 (泳道 3)。

[0045] 图 19 显示了对双无效 LOX 大麦杂交的子代植物进行 SNP 辅助分析的实例。(A) 利用上文图 18 详述的引物组合(即,用于基于 PCR 的无效 LOX-1 和无效 LOX-2 突变检测的引物)的示意图。从左开始的第一泳道(如泳道下方所示的条带号“a”)不包含表示存在所述两个突变的特异性 PCR 产物[即两个模板区具有野生型(W)序列],而下一泳道(条带号“b”)突出显示了源自无效 LOX-1 突变植物(M)的 PCR 产物。第三泳道(条带号“c”)源自 LOX-2 无效植物,第四泳道(条带号“d”)源自双无效 LOX 植物。(B) 野生型、LOX-1 无效、LOX-2 无效和双无效 LOX 大麦基因型的琼脂糖凝胶电泳。对上文(A)中描述的条带图的分析表明,泳道 2、6、10、12、18 和 22 含有从携带了无效 LOX-1 突变的植物扩增的产物(泳道下方标有“b”);而泳道 1、3、9、11、19、21 和 23 含有从携带了无效 LOX-2 突变的植物扩增的产物(泳道下方标有“c”)。泳道 7、15 和 17 含有来自携带了 LOX-1 和 LOX-2 基因突变组合的双无效 LOX 植物的产物(泳道下方标有“d”)。泳道 4、5、8、13、14、16 和 20 不含从具有任一无效 LOX 等位基因的植物扩增的产物(泳道下方标有“a”),即所述植物的所测序列是野生型的。标准 DNA 在标记为“MW”的泳道分离。

[0046] 发明详述

[0047] 定义

[0048] 在随后的说明书、附图和表格中使用了许多术语。为了提供包括给出这些术语的范围的说明书和权利要求书,提供了下列定义:

[0049] 本文使用的“一”可以指一个或多个,这取决于其使用的上下文。

[0050] 术语“农学特征”描述了有助于形成所述植物的性能或经济价值的植物表型或遗传特征。这种特征包括抗病性、抗虫性、抗病毒性、抗线虫性、耐旱性、高盐度耐受性、产量、株高、成熟天数、麦粒分级(即麦粒的大小分级)和麦粒的含氮量等。

[0051] “反义核苷酸序列”指方向与核苷酸序列正常编码的 5' -3' 方向相反的序列。当存在于植物细胞中时,反义 DNA 序列优选降低内源基因核苷酸序列的正常表达,并且可以破坏对应天然蛋白的产生。在大麦植物中,反义核苷酸的表达通常仅降低所述天然蛋白的表达但不抑制其表达。

[0052] 与啤酒和基于大麦的饮料的制造工艺相关,特别是用于描述发芽(malting)过程时,术语“大麦”是指大麦粒。在其它所有情况下,除非另有说明,否则“大麦”是指包括任何培育品系或栽培品种或变种(variety)在内的大麦植物(*Hordeum vulgare*, L.),而大麦植物的部分可以是大麦植物的任何部分,例如任何组织或细胞。

[0053] “抗病性”指植物避免出现作为植物病原体相互作用的结果的疾病症状。这样阻止了病原体引起植物疾病和相关的疾病症状。或者,由病原体引起的疾病症状被减到最小,或降低,甚至被预防。

[0054] 本文使用的术语“双无效 LOX”是指完全丧失 LOX-1 活性功能并且完全丧失 LOX-2 活性功能。因此,“双无效 LOX”可以表征为完全丧失功能性 LOX-1 酶和完全丧失功能性 LOX-2 酶。因此,“双无效 LOX 大麦植物”是包含导致 LOX-1 活性功能完全丧失的第一突变和导致 LOX-2 活性功能完全丧失的第二突变的大麦植物。因此,“双无效 LOX 大麦植物”可以表征为完全丧失功能性 LOX-1 酶和完全丧失功能性 LOX-2 酶。类似地,“双无效 LOX 麦粒”是包含导致 LOX-1 活性功能完全丧失的第一突变和导致 LOX-2 活性功能完全丧失的第二突变的麦粒,等等以此类推。因此,“双无效 LOX 麦粒”可以表征为完全丧失功能性 LOX-1

酶和完全丧失功能性 LOX-2 酶。

[0055] 在本文中定义的“谷类”植物是禾本科 (Graminae) 植物家族的成员,其中种植禾本科植物主要是为了获取其含淀粉的种子或麦粒。谷类植物包括,但不限于大麦 (Hordeum 属)、小麦 (Triticum 属)、稻 (Oryza 属)、玉米 (Zea 属)、黑麦 (Secale 属)、燕麦 (Avena 属)、高粱 (Sorghum 属) 和黑小麦 (Triticale, 黑麦 - 小麦杂交种)。

[0056] 在有关特定核酸的上下文中,“编码”或“编码的”表示包含用于翻译成特定蛋白的信息。编码蛋白的核酸或多核苷酸可以包含位于核酸翻译区中的非翻译序列(例如内含子),或者可以缺乏这种插入的非翻译序列(例如在 cDNA 中)。利用密码子对编码蛋白的信息进行说明。

[0057] 本文在有关核酸的上下文中使用的“表达”应理解为来源于核酸片段的正义 mRNA 或者反义 RNA 的转录和累积。在有关蛋白的上下文中使用的“表达”指将 mRNA 翻译成多肽。

[0058] 术语“基因”指参与产生多肽链的 DNA 片段;其包括在编码区之前和之后的区域(启动子和终止子)。此外,植物基因通常由被内含子中断的外显子组成。在转录成 RNA 之后,通过剪接除去内含子以产生成熟的信使 RNA (mRNA)。通常通过充当剪接过程的剪接信号的共有序列确定外显子和内含子之间的“剪接位点”,剪接过程由从初级 RNA 转录本删除内含子和在切除去内含子的任一侧连接或融合剩余 RNA 的末端组成。在一些情况下,可选或不同的剪接模式可以从同一单个 DNA 延伸段产生不同的蛋白质。天然基因被可以称为“内源基因”。

[0059] 本文使用的“异源”在指核酸时表示来源于外来物种的核酸,或者如果源于相同物种,则是通过人为干预在组成和 / 或基因组位点方面对其天然形式进行充分修饰的核酸。

[0060] 本文使用的术语“萌芽 (germination)”表示大麦粒在各种组合物中,例如在见于自然界的普通土壤中开始或恢复生长。因此,萌芽胚是正在萌芽的胚。萌芽也可以在置于培养室等的盆内土壤中进行,或者,例如可以在置于标准实验室皮氏培养皿的湿过滤纸上进行,或者在发芽 (malting) 的过程中进行(例如麦芽制造厂的浸泡罐或萌芽盒内进行)。按照一般理解,萌芽包括麦粒的水合作用、麦粒的膨胀和诱导胚生长。影响萌芽的环境因素包括湿度、温度和氧水平。观察根和芽的发育。

[0061] 本文使用的术语“分离 (的)”表示所述物质是从其原始环境中移出的。例如,存在于活生物中的天然存在的多核苷酸或者多肽不是分离的,而与天然系统中的一些或全部共存物质分开的相同多核苷酸或多肽是分离的。这种多核苷酸可以是载体的一部分和 / 或这种多核苷酸或者多肽可以是组合物的一部分,但它们仍然是分离,原因是这种载体或组合物不是其天然环境的一部分。

[0062] 术语“麦粒”被定义为包括谷类颖果,也称为内部种子 (internal seed)、外稃和内稃。在大多数大麦品种中,外稃和内稃附着于颖果上,而且是脱粒后的麦粒的一部分。但是,还存在裸麦 (naked barley) 品种。在这些品种中,颖果没有外稃和内稃,因此像小麦一样脱粒。术语“麦粒”和“谷粒”在本文中可交互。

[0063] “谷粒发育”是指开始于花粉细胞对卵细胞受精的过程。在受精过程中,借助或不借助液泡寻靶 (vacuole targeting) 而将代谢储备物(例如糖、寡糖、淀粉、酚类、氨基酸和蛋白)储藏至麦粒(谷粒)的各种组织,例如胚乳、外种皮、糊粉和角质鳞片,由此导致麦粒(谷粒)膨胀,麦粒(谷粒)饱满,并且结束于麦粒(谷粒)干燥。

[0064] 术语“功能完全丧失”(完全丧失功能)是指缺乏给定酶活性。因此,LOX-1 和 LOX-2 活性“功能完全丧失”的大麦植物是没有可检测到的 LOX-1 和 LOX-2 活性的大麦植物。虽然 LOX-1 和 LOX-2 可具有其它活性,但在本发明中,LOX-1 和 LOX-2 活性是通过测定由亚油酸形成 9-HPODE 和 13-HPODE 的试验过程确定的。优选地,按照下文实施例 4 的描述测定由亚油酸形成的 9-HPODE 和 13-HPODE。应该利用萌芽胚的蛋白提取物测定所述活性。在本发明中,当利用亚油酸作为底物,产生出的色谱峰对应于小于 5%、优选小于 3%的图 5A 所示的标准品 9-HPODE 峰,和 / 或产生出的色谱峰对应于小于 5%,优选小于 3%的图 5A 所示的标准品 13-HPODE 峰,则认为在使用实施例 4 所述的试验时,没有可检测到的 LOX-1 和 LOX-2 活性。实现 LOX 活性功能完全丧失的分子方法包括产生引起所述酶的转录本完全缺失或相应的编码酶完全缺失的突变,或者产生使所编码的酶完全失活的突变。

[0065] 术语“LOX-1 活性”是指大麦 LOX-1 酶的酶活性。特别地,在本发明中,“LOX-1 活性”是由亚油酸至 9-HPODE 且较小程度地至 13-HPODE 的酶促双加氧作用。尽管 LOX-1 能够催化其它反应,但为了确定本发明的 LOX-1 的活性,仅应考虑形成 9-HPODE 和 13-HPODE 的活性。图 2 概述了亚油酸被转化为 9-HPODE 的生化通路。

[0066] 术语“LOX-2 活性”是指大麦 LOX-2 酶的酶活性。特别地,在本发明中,“LOX-2 活性”是由亚油酸至 13-HPODE 且较小程度至 9-HPODE 的酶促双加氧作用。尽管 LOX-2 能够催化其它反应,但为了确定本发明的 LOX-2 的活性,仅应考虑形成 13-HPODE 和 9-HPODE 的活性。图 2 概述了亚油酸被转化为 13-HPODE 的生化通路。

[0067] 术语“麦芽饮料”或者术语“基于麦芽的饮料”是指利用麦芽制备的饮料,优选通过包括用热水温育麦芽的步骤的方法制备的饮料。麦芽饮料可以为,例如啤酒或无酒精麦芽饮料(maltins)。

[0068] 术语“发酵的麦芽饮料”是指已经发酵的,即与酵母温育的麦芽饮料。

[0069] “(麦粒)发芽”是在包括但不限于麦芽制造厂的浸泡池和萌芽箱内的受控环境条件下进行的特殊萌芽形式。根据本发明的方法,发芽在浸泡大麦粒期间和 / 或已经浸泡大麦粒之后开始发生。可以通过干燥大麦粒,例如在烘干过程中停止发芽过程。在还没有烘干的情况下,麦芽被称为“绿色麦芽”。应理解,由双无效 LOX 大麦制备的麦芽组合物包含双无效 LOX 麦芽,例如纯的双无效 LOX 麦芽或者包含双无效 LOX 麦芽的任何麦芽混合物。可以对麦芽进行加工,例如通过碾磨而加工,并由此被称为“经碾磨的麦芽”或“面粉”。

[0070] “糖化”是经碾磨的麦芽在水中的温育。优选在特定温度和特定体积的水中进行糖化。水的温度和体积是重要的,因为其影响来源于麦芽的酶活性的下降速率,并由此特别影响能够发生的淀粉水解的量;蛋白酶作用也可具有重要性。糖化可以在辅料存在下发生,应该理解辅料包含除麦芽以外的任何碳水化合物源,例如但不限于作为完整麦粒或者经加工的产品(例如粗面粉或淀粉)的大麦(包括双无效 LOX 大麦)、大麦糖浆或玉米或水稻。上文提及的所有辅料都主要用作提取物的其它来源(在麦芽汁煮沸的过程中常添加糖浆)。酿酒厂内辅料的加工要求取决于使用的辅料的状态和类型,并且特别是淀粉胶化或液化的温度。如果胶化温度超过正常的麦芽糖化温度,则淀粉在添加至醪液(mash)中之前就被胶化和液化。

[0071] “突变”包括基因的编码和非编码区的缺失、插入、取代、颠换(transversion)和点突变。缺失可以是整个基因或者仅基因的一部分的缺失,其中,非编码区优选为启动子区或

者终止区或者内含子。点突变可涉及一个碱基或者一个碱基对的变化,并且可产生终止密码子、移框突变或氨基酸取代。体细胞突变是指仅发生在植物的某些细胞或组织中的且不遗传至下一代的那些突变。生殖细胞突变可以见于植物的任何细胞中并且是遗传的。参考本文的图 1,其显示了在育种程序中如何繁殖突变大麦谷粒的概述,M3 代谷粒和其直接繁殖的谷粒或者包括其植物在内的任意子代可以称为“原始突变体 (raw mutant)”。此外,仍然参照本文图 1,术语“育种系”是指 M4 代的谷粒和包括其植物在内的任意子代,其可能是与栽培品种植物的杂交结果,或者是与具有单独的特定特征的另一育种系杂交的结果。

[0072] 术语“无效 LOX(或 LOX 无效)”是指 LOX 编码基因中存在引起所编码的 LOX 酶 (LOX-1 或 LOX-2) 的功能完全丧失的突变。在 LOX 编码基因中产生提前终止(无义)密码子的突变仅代表能够实现 LOX 活性功能完全丧失的一种机制。实现 LOX 酶的功能完全丧失的分子方法包括产生引起所述酶的转录本完全缺失的突变,或者引起所编码的酶完全失活的突变。与植物有关的“无效 LOX(或 LOX 无效)”是指指定 LOX 酶的功能完全丧失的植物。

[0073] “可操作地连接”是用以指两个或更多个核酸片段在单个多核苷酸上的关联,从而使一个片段的功能受另一个的影响的术语。例如,当启动子能够影响编码序列的表达,即编码序列位于启动子的转录控制下时,启动子可操作地与编码序列连接。可以以正义或反义方向将编码序列可操作地与调节序列连接。

[0074] “PCR”或“聚合酶链式反应”是本领域技术人员熟知的用于扩增特定 DNA 片段的技术 (Mullis, K. B. 等人的美国专利第 4,683,195 和 4,800,159 号)。

[0075] “植物”或“植物材料”包括植物细胞、植物原生质体和可以再生出大麦植物的植物细胞组织培养物,包括植物愈伤组织和在植物中的完整植物细胞,或植物部分,例如胚、花粉、胚珠、花、麦粒、叶、根、根尖、花药,或植物的任何部分或产品。

[0076] 术语“植物产品”表示由植物或植物部分的加工产生的产品。因此例如,所述植物产品可以是麦芽、麦芽汁、发酵或未发酵饮料、食品或饲料产品。

[0077] 本文使用“重组体”涉及蛋白时表示源于外来物种的蛋白,或者如果来源于相同物种,则表示通过有意的人为干预对其天然形式的组成进行充分修饰的蛋白。

[0078] 本申请含义内的“啤酒品尝专家小组”是在品尝和表述啤酒风味(主要集中于醛、纸样味道和陈旧 (old) 味道)方面受过全面训练的专家小组。虽然存在许多用于评价风味成分的分析工具,但难以通过分析来评价风味活性组分的相对显著性。但是,此类复杂的性质可以由品尝专家进行评价。品尝专家的持续训练包括品尝并评价标准啤酒样本。

[0079] 术语“剪接位点”表示基因的外显子和内含子之间的界限。因此,剪接位点可以是外显子至内含子的边界(被称为“供体位点”),或者是从外显子分隔内含子的边界(被称为“受体位点”)。植物的剪接位点通常包括共有序列。内含子的 5' 末端通常由保守性 GT 二核苷酸 (mRNA 中为 GU) 组成,内含子的 3' 末端通常由保守性二核苷酸 AG 组成。因此,内含子的 5' 剪接位点包含内含子的 5' 末端,而 3' 剪接位点包含内含子的 3' 末端。优选地,在本发明中,内含子的剪接位点是由内含子的最 5' 端的二核苷酸(通常为 GT) 组成的 5' 剪接位点,或者由内含子的最 3' 端的二核苷酸(通常为 AG) 组成的 3' 剪接位点。

[0080] 除非另有指明,否则“T2N”表示游离形式的反式-2-壬烯醛(T2N)。T2N 有时还指 2-E-壬烯醛。

[0081] 术语“T2N 潜能 (T2N potential)”描述的是能够在一个或多个反应中释放 T2N,或

者被转化成 T2N 的化学物质。在本发明中, T2N 潜能被定义为在 100°C、pH4.0 温育 2 小时的过程中释放至溶液, 例如麦芽汁或者啤酒中的 T2N 的浓度。实际上, 测定起始 T2N 浓度, 之后使溶液在 100°C、pH4 温育 2 小时, 然后测定 T2N 浓度。起始 T2N 浓度和最终 T2N 浓度之间的差异被称为 T2N 潜能。热处理、酸性处理引起 T2N 潜能例如“T2N 加合物”释放 T2N, 其中 T2N 加合物用以描述与一种或多种物质, 包括但不限于蛋白、亚硫酸盐、细胞碎片或细胞壁等结合的 T2N。T2N 加合物本身通常不会被人感觉为异味。但是, 从所述 T2N 加合物释放的 T2N 可以产生异味。

[0082] “组织培养物”表示包含相同或不同类型的分离细胞的组合物, 和组织成为植物的部分(例如原生质体、愈伤组织、胚、花粉和花药等)中的那些细胞的集合。

[0083] “转化”指将 DNA 插入生物体中以便将 DNA 作为染色体外元件(没有整合并稳定遗传)或染色体组成部分(在遗传学上稳定遗传)保持。除非另有说明, 否则本文用于转化大肠杆菌的方法是基于 CaCl_2 的方法(Sambrook and Russel, 见上文)。为了转化大麦, 除了使用另一个栽培种类作为宿主外, 优选按照 Tingay 等人(1997)和 Wang 等人(2001)的描述进行农杆菌介导的转化。

[0084] “转基因”是通过转化过程导入基因组的基因。

[0085] 本文使用的“转基因的”包括是指已经通过引入异源核酸而被修饰的细胞, 或由如此修饰的细胞衍生而来的细胞。因此, 例如, 转基因细胞表达未以相同形式见于天然形式的细胞中的基因, 或者表达由于有意的人为干预而异常表达、低表达或不表达的天然基因。本文使用的与植物, 特别是大麦植物有关的术语“转基因”不包括通过传统植物育种方法, 例如基于 NaN_3 的诱变, 以及通过没有刻意人工干预的天然发生事件产生的细胞改变。

[0086] 术语“野生大麦”, 即 *Hordeum vulgare ssp. spontaneum* 被认为是当今栽培形式大麦的祖先。认为大麦从野生至栽培状态的转变与该植物向“大麦当地品种”的驯化同时发生。这些大麦当地品种在遗传上比野生大麦更接近于现代栽培品种。

[0087] 术语“野生(型)”大麦是指按照传统方式产生的大麦植物。优选地, 所述术语是指已经衍生出本发明大麦植物的大麦植物, 即亲本植物。野生型大麦粒通常可作为“栽培品种”或“变种/品种”(即那些由国家植物育种组织列出的在遗传上相似的麦粒)而获自例如种子公司。尽管可以获得几个 LOX-1 无效大麦栽培品种(例如 cv. Chamonix 和 cv. Charmay), 但为了更好地理解本发明, 所有的 LOX-1 无效、LOX-2 无效和双无效 LOX 植物在本文中都被认为是突变植物而非野生型植物。术语“栽培品种”和“变种”在本文中可互换使用。

[0088] 术语“麦芽汁”表示麦芽, 例如碾磨麦芽或绿色麦芽或者碾磨的绿色麦芽的液体提取物。在大麦酿造中, 麦芽汁还可以通过将未发芽大麦的提取物与水解大麦成分的酶混合物一起温育而制备。除所述麦芽或源自大麦的提取物外, 还可以由麦芽和额外的成分, 例如部分转化为可发酵糖的其它含淀粉物质制备所述液体提取物。麦芽汁通常通过糖化, 随后任选的“喷射提取(sparging)”(即在用热水糖化后从用过的谷粒提取残留糖和其它化合物的过程)而获得。喷射提取通常在滤桶、麦芽浆过滤器或可以从用过的谷粒分离提取水的另一种设备内进行。糖化后获得的麦芽汁通常被称为“第一麦芽汁”, 而喷射提取后获得的麦芽汁通常被称为“第二麦芽汁”。如非特别指明, 术语麦芽汁可以是第一麦芽汁、第二麦芽汁或者二者的组合。在啤酒生产过程中, 麦芽汁通常与酒花一起煮沸。没有与酒花一起

煮沸的麦芽汁还可以称为“甜麦芽汁”，而与酒花一起煮沸的麦芽汁可被称为“煮沸的麦芽汁”。

[0089] 大麦植物

[0090] 大麦是一类植物。“野生大麦”(Hordeum vulgare ssp. Spontaneum) 被认为是当今栽培大麦的祖先。认为大麦从野生态至栽培态的转变与多个基因座的等位基因频率的重要变化同时发生。农场主积极选择稀少的等位基因和新突变事件，并很快在称作“大麦当地品种”的驯化植物群体中确立新特征。与野生大麦相比，这些大麦在遗传上与现代栽培品种更密切相关。直至十九世纪晚期，大麦当地品种才作为近交系和杂种分离的高度异源混合物出现，其包括由较早世代的随机杂交而来的少数植物。在现代农业中，大多数当地品种已经被纯系栽培品种取代。剩余当地品种的特征在于中等水平或高水平的遗传多样性。最初，“现代大麦”栽培品种代表了自当地品种的选择。后来，这些栽培品种来源于确定的纯系，例如不同地理来源的纯系之间连续多轮的杂交。最后，导致在许多，也可能是所有现代农作物的遗传基础显著缩小。与当地品种相比，现代大麦栽培品种有多个改良的性质 (Nevo, 1992 ; von Bothmer 等人, 1992)，例如但不限于以下：

- [0091] (i) 隐藏和裸露的麦粒；
- [0092] (ii) 种子休眠；
- [0093] (iii) 抗病性；
- [0094] (iv) 环境耐受性（例如对干旱或土壤 pH 的耐受性）；
- [0095] (v) 赖氨酸和其它氨基酸的比例；
- [0096] (vi) 蛋白含量；
- [0097] (vii) 氮含量；
- [0098] (viii) 碳水化合物组成；
- [0099] (ix) 大麦醇溶蛋白的含量和组成；
- [0100] (x) (1-3, 1-4)- β -葡聚糖和阿拉伯糖基本聚糖的含量；
- [0101] (xi) 产率
- [0102] (xii) 麦秆硬度；
- [0103] (xiii) 株高。

[0104] 在本发明中，术语“大麦植物”包括任何大麦植物。因此，本发明涉及包含导致 LOX-1 活性功能完全丧失的第一突变和导致 LOX-2 活性功能完全丧失的第二突变的任何大麦植物。因此，本发明涉及包含导致功能性 LOX-1 酶完全丧失的第一突变和导致功能性 LOX-2 酶完全丧失的第二突变的任何大麦植物。

[0105] 然而，优选用于本发明的大麦植物是现代大麦栽培品种或纯系。本发明使用的大麦栽培品种可以是，例如选自 Sebastian、Celeste、Lux、Prestige、Saloon、Neruda、Harrington、Klages、Manley、Schooner、Stirling、Clipper、Franklin、Alexis、Blenheim、Ariel、Lenka、Maresi、Steffi、Gimpel、Cheri、Krona、Camargue、Chariot、Derkado、Prisma、Union、Beka、Kym、Asahi 5、KOU A、Swan Hals、Kanto Nakate Gold、Hakata No. 2、Kirin-choku No. 1、Kanto late Variety Gold、Fuji Nijo、New Golden、Satukio Nijo、Seijo No. 17、Akagi Nijo、Azuma Golden、Amagi Nijpo、Nishino Gold、Misato golden、Haruna Nijo、Scarlett 和 Jersey 组成的组，优选来自 Haruna Nijo、Sebastian、Celeste、

Lux、Prestige、Saloon、Neruda 和 Power 组成的组,优选来自 Harrington、Klages、Manley、Schooner、Stirling、Clipper、Franklin、Alexis、Blenheim、Ariel、Lenka、Maresi、Steffi、Gimpel、Cheri、Krona、Camargue、Chariot、Derkado、Prisma、Union、Beka、Kym、Asahi 5、KOU A、Swan Hals、Kanto Nakate Gold、Hakata No. 2、Kirin-choku No. 1、Kanto late Variety Gold、Fuji Nijo、New Golden、Satukio Nijo、Seijo No. 17、Akagi Nijo、Azuma Golden、Amagi Nijpo、Nishino Gold、Misato golden、Haruna Nijo、Scarlett 和 Jersey 组成的组,优选来自 Haruna Nijo、Sebastian、Tangent、Lux、Prestige、Saloon、Neruda、Power、Quench、NFC Tipple、Barke、Class 和 Vintage 组成的组。

[0106] 因此,在本发明的一个实施方式中,所述大麦植物是包含导致 LOX-1 活性功能完全丧失(例如功能性 LOX-1 酶完全丧失)的第一突变和导致 LOX-2 活性功能完全丧失(例如功能性 LOX-2 酶完全丧失)的第二突变的当代大麦栽培品种(优选选自上文描述的大麦栽培品种组的栽培品种)。因此,在该实施方式中,优选所述大麦植物不是大麦当地品种。

[0107] 所述大麦植物可以是任何适合的形式。例如,本发明的大麦植物可以是能活的大麦植物、干燥的植物、均质化的植物或者经碾磨的大麦粒。所述植物可以是成熟的植物、胚、萌芽的麦粒、发芽的麦粒或经碾磨的发芽麦粒等。

[0108] 大麦植物的部分可以是所述植物的任何合适的部分,例如麦粒、胚、叶、茎、根、花或其小部分(fraction)。所述小部分可以是,例如麦粒、胚、叶、茎、根或花的部分。大麦植物的部分还可以是匀浆的小部分或者经碾磨的大麦植物或麦粒的小部分。

[0109] 在本发明的一个实施方式中,大麦植物的部分可以是所述大麦植物的细胞,优选可以在体外组织培养物中繁殖的活细胞。特别地,在一个实施方式中,所述细胞可以是不能成熟为完整大麦植物的细胞,即不是生殖物质的细胞。

[0110] LOX 活性功能的丧失

[0111] 本发明涉及具有第一突变和第二突变的大麦植物或其部分或其植物产品,其中所述第一突变导致 LOX-1 活性功能完全丧失,所述第二突变导致 LOX-2 活性功能完全丧失。因此,例如,第一突变导致功能性 LOX-1 酶完全丧失,第二突变导致功能性 LOX-2 酶完全丧失。

[0112] LOX-1 活性功能完全丧失(例如功能性 LOX-1 酶完全丧失)和 LOX-2 活性功能完全丧失(例如功能性 LOX-2 酶完全丧失)可独立地基于不同的机制。例如,LOX-1 活性和 LOX-2 活性中的一个或两个的功能完全丧失可以由大麦植物中的异常蛋白,即异常 LOX-1 和 / 或 LOX-2 蛋白引起,例如由没有可检测到的 9-HPODE 形成活性的突变 LOX-1 蛋白(例如按照实施例 4 中的描述进行测定)引起,和 / 或由没有可检测到的 13-HPODE 形成活性的突变 LOX-2 蛋白(例如按照实施例 4 中的描述进行测定)引起。

[0113] LOX-1 活性和 LOX-2 活性中的一个或两个的功能完全丧失可以由 LOX-1 蛋白和 / 或 LOX-2 蛋白的缺乏引起。明显地,LOX-1 蛋白的缺乏将导致功能性 LOX-1 酶丧失,而 LOX-2 蛋白的缺乏将导致功能性 LOX-2 酶完全丧失。因此,所述大麦植物可优选不包含,或仅包含非常少的 LOX-1 和 / 或 LOX-2 蛋白,更优选其中没有可检测到的 LOX-1 和 / 或 LOX-2 蛋白。LOX-1 和 / 或 LOX-2 蛋白可以由本领域技术人员已知的任何合适的方式进行检测。然而,优选通过其中利用 LOX-1 和 LOX-2 的特异性抗体(例如 LOX-1 和 LOX-2 的多克隆抗体)检测 LOX-1 蛋白的技术对所述蛋白进行检测。所述技术可以是,例如 Western 印迹或 ELISA。所述抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。然而,优选所述抗体为分别识别 LOX-1 和 LOX-2

蛋白中的数个不同表位的多克隆抗体。还可以间接检测 LOX-1 和 / 或 LOX-2 蛋白,例如通过测定 LOX-1 活性的方法,或者通过测定 LOX-2 活性的方法。在本发明的一个优选实施方式中,利用国际专利申请 WO 2005/087934 的实施例 4 中列出的方法检测 LOX-1 蛋白。可以利用与 LOX-2 结合的抗体以类似的方式检测 LOX-2 蛋白。

[0114] LOX-1 活性和 LOX-2 活性中的一个或两个的功能完全丧失还可以是没有或几乎没有表达 LOX-1 转录本和 / 或 LOX-2 转录本的结果,优选是没有表达 LOX-1 转录本和 / 或 LOX-2 转录本。本领域技术人员理解 LOX-1 或 LOX-2 转录本的缺失也将分别导致 LOX-1 或 LOX-2 翻译蛋白的缺失。或者, LOX-1 活性和 LOX-2 活性中的一个或两个的功能完全丧失(例如功能性 LOX-1 和 LOX-2 酶完全丧失)也可以是表达异常的 LOX-1 转录本和 / 或异常的 LOX-2 转录本的结果。异常的 LOX-1 和 / 或 LOX-2 转录本可能是由转录本的异常剪接导致的,例如由于剪接位点的突变。因此,本发明的大麦植物可以具有位于剪接位点中的突变,例如位于 5' 剪接位点或 3' 剪接位点中,例如在内含子最 5' 端的一个或两个核苷酸中,或者在内含子最 3' 端的核苷酸之一中。LOX-1 转录本具有异常剪接的突变的实例为 WO2005/087934 中描述的突变体 A618。编码 LOX-1 或 LOX-2 的转录本的表达可以通过,例如 Northern 印迹或 RT-PCR 试验检测。

[0115] 本发明的大麦植物功能性 LOX-1 和 LOX-2 酶的完全丧失是由突变引起的。因此,本发明的大麦植物通常在 LOX-1 基因中具有突变。所述突变可以在调节区内,例如在启动子或内含子内,或者所述突变可以在编码区内。类似地,本发明的大麦植物通常在 LOX-2 基因中具有突变。所述突变可以在调节区内,例如在启动子或内含子内,或者所述突变可以在编码区内。因此,还可以通过鉴定 LOX-1 编码基因中或者 LOX-2 编码基因中的突变而检测功能性 LOX-1 和 / 或 LOX-2 酶完全丧失的原因。LOX-1 编码基因中的突变可以通过,例如对所述基因进行测序而检测。优选地,在鉴定所述突变后,通过测定 LOX-1 和 / 或 LOX-2 活性而验证功能的完全丧失。

[0116] 术语“LOX-1 蛋白”是指涵盖 WO 2005/087934 的 SEQ ID NO :3 或 WO2005/087934 的 SEQ ID NO :7 列出的大麦全长 LOX-1 蛋白或其功能同源物。LOX-1 的活性位点位于所述酶的 C 末端部分。特别地,认为跨越氨基酸残基 520-862 的区域或其部分与 LOX-1 活性有关。因此,在一个实施方式中,LOX-1 无效大麦优选包含编码缺失 LOX-1 氨基酸 520-862 中的部分或全部氨基酸的突变形式 LOX-1 的基因。所述突变 LOX-1 也可以缺失存在于野生型 LOX-1 中的其它氨基酸残基。

[0117] 因此,本发明的双无效 LOX 大麦可以包含非功能性的截短形式的 LOX-1,例如 N-末端或 C-末端被截短的形式。优选地,所述截短形式包含不超过 800 个,更优选不超过 750 个,甚至更优选不超过 700 个,还更优选不超过 690 个,甚至更优选不超过 680 个,还更优选不超过 670 个 LOX-1 的连续氨基酸,例如不超过 650 个,如不超过 600 个,例如不超过 550 个,如不超过 500 个,例如不超过 450 个,如不超过 425 个,例如不超过 399 个 WO2005/087934 的 SEQ ID NO :3 的 LOX-1 的连续氨基酸。优选地,所述截短形式仅包含 LOX-1 的 N 末端片段,优选最多 800 个,更优选最多 750 个,甚至更优选最多 700 个,还更优选最多 690 个,甚至更优选最多 680 个,还更优选最多 670 个,甚至更优选最多 665 个 WO 2005/087934 的 SEQ ID NO :3 的 N-末端氨基酸,如包含不超过 665 个,例如不超过 650 个,如不超过 600 个,例如最多 550 个,如最多 500 个,例如最多 450 个,如最多 425,例如最多 399 个 WO 2005/087934

的 SEQ ID NO :3 的 N- 末端氨基酸。

[0118] 在一个非常优选的实施方式中,所述截短形式可以由 WO 2005/087934 的 SEQ ID NO :3 的氨基酸 1-665 组成。

[0119] 在本发明的一个优选实施方式中,本发明的大麦植物包含被转录成 mRNA 的 LOX-1 编码基因,其中所述 mRNA 在野生型 LOX-1 mRNA 的终止密码子的上游包含无义密码子或者终止密码子。这种无义密码子在本文中被命名为提前终止的无义密码子。优选地,所述植物的所有转录成 mRNA 的 LOX-1 编码基因都包含提前终止的无义密码子或终止密码子。所述无义密码子或终止密码子优选位于起始密码子下游的最多 800 个,更优选最多 750 个,甚至更优选最多 700 个,还更优选最多 690 个,甚至更优选最多 680 个,还更优选最多 670 个,甚至更优选最多 665 个密码子处。编码 LOX-1 的野生型基因组 DNA 的序列示于 WO 2005/087934 的 SEQ ID NO :1 或者 WO2005/087934 的 SEQ ID NO :5。

[0120] 在一个优选的实施方式中,本发明的大麦植物包含编码 LOX-1 的基因,其中由所述基因转录的前 mRNA 包含与 WO 2005/087934 的 SEQ ID NO :2 对应的序列。

[0121] 在本发明的非常优选的实施方式中,本发明的双无效 LOX 大麦植物的突变 LOX-1 的编码基因包含无义突变,所述突变对应于 WO 2005/087934 的 SEQ ID NO :1 的第 3574 位的 G → A 取代。

[0122] 术语“LOX-2 蛋白”表示涵盖本申请 SEQ ID NO :5 列出的大麦全长 LOX-2 蛋白或其功能同源物。LOX-2 的活性位点位于 LOX-2 的 C 末端部分。特别地,认为跨越氨基酸残基 515-717 的区域或其部分与 LOX-2 的活性有关。根据大豆 LOX-1 晶体结构的检测,认为氨基酸残基 515-525 和 707-717 代表了大麦 LOX-2 酶的活性位点裂隙的序列延伸段。所翻译的突变 LOX-2 蛋白,即大麦双无效 LOX 突变体 A689 的 C- 末端截短形式,最多包含 684 个残基,并且因此缺失活性位点裂隙的第二序列延伸段,从而导致其失活。根据本发明的一个实施方式,本发明的双无效 LOX 大麦优选包含编码 LOX-2 的突变形式的基因,其中所述突变形式缺失 LOX-2 的氨基酸 515-717 中的一些或者全部氨基酸,优选缺失氨基酸 707-717 中的一些或全部氨基酸,甚至更优选缺失氨基酸 707-717 中的全部氨基酸。所述突变 LOX-2 还可以缺乏野生型 LOX-2 中存在的其它氨基酸残基。

[0123] 因此,双无效 LOX 大麦可包含非功能性的截短形式的 LOX-2,例如 N- 末端或 C- 末端被截短的形式。优选地,所述截短形式包含不超过 800 个,更优选不超过 750 个,甚至更优选不超过 725,还更优选不超过 700 个,甚至更优选不超过 690 个,还更优选不超过 684 个本申请的 SEQ ID NO :5 的 LOX-2 的连续氨基酸。优选地,所述截短形式仅包含 LOX-2 的 N- 末端片段。因此,优选所述截短形式包含最多 800 个,更优选最多 750 个,甚至更优选最多 725 个,还更优选最多 700 个,甚至更优选最多 690 个,还更优选最多 684 个本申请的 SEQ ID NO :5 的 N- 末端氨基酸。

[0124] 在一个非常优选的实施方式中,所述截短形式可以由本申请的 SEQ ID NO :5 的氨基酸 1-684 组成。

[0125] 在本发明的优选实施方式中,所述大麦植物包含被转录成 LOX-2 的 mRNA 的基因,其中所述 mRNA 在野生型 LOX-2 mRNA 的终止密码子的上游包含无义密码子或者终止密码子。这种无义密码子在本文中被命名为提前终止的无义密码子。优选地,所述植物的转录成编码 LOX-2 的 mRNA 的所有基因都包含提前终止的无义密码子或终止密码子。所述无义

密码子或终止密码子优选位于起始密码子下游的最多 800 个,更优选最多 750 个,甚至更优选最多 725 个,还更优选最多 700 个,甚至更优选最多 690 个,还更优选最多 684 个密码子处。编码 LOX-2 的野生型基因组 DNA 的序列示于本申请的 SEQ ID NO :1。

[0126] 在本发明的非常优选的实施方式中,所述双无效 LOX 大麦植物的突变 LOX-2 的编码基因包含无义突变,所述突变对应于 SEQ ID NO :1 的第 2689 位的 G → A 取代。

[0127] 本发明的大麦植物可以由本领域技术人员熟知的任何合适的方法制备,优选通过下文“双无效 LOX 大麦的制备”部分列出的方法之一制备。

[0128] 在本发明的一个实施方式中,优选本发明的双无效 LOX 大麦植物具有类似于野生型大麦的植物生长生理学和谷粒发育。因此,优选 LOX-1 无效大麦植物在株高、每株的分蘖数、开始开花和 / 或每穗的谷粒数方面类似于野生型大麦。

[0129] 此外,优选本发明的双无效 LOX 大麦植物在株高、抽穗期、抗病性、抗倒伏、穗破损、成熟时间和产量方面类似于野生型大麦,特别是类似于 cv. Barke。在本发明中,在表述数目的情况下,将“类似”理解为相同 ±10%。这些参数可以按照下文实施例 5 的描述进行测定。

[0130] 在本发明的非常优选的实施方式中,所述大麦植物是已在 2008 年 12 月 4 日将其种子以“大麦, *Hordeum vulgare* L. ;A689 系 (Barley, *Hordeum vulgare* L. ;Line A689)”的名称保藏在美国标准培养物保藏中心 (ATCC, 美国马纳萨斯 (VA 20110) 大学街 10801 号专利保藏处,保藏编号 PTA-9640) 的大麦植物。因此,本发明的大麦植物可以是大麦系 A689 (ATCC 专利保藏名称 :PTA-9640),或其任何子代大麦植物。

[0131] 制备大麦突变体

[0132] 本发明的大麦植物可以通过本领域技术人员已知的任何合适的方法制备。优选地,本发明的大麦植物通过包括以下步骤的方法制备:诱变大麦植物或其部分(例如大麦粒),然后筛选和选择特征在于 LOX-1 活性功能的完全丧失(例如功能性 LOX-1 酶完全丧失)和 LOX-2 活性功能的完全丧失(例如功能性 LOX-2 酶完全丧失)的大麦植物。在一个优选的实施方式中,所述大麦植物可以通过包括诱变大麦植物或其部分(例如大麦粒)的方法而制备,其中所述大麦植物已经具有引起功能性 LOX-1 酶完全丧失的突变。此类大麦植物描述在,例如国际专利申请 W02005/087934 中。

[0133] 在一个感兴趣的方面,本发明涉及新的且非常有效的筛选方法,其可以鉴定具有引起 LOX-2 活性完全丧失的突变的大麦植物。所述新的可重复的筛选方法可以鉴定没有 LOX-2 活性或者 LOX-2 活性非常低的大麦植物。这种新的筛选方法包括使用萌芽胚作为起始材料。有趣的是,根据多达 21,000 个成熟胚的筛选(其没有发现单个 LOX-2 无效大麦突变体),本发明人发现使用成熟胚作为筛选 LOX-2 活性的起始材料较不优选。

[0134] 因此,所述新筛选方法的一个重要特征涉及使用萌芽胚作为检测 LOX-2 活性的起始材料。

[0135] 因此,本发明的目标是提供制备双无效 LOX 大麦植物的方法,其包括以下步骤:

[0136] (i) 提供 LOX-1 活性功能完全丧失,例如功能性 LOX-1 酶完全丧失的大麦植物或其部分;和

[0137] (ii) 诱变所述大麦植物,和 / 或来自所述大麦植物的大麦细胞,和 / 或大麦组织,和 / 或大麦粒,和 / 或大麦胚,由此获得 M0 代大麦;和

[0138] (iii) 将所述诱变大麦植物、麦粒和 / 或胚培育至少 2 代, 由此获得 M_x 代的大麦植物, 其中 x 为 ≥ 2 的整数 ; 和

[0139] (iv) 获得所述 M_x 大麦植物的胚 ; 和

[0140] (v) 使所述胚萌芽 ; 和

[0141] (vi) 测定所述萌芽胚或其部分中的 LOX-1 和 LOX-2 活性 ; 和

[0142] (vii) 选择所述萌芽胚中 LOX-1 活性和 LOX-2 活性完全丧失的植物 ; 和

[0143] (viii) 分析 LOX-1 基因和 LOX-2 基因中的突变 ; 和

[0144] (ix) 选择在 LOX-1 基因和 LOX-2 基因中具有突变的植物 ;

[0145] 由此获得在 LOX-1 和 LOX-2 基因中具有引起 LOX-1 活性完全丧失和 LOX-2 活性完全丧失的突变的大麦植物。

[0146] 上述 LOX-1 活性完全丧失的大麦植物可以是, 例如 W02005/087934 中描述的 LOX-1 活性完全丧失的任意大麦植物, 优选 D112 突变体, 或其子代植物。

[0147] 上述列表中的步骤 (ii) 可以涉及诱变活的材料, 其选自大麦植物、大麦细胞、大麦组织、大麦粒和大麦胚组成的组, 优选选自大麦植物、大麦粒和大麦胚组成的组, 更优选大麦粒。

[0148] 可以通过任何适合的方法进行诱变。在一个实施方式中, 通过将诱变剂和大麦植物或其部分一起温育, 例如和大麦粒或来自大麦的单个细胞一起温育而进行诱变。这种诱变剂是本领域技术人员已知的, 包括但不限于叠氮化钠 (NaN₃)、甲磺酸乙酯 (EMS)、叠氮丙三醇 (AG, 3-叠氮 -1,2-丙二醇)、甲基亚硝基脲 (MNU) 和马来酰肼 (MH) 组成的组。

[0149] 在另一个实施方式中, 通过照射, 例如通过紫外线照射大麦植物或其部分, 例如麦粒来进行诱变。在本发明的优选实施方式中, 依照下文“化学诱变”部分中列出的任何方法进行诱变。合适的诱变方案的非限制实例公开在实施例 2 中。

[0150] 优选以以下方式进行诱变, 即在筛选 M₃ 代的大麦时, 期望突变体的预期频率达到每 10,000 谷粒最少 0.5 个, 例如 0.5-5 个的范围, 例如 0.9-2.3 个的范围。在优选的实施方式中, 对大麦粒进行诱变。用于诱变的麦粒命名为 M₀ 代 (另参见图 1)。

[0151] 可以在来自萌芽大麦胚的样本中, 优选在来自萌芽大麦胚的液体提取物中测定 LOX 活性。所述样本, 例如所述提取物可以由所述萌芽胚的任何合适部分制备。通常, 在制备所述样本的提取物和测定 LOX-2 活性前, 必须利用任何合适的方法对大麦样本进行匀质。特别地, 优选蛋白提取物由萌芽胚或其部分制备, 并且利用所述蛋白提取物测定 LOX 活性。可以利用, 例如机械力, 例如通过摇动或搅拌, 如通过在存在珠 (例如玻璃珠或沙珠) 的情况下振荡而进行匀质。

[0152] 在优选的实施方式中, 所述萌芽胚为 M_x 代的, 其中 x 是 ≥ 2 整数, 优选 x 是 2-10 的整数, 更优选是 3-8 的整数。在非常优选的实施方式中, 在 M₃ 代的萌芽胚中或者在源自此胚的样本中测定 LOX 活性。在该实施方式中, 优选培育 M₀ 代的诱变大麦粒以获得大麦植物, 并将所述大麦植物杂交以得到 M₁ 代麦粒。重复该过程直至获得 M₃ 代麦粒 (另参见图 1)。

[0153] 可以利用任何合适的试验进行 LOX 活性测定, 优选使用下文所列的方法之一。特别地, 优选所述试验产生关于通过 LOX-1 和 LOX-2 的双加氧作用将亚油酸转化成 9-HPODE 和 13-HPODE 的数据。因此, 所述试验通常包括以下步骤:

[0154] (i) 提供由萌芽大麦胚或其部分制备的蛋白提取物 ;和

[0155] (ii) 提供亚油酸 ;和

[0156] (iii) 将所述蛋白提取物和所述亚油酸一起温育 ;和

[0157] (iv) 测定亚油酸至 9-HPODE 和 13-HPODE 的双加氧作用。

[0158] 所述方法的步骤 (iv) 优选包括测定所述萌芽胚中, 优选由所述萌芽胚制备的蛋白提取物中的 9-HPODE 和 13-HPODE 水平。所述步骤可以包括直接或间接测定 9-HPODE 和 13-HPODE 的水平。可以测定所有 HPODE 的总水平, 在此情况下优选为了验证而进行 9-HPODE 和 13-HPODE 的专门测定。一个方法可以是, 例如其中使来自萌芽胚的蛋白提取物与作为底物的亚油酸一起温育用以形成 9-HPODE 和 13-HPODE 的方法。然后通过多种方法检测所述 HPODE。一个方法可以包括产生可检测到的化合物, 例如染料。例如, 所述方法可以是在血红素存在下由所形成的 HPODE 催化的 3- 二甲基氨基苯甲酸和 3- 甲基 -2- 苯并噻唑啉酮腺的氧化偶联, 以形成可以利用分光光度计在 A_{595} 测定的吲达胺染料。此方法的实例描述在下文的实施例 1 和 2 中。利用该实验, 认为小于 $0.2A_{595}$ 单位的吸光读数表示不存在 LOX-1 且不存在 LOX-2 活性。然而, 用于测定 LOX-1 和 LOX-2 活性的更精确的方法是使来自萌芽胚的蛋白提取物和亚油酸一起温育, 然后测定 9-HPODE 和 13-HPODE 的含量。9-HPODE 和 13-HPODE 的含量可以通过, 例如利用基于 HPLC 的分析而测定。

[0159] 可以直接或间接测定亚油酸至 9-HPODE 和 13-HPODE 的双加氧作用。本发明可以使用任何合适的测定方法。在本发明的一个实施方式中, 检测到亚油酸过氧化氢物。例如, 可以通过例如色谱法, 如实施例 4 描述的 HPLC 直接测定 9-HPODE 和 13-HPODE。

[0160] 本发明公开了用于从萌芽胚提取蛋白的方法的某些方面的显著重要性。因此, 优选利用酸性缓冲液, 优选 pH 为 2-6 的范围, 更优选 pH 为 3-5 的范围, 甚至更优选 pH 为 3.5-5 的范围, 还更优选 pH 为 4-5 的范围, 甚至更优选 pH 为 4.5 的酸性缓冲液提取所述蛋白。用于提取的缓冲液优选基于有机酸, 更优选乳酸缓冲液。最优选地, 利用 100mM 乳酸缓冲液 (pH4.5) 制备蛋白提取物。

[0161] 本发明的某些实施方式公开了用于检测 LOX-1 无效和 LOX-2 无效植物的方法, 所述方法包括 9-HPODE 和 13-HPODE 与染料 (例如 3- 甲基 -2- 苯并噻唑啉酮腺) 的反应。优选地, 在加入亚油酸之后将所述染料 (例如 3- 甲基 -2- 苯并噻唑啉酮腺) 加入到蛋白提取物中。优选地, 在使所述蛋白提取物与亚油酸接触至少 1 分钟, 更优选至少 5 分钟, 甚至更优选至少 10 分钟, 例如 1-60 分钟的范围, 例如 5-30 分钟的范围, 例如 10-20 分钟的范围后加入所述染料。

[0162] 优选用于选择本发明的大麦植物的方法详述在下文实施例 2 中。

[0163] 所述选择方法可经调整用于基于微滴定板的分析程序或允许快速筛选许多样本的其它已知的高通量重复测定方式。优选分析至少 5000 株, 例如至少 7500 株, 例如至少 10,000 株, 例如至少 15,000, 例如至少 20,000, 例如至少 25,000 诱变的大麦植物的 LOX-1 活性和 LOX-2 活性。

[0164] 可以通过数个不同的方法测定 LOX-1 编码基因中的突变。例如, 可以对 LOX-1 基因进行完全或部分地测序, 并且将其序列与 WO 2005/087934 的 SEQ ID NO :1 或者 WO 2005/087934 的 SEQ ID NO :5 比较。如果寻找特异突变, 可以采用 SNP 分析。本领域技术人员将能够设计可用于检测给定的特异突变的引物, 例如用于检测在 LOX-1 的编码序列内产

生提前终止密码子的突变（例如上文描述的任意提前终止密码子）的引物。如何进行 SNP 分析的一个实例描述在下文的实施例 10 中，其中的引物可用于检测在 LOX-1 基因的第 3474 位核苷酸的 G → A 突变。

[0165] 可以通过数个不同的方法测定 LOX-2 编码基因中的突变。例如，可以对 LOX-2 基因进行完全或部分地测序，并且序列与本申请的 SEQ ID NO :1 比较。如果寻找特定突变，可以采用 SNP 分析。本领域技术人员将能够设计可用于检测给定的特定突变的引物，例如用于检测在 LOX-2 的编码序列内产生提前终止密码子的突变（例如上文描述的任意提前终止密码子）的引物。如何进行 SNP 分析的一个实例描述在下文的实施例 10 中，其中的引物可用于检测在 LOX-2 基因的第 2689 位核苷酸的 G → A 突变。

[0166] 如上文该部分详述的双无效 LOX 大麦植物的制备方法的步骤 (viii) 和 (ix) 可以在步骤 (vi) 和 (vii) 之前进行，在这种情况下，所述方法将包括顺序依次为 (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(viii)、(ix)、(vi) 和 (vii) 的步骤，这种方法也包含在本发明的范围之内。特别地，当寻找特异突变时，例如在已经鉴定的双无效 LOX 大麦植物的子代植物中寻找特异突变时就是这种情况。

[0167] 一旦鉴定出在 LOX-1 基因中包含特定突变且在 LOX-2 基因中包含特定突变（例如上述任意突变）的双无效 LOX 大麦植物，即可以通过传统的育种方法，例如通过本领域技术人员熟知的那些方法产生具有相同突变的其它大麦植物。例如，所述双无效 LOX 大麦植物可以与另一个大麦栽培品种回交。

[0168] 在选择 LOX-1 和 LOX-2 功能完全丧失的有用大麦植物后，可以任选进行一个或多个额外的筛选。例如，可以进一步繁殖所选择的突变体，并且可以检测新一代的植物是否完全丧失功能性 LOX-1 和 LOX-2 酶。

[0169] 在选择有用的大麦植物后，可以对所述大麦植物进行育种，例如进行传统育种。育种方法描述在下文的“植物育种”部分。

[0170] 植物产品

[0171] 本发明涉及由双无效 LOX 大麦植物或其部分制备的，具有低 T2N 潜能水平的饮料或其它植物产品。

[0172] 因此，本发明涉及植物产品，所述植物产品可以是包含上述大麦植物或其部分的组合物，或者由所述大麦植物或其部分制备的组合物，例如由所述大麦植物或其部分制备的植物产品。由于所述大麦植物缺乏 LOX-1 和 LOX-2 活性，所述组合物通常包含非常低水平的 T2N 潜能。下文描述了包含或由具有导致 LOX-1 活性功能完全丧失（例如功能性 LOX-1 酶完全丧失）的第一突变和导致 LOX-2 活性功能完全丧失（例如功能性 LOX-2 酶完全丧失）的第二突变的大麦植物的有用组合物的实例。

[0173] 与以相同方式由野生型大麦植物（优选 cv. Power）制备的类似组合物相比，优选所述组合物包含：

[0174] (i) 小于 60%、甚至更优选小于 50%、还更优选小于 40%，例如小于 30%、优选小于 20%、更优选小于 10% 的游离 T2N；和 / 或

[0175] (ii) 小于 60%、甚至更优选小于 50%、还更优选小于 40%，例如小于 30%、优选小于 25% 的 T2N 潜能。

[0176] 根据组合物的类型，T2N 的具体减少可以不同。上述 T2N 的减少与组合物显著相

关,其中所述组合物选自麦芽、麦芽汁和老化饮料 (aged beverage) 组成的组。

[0177] 此外,与以相同方式由 W0 2005/087934 中描述的大麦突变体 D112 制备的类似组合物相比,优选所述组合物包含:

[0178] (i) 小于 80%、优选小于 70%、甚至更优选小于 60%,例如小于 50%的游离 T2N; 和 / 或

[0179] (ii) 小于 80%、优选小于 70%、甚至更优选小于 60%;例如小于 50%的 T2N 潜能。

[0180] 本发明一方面涉及具有导致 LOX-1 活性功能完全丧失 (例如功能性 LOX-1 酶完全丧失) 的第一突变和导致 LOX-2 活性功能完全丧失 (例如功能性 LOX-2 酶完全丧失) 的第二突变的大麦粒。本发明还涉及包含所述麦粒的组合物和由所述麦粒制备的组合物,以及由所述麦粒制备的植物产品。

[0181] 已经有描述称通过浸泡工序 (其中可以对大麦进行高温和 / 或乳酸处理),可降低大麦粒中脂加氧酶的活性。这种处理可具有其它的不利作用,例如降低期望的酶活性,例如植酸酶活性。此外,这种处理仅从进行热处理的时间点开始降低脂加氧酶活性,因此其不影响脂加氧酶产物在此前的积累。

[0182] 因此,在一个实施方式中,用于制备本发明的植物产品的方法不在至少 70°C 的温度下浸泡大麦粒。还优选用于制备本发明的植物产品的方法不在至少 57°C 的温度下在乳酸存在下浸泡大麦粒。

[0183] 一方面,本发明涉及通过发芽 (malting) 由双无效 LOX 麦粒制备的麦芽组合物。术语“发芽”应该理解为浸泡的大麦粒在受控制的环境条件下发生的萌芽 (例如图 3 的步骤 2 和 3 所例示的)。

[0184] 与以相同方式由野生型大麦植物 (优选 cv. Power) 制备的麦芽组合物相比,所述麦芽组合物优选包含小于 30%,更优选小于 20%,甚至更优选小于 10%的游离 T2N。更优选地,与以相同方式由 W0 2005/087934 中描述的 LOX-1 无效大麦突变体 D112 制备的麦芽组合物相比,所述麦芽组合物包含小于 60%,更优选小于 50%的游离 T2N。还优选与以相同方式由野生型大麦植物 (优选 cv. Power) 制备的麦芽组合物相比,所述麦芽组合物包含小于 60%,优选小于 50%,更优选小于 40%,甚至更优选小于 30%,更优选小于 20%,甚至更优选小于 10%的 T2N 潜能。更优选地,与以相同方式由 W02005/087934 中描述的 LOX-1 无效大麦突变体 D112 制备的麦芽组合物相比,所述麦芽组合物包含小于 60%,更优选 50%的 T2N 潜能。麦粒发芽是受控的浸泡和萌芽,随后对大麦谷粒进行干燥,优选烘干 (kiln drying) 大麦谷粒的过程。在干燥前,浸泡和萌芽的大麦谷粒被称为“绿色麦芽”,其也可以代表本发明的植物产品。这一作业顺序对于引起谷粒改变的许多酶的合成都很重要,而谷粒改变是主要解聚死胚乳细胞的细胞壁以动员麦粒营养和激活其它解聚酶的过程。在随后的干燥过程中,由于化学褐色氧化反应而产生风味和颜色。虽然麦芽的主要用途用于饮料生产,但是也可将其用在其它工业工艺中,例如作为烘烤业的酶源,或者作为食品工业的调味剂和着色剂,例如麦芽或麦芽粉,或间接作为麦芽糖浆等。

[0185] 一方面,本发明涉及产生所述麦芽组合物的方法。所述方法优选包括以下步骤:

[0186] (i) 提供双无效 LOX 大麦粒;

[0187] (ii) 浸泡所述麦粒;

[0188] (iii) 在预定的条件下使浸泡的麦粒萌芽;

[0189] (iv) 干燥所述萌芽的麦粒；

[0190] 从而产生 LOX-1 活性和 LOX-2 活性完全丧失的麦芽组合物。例如可以由 Briggs 等人 (1981) 和 Hough 等人 (1982) 描述的任意方法产生所述麦芽。然而,本发明还可以使用适合产生麦芽的任何其它方法,例如用于产生特色麦芽的方法,包括但不限于焙烧 (roasting) 麦芽的方法。非限制实例描述在实施例 6 和 8 中。

[0191] 可以通过,例如碾磨,对麦芽进行进一步加工。因此,本发明的植物产品可以是任何种类的麦芽,例如未加工的麦芽,或者经碾磨的麦芽,或者其粉末。经碾磨的麦芽和其粉末包含麦芽的化学成分,和缺乏再萌芽能力的死细胞。

[0192] 另一方面,本发明的植物产品可以包含糖浆,例如大麦糖浆或大麦麦芽糖浆,乃至由其组成。所述植物产品还可以是大麦或麦芽的提取物。

[0193] 另一方面,本发明涉及植物产品的类型,其是由源自双无效 LOX 麦粒的麦芽组合物制备的麦芽汁组合物。所述麦芽可以仅由双无效 LOX 麦粒制备或由还包含其它麦粒的混合物制备。本发明还涉及利用(单独或混合有其它成分)的双无效 LOX 大麦或其部分制备的麦芽汁组合物。

[0194] 与以相同方式由野生型大麦植物(优选 cv. Power)制备的麦芽汁组合物相比,所述麦芽汁组合物优选包含小于 30%,更优选小于 20%,甚至更优选小于 10%的游离 T2N。更优选地,与以相同方式由 WO 2005/087934 中描述的大麦突变体 D112 制备的麦芽汁组合物相比,所述麦芽汁组合物包含小于 60%,更优选小于 50%的游离 T2N。还优选与以相同方式由野生型大麦植物(优选 cv. Power)制备的麦芽汁组合物相比,所述麦芽汁组合物优选包含小于 40%,更优选小于 30%,甚至更优选小于 25%的 T2N 潜能。更优选地,与以相同方式由 WO 2005/087934 中描述的大麦突变体 D112 制备的麦芽汁组合物相比,所述麦芽汁组合物包含小于 60%,更优选小于 50%的 T2N 潜能。

[0195] 所述麦芽汁可以为第一麦芽汁、和/或第二麦芽汁、和/或进一步的麦芽汁。所述麦芽汁组合物可以为甜麦芽汁、煮沸麦芽汁或其混合物。所述麦芽汁组合物还可以是大麦麦芽汁。麦芽汁组合物通常包含高含量的氨基氮和可发酵的碳水化合物,后者主要是麦芽糖。在图 3 中,步骤 4-6 例示了由麦芽制备麦芽汁的通用方法。通常,通过合并并温育麦芽汁和水,即糖化工艺制备麦芽汁。在糖化过程中,可以向所述麦芽/液体组合物补充额外的富含碳水化合物的辅助组分,例如经碾磨的麦芽、玉米或水稻辅料。未发芽的谷类辅料通常含有非常少或者不含活性酶,这使得补充麦芽或外源酶以提供糖转化所必需的酶至关重要。

[0196] 通常,通过碾磨麦芽从而使水可以在糖化阶段进入谷类颗粒,由此启动麦芽汁生产。所述糖化基本上是发芽过程的延续,并且伴有底物的酶分解。在糖化过程中,碾磨麦芽与液体部分,例如水一起温育。温育温度通常保持恒定(恒温糖化)或者逐渐升高。在任何一种情况下,在发芽和糖化中产生的可溶物质均被释放至所述液体部分中。随后的过滤将麦芽汁和残留的固体颗粒分离,后者还被称为“用过的谷粒”。所述麦芽汁还可以被称为“第一麦芽汁”。在喷射提取和过滤后,可以获得“第二麦芽汁”。通过重复所述方法可以制备进一步的麦芽汁。Briggs 等人(见上文)和 Hough 等人(见上文)描述了适合制备麦芽汁的方法的非限制性实例。

[0197] 已经描述了通过酶的热处理可以降低脂加氧酶活性。已经描述了可以对麦芽汁进

行热处理以降低脂加氧酶活性和 / 或在高温下进行糖化。然而,除了降低脂加氧酶活性外,热处理还具有其它不利影响,例如降低其它酶活性。此外,热处理仅从进行热处理的时间点开始降低脂加氧酶活性,因此不影响脂加氧酶产物在此前的积累。

[0198] 因此,在一个实施方式中,利用以下方法制备本发明的麦芽汁,其中初始糖化温度不超过 70℃,优选不超过 69℃,因此,例如初始糖化温度可以在 50-69℃的范围,例如在 55-69℃的范围,例如在 55-65℃的范围。还优选在糖化过程中,本发明的麦芽汁没有在 70℃或更高温度下持续大于 25 分钟,优选不大于 20 分钟,更优选不大于 15 分钟。如果糖化温度过高,将影响麦芽中的酶活性并可以降低,乃至消除期望的酶活性,从而将导致麦芽汁质量改变。

[0199] 可以将第一麦芽汁、第二麦芽汁和进一步的麦芽汁合并,随后将其煮沸。未煮沸的麦芽汁,无论是纯的第一麦芽汁还是合并的麦芽汁,都被称为“甜麦芽汁”,而煮沸之后,可将其称为“煮沸的麦芽汁”。如果麦芽汁将用于生产啤酒,则通常在煮沸前加入酒花。

[0200] 还可以通过将双无效 LOX 大麦植物或其部分(例如未发芽的双无效 LOX 麦粒或其部分,特别是经碾磨的未发芽双无效 LOX 麦粒或其部分)和一种或多种合适的酶(例如酶组合物或者酶混合组合物,如 Cereflo、Ultraflo 或 Ondea Pro (Novozymes))一起温育,而制备麦芽汁组合物。用于从由此制备的麦芽汁生产饮料的方法也可以被称为“大麦酿造”,而其麦芽汁组合物被称为“大麦麦芽汁”或“大麦酿造的”麦芽汁。还可以利用麦芽和未发芽大麦植物或其部分,或者仅利用未发芽的大麦制备麦芽汁组合物,任选在所述制备过程中加入一种或多种合适的酶,特别是淀粉酶、葡聚糖酶[优选(1-4)-和/或(1-3,1-4)-β-葡聚糖酶],和/或木聚糖酶(例如阿拉伯木聚糖酶),和/或蛋白酶,或者包含一种或多种上述酶的酶混合物,例如在所述制备过程中加入酶混合物 Ondea Pro (Novozymes)。

[0201] 在本发明实施方式的一个方面,本发明的麦芽汁组合物是大麦麦芽汁,例如煮沸的大麦麦芽汁,即通过将未发芽(并优选经过碾磨)的双无效 LOX 麦粒和水一起温育来制备的麦芽汁,优选通过糖化和喷射提取制备的麦芽汁。这种大麦麦芽汁的特征在于 T2N 和 T2N 潜能的水平极低。因此,与以相同方式由野生型大麦植物(优选 cv. Power)制备的大麦麦芽汁组合物相比,所述大麦麦芽汁优选包含小于 50%,更优选小于 40%,甚至更优选小于 30%的游离 T2N。更优选地,与以相同方式由 WO 2005/087934 中描述的大麦突变体 D112 制备的麦芽汁组合物相比,所述麦芽汁组合物包含小于 70%,更优选小于 60%的游离 T2N。此外,当所述麦芽汁被调整至 13-16° p 的范围,优选 14-15° p 的范围,更优选至 14.5° p 时,优选所述大麦麦芽汁包含最多 0.15ppb 游离 T2N。此外还优选与以相同方式由野生型大麦植物(优选 cv. Power)制备的大麦麦芽汁组合物相比,所述大麦麦芽汁优选包含小于 50%,更优选小于 40%,甚至更优选小于 30%的 T2N 潜能。还优选与以相同方式由野生型大麦植物(优选 cv. Power)制备的大麦麦芽汁组合物相比,所述大麦麦芽汁优选包含小于 50%,更优选小于 40%,甚至更优选小于 30%的 T2N 前体。

[0202] 本发明还涉及植物产品,其可以是包含双无效 LOX 大麦植物或其部分的食物组合物、饲料组合物以及香料组合物(fragrance raw material composition)。食物组合物可以是,例如但不限于发芽或未发芽的大麦粒、大麦粗粉、面包、粥、包含大麦的谷类混合物、保健品如包含大麦的饮料、大麦糖浆,以及薄片状、碾碎的或挤出的大麦组合物。饲料组合物包括例如,包含大麦粒和/或粗粉的组合物。下文将对香料组合物进行描述。

[0203] 本发明还涉及本发明组合物的混合物。例如,本发明一方面涉及通过以下物质的混合物制备的组合物:

[0204] (i) 包含大麦植物或其部分的组合物,其中所述大麦植物或其部分包含导致 LOX-1 活性功能完全丧失(例如功能性 LOX-1 酶完全丧失)的第一突变和导致 LOX-2 活性功能完全丧失(例如功能性 LOX-2 酶完全丧失)的第二突变;和

[0205] (ii) 由双无效 LOX 麦粒制备的麦芽组合物。

[0206] 在优选的方面,本发明涉及饮料,更优选涉及麦芽饮料,甚至更优选涉及发酵饮料,例如发酵麦芽饮料,优选醇饮料,例如具有稳定的感官品质的啤酒,其中所述饮料是使用双无效 LOX 大麦或其部分制备的。由此,在本发明的一个优选的实施方式中,优选通过发酵双无效 LOX 大麦或其部分或其提取物,例如通过发酵来自双无效 LOX 麦芽的麦芽汁(单独或与其它成分组合)而制备所述饮料。

[0207] 然而,在本发明的其它实施方式中,所述饮料为未发酵的饮料,例如麦芽汁,优选由双无效 LOX 麦芽制备的麦芽汁。所述饮料可以由未发芽大麦植物或其部分制备,这也包括在本发明中。

[0208] 所述饮料可以是无醇饮料,例如无醇啤酒或其它种类的无醇饮料,例如无醇麦芽饮料,例如无酒精麦芽饮料(maltina)。

[0209] 然而,优选所述饮料由用双无效 LOX 大麦粒制备的麦芽组合物制备。更优选地,所述饮料是啤酒,其可以是本领域技术人员已知的任何种类的啤酒。在一个实施方式中,所述啤酒是,例如储藏啤酒。优选使用包含萌芽的双无效 LOX 大麦的麦芽组合物酿造啤酒,更优选所述啤酒是利用仅由萌芽的双无效 LOX 大麦制备的麦芽组合物酿造的。然而,所述麦芽组合物还可以包含其它成分,例如其它萌芽或未萌芽的谷类,例如野生型大麦、LOX-1 无效大麦、小麦和/或黑麦,或者含糖的未萌芽原料或源自发芽或未发芽原料的组合物,包括糖浆组合物。然而,优选地,用于制备所述啤酒的所有大麦,例如所有发芽和/或未发芽的大麦和/或萌芽和/或未萌芽大麦优选是双无效 LOX 大麦。

[0210] 在优选的实施方式中,本发明的饮料是优选地通过发芽和任选喷射提取而由用烘干麦芽制备的麦芽汁生产的啤酒。这种啤酒在本文中也称作为“发芽的”。然而,本发明的饮料还可以由大麦麦芽汁制备。这种啤酒还被称为“大麦啤酒”。

[0211] 在优选的实施方式中,与以相同方式由野生型大麦(优选 cv. Power)制备的饮料的 T2N 潜能相比,本发明的饮料包含小于 50%,优选小于 40%,更优选小于 35%,例如小于 30%的 T2N 潜能。还优选与以相同方式由 LOX-1 无效大麦突变体(优选 W0 2005/087934 中描述的大麦突变体 D112)制备的饮料相比,本发明的饮料包含小于 70%,优选小于 60%,例如小于 50%的 T2N 潜能。还优选,如果饮料所基于的原始提取物的 ° p 被调整至 10-12° p 的范围,更优选 11° p,则本发明的饮料包含最多 2ppb,更优选最多 1.5ppb,例如最多 1ppb 的 T2N 潜能。

[0212] 在优选的实施方式中,与以相同方式由野生型大麦(优选 cv. Power)制备的饮料的 T2N 前体相比,本发明的饮料包含小于 50%,优选小于 40%,更优选小于 35%,例如小于 30%的 T2N 前体。还优选与以相同方式由 W02005/087934 中描述的大麦突变体 D112 制备的饮料相比,本发明的饮料包含小于 70%,优选小于 60%,例如小于 50%的 T2N 前体。还优选,如果饮料所基于的原始提取物中的 ° p 被调整至 10-12° p 的范围,更优选 11° p,则本

发明的饮料包含最多 2ppb,更优选最多 1.5ppb,例如最多 1ppb 的 T2N 前体。

[0213] 在本发明的一个具体的实施方式中,所述饮料为大麦啤酒,与以相同方式由野生型大麦(优选 cv. Power)制备的大麦啤酒的 T2N 潜能相比,其包含小于 50%,优选小于 40%,更优选小于 35%的 T2N 潜能。在该实施方式中,还优选与以相同方式由野生型大麦(优选 cv. Power)制备的大麦啤酒的 T2N 前体相比,所述大麦啤酒包含小于 50%,优选小于 40%,更优选小于 35%的 T2N 前体。在该实施方式中,还优选本发明的大麦啤酒包含最多 2ppb,更优选最多 1.5ppb,甚至更优选最多 1.2ppb T2N 潜能。在该实施方式中,还优选,如果饮料所基于的原始提取物中的° p 被调整至 10-12° p 的范围,更优选 11° p,则本发明的大麦啤酒包含最多 2ppb,更优选最多 1.5ppb,甚至更优选最多 1.2ppb T2N 前体。

[0214] 在本发明的另一个具体的实施方式中,所述饮料是由麦芽制备的啤酒,其中与以相同方式由野生型大麦(优选 cv. Power)制备的啤酒的 T2N 潜能相比,所述啤酒包含小于 50%,优选小于 40%,更优选小于 30%的 T2N 潜能。在该实施方式中,还优选与以相同方式由野生型大麦(优选 cv. Power)制备的啤酒的 T2N 前体相比,所述啤酒包含小于 50%,优选小于 40%,更优选小于 30%的 T2N 前体。在该实施方式中,还优选本发明的啤酒包含最多 2ppb,更优选最多 1.5ppb,甚至更优选最多 1ppb T2N 潜能。在该实施方式中,还优选,如果饮料所基于的原始提取物中的° p 被调整至 10-12° p 的范围,更优选 11° p,则本发明的啤酒包含最多 2ppb,更优选最多 1.5ppb,甚至更优选最多 1ppb T2N 前体。

[0215] “感官品质”表示吸引人嗅觉和味觉的性质。通过例如经过培训的专家品尝小组对这些品质进行分析。优选地,所述品尝小组经过专门培训以识别醛异味,例如 T2N。通常,所述品尝小组由 3-30 位成员组成,例如 5-15 位,优选 8-12 位成员组成。所述品尝小组可以评价各种风味的存在,例如纸样、氧化、老化和面包样(bready)异味。与本发明有关,优选特别降低了纸样和/或老化异味。测定饮料的“感官品质”的方法描述在国际专利申请 W02005/087934 的实施例 6 中。测定饮料的“感官品质”的另一个优选方法描述在下文的实施例 8 和 9 中。在优选的实施方式中,稳定的感官品质至少部分是低水平的 T2N 或 T2N 潜能的结果。

[0216] 优选地,本发明的饮料的特征在于,与以相同方式由包含 LOX-1 和 LOX-2 活性的大麦植物制备的类似饮料相比,在 15-25°C 的范围,例如约 20°C 储藏至少 10 个月后的纸样味道较低。优选地,通过经过培训的品尝小组评价,所述纸样味道小于 90%,更优选小于 80%,例如小于 70%。

[0217] 还优选与由野生型大麦制备的类似饮料相比,本发明的饮料在提高的温度下储藏后的纸样味道较低。当如上文所述,由受过培训的专家品尝小组确定“纸样味道”性质并以 0-5 分(0 为无,5 为极大)等级进行评分时,优选本发明的饮料具有一个或多个,优选至少两个,例如至少三个,例如以下所有对纸样味道的分值:

[0218] (i) 在 37°C 温育 1 周后,纸样分值比以相同方式由野生型大麦(优选 cv. Power)制备的饮料的纸样味道分值低至少 0.5,优选低至少 0.7,更优选低至少 1.0;

[0219] (ii) 在 37°C 温育 2 周后,纸样分值比以相同方式由野生型大麦(优选 cv. Power)制备的饮料的纸样味道分值低至少 0.5,优选低至少 0.7,更优选低至少 1.0;

[0220] (iii) 在 37°C 温育 3 周后,纸样分值比以相同方式由野生型大麦(优选 cv. Power)制备的饮料的纸样味道分值低至少 0.5,优选低至少 0.7,例如低至少 1.0;

[0221] (iv) 在 37°C 温育 1 周后, 纸样分值是以相同方式由野生型大麦 (优选 cv. Power) 制备的饮料的纸样味道分值的最多 90%, 优选最多 80%, 更优选最多 70%; 甚至更优选最多 60%, 还更优选最多 50%;

[0222] (v) 在 37°C 温育 2 周后, 纸样分值是以相同方式由野生型大麦 (优选 cv. Power) 制备的饮料的纸样味道分值的最多 90%, 优选最多 80%, 更优选最多 70%; 甚至更优选最多 60%;

[0223] (vi) 在 37°C 温育 3 周后, 纸样分值是以相同方式由野生型大麦 (优选 cv. Power) 制备的饮料的纸样味道分值的最多 90%, 优选最多 80%。

[0224] 当饮料甚至在储藏后也包含非常低水平的 T2N 时, 所述饮料被称为具有“稳定的感官品质”。因此, 本发明的目的是提供利用双无效 LOX 大麦植物制造的饮料 (例如具有稳定的感官品质的啤酒)。在储藏至少 1 周, 优选至少 2 周, 更优选至少 3 周, 甚至更优选至少 4 周, 例如 1-3 个月, 例如 3-6 个月, 例如 6-12 个月, 例如大于 1 年后, 与以相同方式由野生型大麦 (优选 cv. Power) 制备的饮料相比, 这种饮料优选包含非常低水平的 T2N 潜能, 优选小于 50%, 优选小于 40%, 更优选小于 35%, 例如小于 30%, 如小于 20%, 例如小于 10% 的 T2N 潜能。

[0225] 此外, 还优选在 30-40°C 的范围, 优选 37°C 的温度下储藏至少 1 周, 优选至少 2 周, 更优选至少 3 周, 甚至更优选至少 4 周后, 例如在 20-30°C 的温度范围下储藏 1-3 个月, 例如 3-6 个月, 例如 6-12 个月, 例如大于 1 年后, 与以相同方式由野生型大麦 (优选 cv. Power) 制备的饮料相比, 本发明的饮料包含非常低水平的 T2N, 优选小于 50%, 优选小于 40%, 更优选小于 35%, 甚至更优选小于 30%, 例如小于 25% 的游离 T2N。

[0226] 特别地, 优选在 37°C 储藏 2 周后, 与以相同方式由野生型大麦 (优选 cv. Power) 制备的饮料相比, 优选本发明的饮料包含非常低水平的 T2N, 优选小于 50%, 优选小于 40%, 更优选小于 35% 的游离 T2N。还优选在 37°C 储藏 2 周后, 本发明的饮料包含小于 50ppt, 甚至更优选小于 40ppt, 甚至更优选小于 30ppt 游离 T2N。优选地, 所述储藏是在存在的亚硫酸盐水平不超过 10ppm 的情况下进行, 优选 1-10ppm 范围的亚硫酸盐水平, 更优选 1-8ppm 范围的亚硫酸盐水平, 更优选 2-6ppm 范围的亚硫酸盐水平, 还更优选 3-5ppm 范围的亚硫酸盐水平, 例如 4ppm 亚硫酸盐。

[0227] 还优选在 37°C 存在 2 周后, 与以相同方式由 LOX-1 无效大麦 (优选 W02005/087934 中描述的大麦突变体 D112) 制备的饮料相比, 本发明的饮料包含小于 80%, 优选小于 75%, 例如小于 60% 的游离 T2N。优选地, 所述储藏是在存在的亚硫酸盐水平不超过 10ppm 的情况下进行, 优选 1-10ppm 范围的亚硫酸盐水平, 更优选 1-8ppm 范围的亚硫酸盐水平, 更优选 2-6ppm 范围的亚硫酸盐水平, 还更优选 2-4ppm 范围的亚硫酸盐水平。

[0228] 还特别优选在 37°C 储藏 8 周后, 与以相同方式由野生型大麦 (优选 cv. Power) 制备的饮料相比, 本发明的饮料 (例如啤酒, 例如大麦啤酒) 包含非常低水平的 T2N, 优选小于 50%, 优选小于 40%, 更优选小于 35%, 甚至更优选小于 30%, 还更优选小于 25% 的游离 T2N。还优选在 37°C 储藏 8 周后, 所述饮料 (例如啤酒, 例如大麦啤酒) 包含最多 50ppt, 甚至更优选最多 40ppt, 还更优选最多 30ppt, 甚至更优选最多 20ppt 游离 T2N。优选地, 所述储藏是在存在的亚硫酸盐水平不超过 10ppm 的情况下进行, 优选 1-10ppm 范围的亚硫酸盐水平, 更优选 1-8ppm 范围的亚硫酸盐水平, 更优选 1-6ppm 范围的亚硫酸盐水平, 还更优选

2-4ppm 范围的亚硫酸盐水平,例如 3ppm 亚硫酸盐。

[0229] 还优选在 37°C 储藏 8 周后,与以相同方式由 LOX-1 无效大麦(优选 W02005/087934 中描述的大麦突变体 D112)制备的饮料相比,本发明的饮料包含小于 70%,优选小于 60%,甚至更优选小于 55% 的游离 T2N。优选地,所述储藏存在的亚硫酸盐水平不超过 10ppm 的情况下进行,优选 1-10ppm 范围的亚硫酸盐水平,更优选 1-8ppm 范围的亚硫酸盐水平,更优选 2-6ppm 范围的亚硫酸盐水平,还更优选 2-4ppm 范围的亚硫酸盐水平。

[0230] 此外,本发明的目的还在于提供利用双无效 LOX 大麦植物制造的饮料(例如啤酒),其在 30-40°C 的范围,优选 37°C 的温度下储藏至少 1 周,优选至少 2 周,更优选至少 3 周,甚至更优选至少 4 周后,例如在 20-30°C 的温度下储藏 1-3 个月,例如 3-6 个月,例如 6-12 个月,例如大于 1 年后,与以相同方式由 W0 2005/087934 中描述的大麦突变体 D112 制备的饮料相比,所述饮料包含小于 70%,优选小于 60%,例如小于 50% 的 T2N 和 / 或 T2N 潜能,更优选小于 70%,优选小于 60%,例如小于 50% 的游离 T2N。

[0231] 特别地,优选在 37°C 储藏 8 周后,与以相同方式由野生型大麦(优选 *cv. Power*)制备的饮料相比,本发明的饮料(例如啤酒,如大麦啤酒)包含非常低水平的 T2N,优选小于 70%,优选小于 60%,更优选小于 55%,甚至更优选小于 52% 的游离 T2N。优选地,所述储藏存在的亚硫酸盐水平不超过 10ppm 的情况下进行,优选 1-10ppm 范围的亚硫酸盐水平,更优选 1-8ppm 范围的亚硫酸盐水平,更优选 1-6ppm 范围的亚硫酸盐水平,还更优选 2-4ppm 范围的亚硫酸盐水平,例如 3ppm 亚硫酸盐。

[0232] 优选地,本发明的饮料还包含 1-10ppm(百万分之一份数)亚硫酸盐,更优选 2-8ppm,更优选 3-7ppm,还更优选 4-6ppm 范围的亚硫酸盐。在 15-40°C,优选 30-37°C,更优选 37°C 的温度下储藏至少 1 周,优选至少 2 周,更优选至少 3 周,甚至更优选至少 4 周,例如 1-3 个月,例如 3-6 个月,例如 6-12 个月,例如大于 1 年后,本发明的饮料优选包含最多 0.07,优选最多 0.06,更优选最多 0.05,甚至更优选最多 0.04,例如最多 0.03ppb(十亿分之一份数)游离 T2N。在本发明的一个优选实施方式中,在存在 4-6ppm 亚硫酸盐的情况下,在 37°C 储藏 4 周后本发明的饮料包含最多 0.03ppb,优选最多 0.025ppb,更优选最多 0.02ppb(十亿分之一份数)游离 T2N。

[0233] 与以相同方式由野生型大麦(优选 *cv. Power*)制备的类似饮料相比,本发明的具有稳定感官品质的饮料优选包含非常低水平的 T2N 潜能,优选小于 40%,更优选小于 30%,甚至更优选小于 25% 的 T2N 潜能。

[0234] 在一个实施方式中,本发明涉及具有低水平的某些三羟基十八碳烯酸(也被称为 THA)的饮料(例如啤酒),特别是具有低 9,12,13-THA 和 9,10,13-THA 水平的饮料。THA 的特征在于苦味(Baur and Grosch,1977 ;Baur 等人,1977),并且因此被认为是不期望的。

[0235] 因此,期望 9,12,13-THA 和 9,10,13-THA 水平尽可能低,优选低于 1.3ppm,例如低于 1ppm。然而,源自麦芽的饮料(例如啤酒)中 9,12,13-THA 和 9,10,13-THA 的总浓度还依赖于用于制备所述特定饮料的麦芽量。因此,通常高浓度啤酒将包含比淡啤酒多的 9,12,13-THA 和 9,10,13-THA,从而使高浓度啤酒中能接受整体水平更高的 9,12,13-THA 和 9,10,13-THA。因此,与以相同方式由野生型大麦(优选 *cv. Power*)制备的饮料相比,优选本发明的饮料包含较低水平的 9,12,13-THA 和 9,10,13-THA。特别地,与以相同方式由野生型大麦(优选 *cv. Power*)制备的饮料中的水平相比,本发明的饮料中 9,12,13THA 的水平优选最

多为 50%，优选最多为 40%，更优选最多为 30%。还优选与以相同方式由野生型大麦（优选 cv. Power）制备的饮料中的水平相比，本发明的饮料中 9, 10, 13THA 的水平优选最多为 70%，优选最多为 60%。可通过使用双无效 LOX 大麦制备此类饮料。

[0236] 在本发明的一个实施方式中，所述饮料具有改良的泡沫性质。当所述饮料是啤酒时，这具有特别重大的意义。因此，本发明的目的是提供具有优异泡沫性质的饮料，例如啤酒。优选地，与以相同方式由野生型大麦（优选 cv. Power）制备的饮料相比，本发明的啤酒在 60-80 分钟内多产生至少多出 10%，优选至少多出 20%，还更优选至少多出 25% 的泡沫。按照下文实施例 9 的描述测定所述泡沫的产生。

[0237] 本发明还涉及生产所述饮料的方法。所述方法优选包括以下步骤：

[0238] (i) 提供包含萌芽的双无效 LOX 麦粒的麦芽组合物；

[0239] (ii) 将所述麦芽组合物加工成饮料；

[0240] 由此获得感官品质更稳定的饮料。

[0241] 在一个优选的实施方式中，所述饮料是啤酒。在这种情况下，所述加工步骤优选包括例如通过上文描述的任何方法由所述麦芽组合物制备麦芽汁，并发酵所述麦芽汁。

[0242] 一般来说，可以用发芽和 / 或未发芽的大麦谷粒制造醇饮料，例如啤酒。除了酒花和酵母外，麦芽也促成了啤酒的风味和颜色。此外，麦芽还充当了可发酵糖和酶的来源。啤酒生产的一般工艺的示意图示于图 3，而适合发芽和酿酒的方法的实例详细描述可见于，例如 Briggs 等人 (1981) 和 Hough 等人 (1982) 的文献。可获得多种用于分析大麦、麦芽和啤酒产物的定时更新的方法，所述方法包括，例如但不限于 American Association of Cereal Chemists (1995), American Society of Brewing Chemists (1992), European Brewery Convention (1998) 和 Institute of Brewing (1997)。已经认识到特定的酿酒厂使用了许多带有显著差异的具体工序，这些差异与当地消费者的喜好有关。本发明可以使用任何此类制造啤酒的方法。非限制实例描述在实施例 8 和 9 中。

[0243] 可以通过例如上文描述的任何方法获取上述饮料，例如啤酒、麦芽饮料或非发酵麦芽汁的麦芽组合物。可以按照上文描述由所述麦芽组合物制备麦芽汁。

[0244] 从麦芽汁生产啤酒的第一步优选包括煮沸所述麦芽汁。在煮沸期间，可以添加其它组分，例如产生典型的苦啤酒和芳香啤酒特征的酒花。煮沸麦芽汁还会导致主要在后续的麦芽汁冷却阶段沉淀的多酚和变性蛋白质之间的聚集。冷却后，麦芽汁被转移到含酵母的发酵罐中。优选地，所述酵母是啤酒酵母，卡尔酵母 (*Saccharomyces carlsbergensis*)。可以将麦芽汁发酵任何适当时间，通常在 1-100 天的范围。在持续数天的发酵过程中，糖被转化成醇和 CO₂，同时伴随产生一些风味物质。

[0245] 随后可以对啤酒进行进一步加工，例如冷藏啤酒。也可以过滤和 / 或储藏啤酒，储藏是产生令人愉快的芳香以及较少酵母 (yeasty) 味的过程。也可以加入添加剂。此外，还可以加入 CO₂。最后可以在封装（例如装瓶或装罐）前，对啤酒进行巴氏灭菌和 / 或过滤。

[0246] 除了在啤酒生产领域的进展，这还将有益于降低啤酒中的 T2N 和 T2N 潜能。因此，还需要使成品啤酒具有较少异味的新原料，特别是大麦和麦芽。因此，本发明的目的是提供此类大麦植物和麦芽。

[0247] 有很多方法都可用于确定大麦植物产品或植物产品是否由 LOX-1 和 LOX-2 基因具有引起功能性 LOX-1 酶完全丧失和功能性 LOX-2 酶完全丧失的突变的大麦植物制备。植物

产品通常会包含至少一些来自用于生产该植物产品的植物的基因组 DNA。因此,麦芽将包含大量的基因组 DNA,但即便是大麦或麦芽提取物(例如麦芽汁)也可以包含来自所述大麦或麦芽的基因组 DNA 或其片段。此外,基于大麦的饮料,例如啤酒也可包含来自所述植物的基因组 DNA 或其片段。通过分析植物产品中的 DNA,可以确定用于制备植物产品的植物的 LOX-1 和 LOX-2 基因是否具有引起功能性 LOX-1 酶完全丧失和功能性 LOX-2 酶完全丧失的突变。所述突变可以是,例如上文在“LOX 活性功能的丧失”部分描述的 LOX-1 和 LOX-2 基因的任何突变。可以通过任何可用的方法,例如通过测序或者通过基于扩增的方法(包括基于 PCR 的方法)分析所述基因组 DNA。如果认为 LOX-1 基因和 / 或 LOX-2 基因具有特定突变,则可以采用多态性分析,例如 SNP 分析。可以按照下文实施例 10 的描述进行此类分析。本领域技术人员能够对这些实施例中描述的具体 SNP 分析进行适应性改进以用于其它突变或者其它起始材料。

[0248] 如果上述植物产品仅由 LOX-1 和 LOX-2 基因具有引起功能性 LOX-1 酶完全丧失和功能性 LOX-2 酶完全丧失的突变的大麦植物制备,则大麦 LOX-1 mRNA 和 LOX-2 mRNA 和 / 或 LOX-1 蛋白和 LOX-2 蛋白的存在与否也可以作为表明所述植物产品是否由双无效 LOX 大麦制备的指标。因此,可以利用 Western 印迹分析,或者其它蛋白分析,或者利用 RT-PCR,或者利用 Northern 印迹分析,或者利用其它 mRNA 分析完成植物产品的产品检测。当所述植物产品为麦芽时,此类分析特别有用。

[0249] 化学诱变

[0250] 为了产生本发明的双无效 LOX 大麦植物,即包含导致功能性 LOX-1 酶完全丧失的第一突变和导致功能性 LOX-2 酶完全丧失的第二突变的植物,可以通过任何合适的诱变方法,例如通过使用大麦粒的化学诱变制备非常大量的大麦突变体。已知该方法随机引入突变。可以利用任何化学诱变物质进行大麦的诱变。然而,优选利用 NaN_3 处理谷粒,使存活的谷粒萌芽,然后分析子代植物。由诱变的谷粒长成的植物世代(称为 M0)包含任何给定突变的杂合嵌合体。在自花传粉之后收集的子代植物称为 M1 代,在 M1 代中,给定突变分离至相应的杂合子和纯合子中(参见图 1)。

[0251] 利用 NaN_3 处理麦粒不等同于处理单个细胞,原因是处理之后的谷粒可包含一些未突变的细胞和多种具有 DNA 突变的细胞。由于在不产生种系的细胞谱系中的突变会丢失,因此,目标就是将诱变剂靶向发育为生殖组织的少数细胞,这有助于 M1 代的产生。

[0252] 为了评价整体突变效率,可计数 M0 和 M1 代中的白化(albino)嵌合体和白化植物。由作为存活植物的函数的计分突变体数量(scoring mutant number)得出对突变效率的估计,而作为已处理种子的函数的计分突变体数量测定了突变效率和谷粒死亡二者的组合。

[0253] 值得注意的是,在基因表达的几乎每个步骤,细胞都具有可缓和损害突变影响的质量保证机制。真核生物中的一个经过深入研究的实例是无义介导的 mRNA 降解(称为 NMD),其阻止合成潜在有害的提前截短蛋白(Maquat and Carmichael, 2001; Wu 等人, 2007)。在 NMD 中,通过末位密码子相对于下游稳定元件的位置将其鉴定为翻译提前终止密码子。产生翻译提前终止(无义)密码子(PTC)的突变有时提高了选择性剪接转录本的水平,由此跳过有害突变,从而潜在地挽救了蛋白的功能(Mendell and Dietz, 2001)。

[0254] 植物育种

[0255] 在一个实施方式中,本发明的目的是提供包含双无效 LOX 特征的在农业上有用的大麦植物。农作物发育常为始于引入新特征的长期且困难的过程。然而,从植物育种家的观点看,这一步骤几乎总是产生与现在的市场品种相比,农业性状总体谱图不甚理想的植物。

[0256] 除了双无效 LOX 特性之外,在产生商业发芽大麦品种的领域还要考虑其它因素,例如麦粒产量、大小以及与发芽性能或酿造性能相关的其它参数。因为已经显示许多(即便不是所有)相关特性都处于遗传控制之下,本发明还提供了现代的纯合且高产量的发芽栽培品种,其可以通过与本申请公开的双无效 LOX 大麦植物杂交而制备。这种大麦植物的麦粒提供了产生 T2N 潜能的能力低的新原料,即与以相同方式由 WO 2005/087934 中描述的大麦无效 LOX-1 突变体 D112 产生的麦芽相比,由这种麦粒产生的麦芽优选具有小于 50% 的 T2N 潜能。专业大麦育种者将能够选择并开发大麦植物,该大麦植物在与双无效 LOX 大麦杂交后将产生更好的栽培品种。或者,大麦育种者可以利用本发明的植物用于进一步的诱变,以产生源自双无效 LOX 大麦的新栽培品种。

[0257] 确保在子代中维持双无效 LOX 特征的一个方法涉及 LOX-1 基因和 LOX-2 基因的 SNP 分析。优选地,还对 LOX-1 和 LOX-2 活性进行测定。

[0258] 可以将本发明的大麦植物引入到任何合适的育种方案中。

[0259] 本发明的另一个目的是提供包含双无效 LOX 特征的在农艺上优良的大麦植物。因此,本发明还涉及通过使第一亲本大麦植物与第二亲本大麦植物杂交而产生新的双无效 LOX 大麦植物的方法,其中所述第一植物或第二植物是双无效 LOX 大麦。此外,第一亲本大麦植物和第二亲本大麦植物均可来自双无效 LOX 大麦品种。因此,利用双无效 LOX 大麦品种的任何此类方法都是本发明的一部分:自花授粉、回交和群体杂交等。利用双无效 LOX 大麦品种作为亲本产生的所有植物都在本发明的范围内,包括由源自双无效 LOX 大麦品种的品种形成的那些植物。在将外源 DNA 引入至双无效 LOX 植物或植物组织并在其中表达的情况下,双无效 LOX 大麦还可以用于遗传转化。

[0260] 本发明可以使用回交方法以将突变大麦植物的双无效 LOX 特征引入至另一个栽培品种中,例如都是当代高产发芽大麦栽培品种的 cv. Scarlett 或 cv. Jersey 中。在标准的回交操作中,将原始目标品种(即轮回亲本植物)与携带有待转移目标突变 LOX 基因的第二品种(非轮回亲本植物)杂交。随后,将这次杂交产生的双无效 LOX 子代植物与轮回亲本杂交,重复这一过程直至获得这样的大麦植物,即其中除了非轮回亲本植物的双无效 LOX 特征外,轮回亲本特有几乎所有特征都在所产生的植物中被恢复。最后,将最后产生的回交植物自交以产生纯的双无效 LOX 育种子代植物。

[0261] 加快植物育种过程的方法包括通过应用组织培养和再生技术对所产生的突变体进行初始增殖。因此,本发明另一个方面提供了生长和分化后产生具有双无效 LOX 特征的大麦植物的细胞。例如,育种可以包括传统杂交、制备源自可育花药的植物或利用小孢子培养。

[0262] LOX 通路产物

[0263] 在多种实施方式中,本发明涉及包含低水平的 T2N 潜能的大麦植物和其产品。LOX 酶催化带有顺式 -1,顺式 -4 戊二烯系统的多不饱和脂肪酸的二加氧作用。在大麦中, C_{18} 多不饱和脂肪酸亚油酸 ($18:2^{\Delta 9,12}$) 和 α -亚麻酸 ($18:3^{\Delta 9,12,15}$) 是主要的 LOX 底物。通过在酰基链的 C-9 位(多由 LOX-1 催化)或 C-13 位(多由 LOX-2 催化)加入分子氧而启动脂

肪酸代谢的脂加氧酶通路,产生相应的 9-HPODE 和 13-HPODE[当底物为 α -亚麻酸时产物是 9-氢过氧化十八碳三烯酸和 13-氢过氧化十八碳三烯酸 (HPOTE),但 HPOTE 不发挥 T2N 前体的功能]。在 LOX 通路的氢过氧化物裂解酶支路中,9-HPODE 和 13-HPODE 可以被裂解成短链含氧酸和醛(参见图 2)。特别地,9-HPODE 可以被裂解成被转化成 T2N 的顺式-壬烯醛,而 13-HPODE 是 2-E-己烯醛的前体。因此,预期作为 LOX-2 催化的亚油酸的二加氧作用的主要产物 13-HPODE 不是导致形成陈旧味 T2N 的通路的上游成分。

[0264] 认为本发明涵盖了影响 LOX-1 和 LOX-2 催化作用的下游代谢物的产生,其不作为 LOX-1 或 LOX-2 催化反应的直接产物而产生,但是随后的系列反应的结果。这些反应包括自然发生的、因素诱导的或者酶催化的异构化和转化。因此,可能通过调节该通路中其它成分(例如氢过氧化物裂解酶 HPL)的表达而影响这些下游代谢物的产生。

[0265] T2N 潜能

[0266] 本发明的重要目的是降低或消除 T2N 潜能。因此,本发明的目的是减少 T2N 前体和醛加合物的形成。虽然与啤酒老化有关的数个化学反应仍不清楚,由 T2N 潜能产生游离 T2N 被认为是啤酒产品中形成陈旧风味的主要原因(Kuroda 等人,见上文)。因此,本发明的目的是提供具有低水平的 T2N 潜能的饮料和具有低水平的 T2N 前体的饮料。

[0267] 多数 T2N 潜能由麦芽汁转移至成品啤酒,在成品啤酒中可以释放出游离 T2N(Liégeois 等人,2002),并且酸度和温度都是该过程中的重要因素。根据本发明,T2N 潜能的定义如上文在定义部分中的描述。也可以使用其它测定 T2N 潜能的水平的方法。为了避免混淆,在本申请中“T2N 潜能”的含义如上文在定义部分中的描述。具有释放 T2N 或者转化成 T2N 的能力的化学物质在本文中被称为“T2N 前体”,并且通过除测定 T2N 潜能的方法外的其它方法确定或测定的 T2N 前体被称为“T2N 前体”。特别可以通过首先处理样本从而使具有释放 T2N 或转化成 T2N 能力的基本上所有(优选所有)或其化学物质都实际上确实分别释放 T2N 和/或转化成 T2N。此后,测定 T2N 的水平。

[0268] 本发明的大麦粒不含 LOX-1 和 LOX-2 活性。有趣地,这种大麦粒包含非常少的 T2N 潜能。

[0269] 因此,利用双无效 LOX 大麦粒产生的啤酒将不仅具有非常低水平的 T2N,还具有非常低水平的 T2N 潜能。双无效 LOX 大麦粒在本发明的范围内,其中所述双无效 LOX 大麦粒其产生的啤酒产品包含非常低水平的 T2N 潜能,优选为以相同方式由野生型大麦(优选 cv. Power)生产的类似啤酒产品的 T2N 潜能的水平的小于 40%,更优选小于 30%,甚至更优选小于 25%。因此,所述啤酒产品包含的 T2N 潜能为以相同方式由 WO 2005/087934 中描述的大麦突变体 D112 生产的类似啤酒产品的 T2N 潜能的小于 60%,更优选小于 50%。

[0270] 并且,还优选源自双无效 LOX 大麦粒的植物产品具有非常低的 T2N 前体水平。由双无效 LOX 大麦粒制备的植物产品在本发明的范围内,其中所述植物产品包含的 T2N 前体的水平为以相同方式由野生型大麦(优选 cv. Power)生产的类似植物产品的 T2N 前体的水平的小于 40%,更优选小于 30%,甚至更优选小于 25%。因此,所述植物产品包含的 T2N 前体为以相同方式由 WO 2005/087934 中描述的大麦突变体 D112 生产的类似植物产品的 T2N 前体的小于 60%,更优选小于 50%。

[0271] 注意到在微发芽原料的样本中或在来自发芽原料的产品中测定的 T2N 值常高于来自较大规模生产的原材料,例如 30-kg 规模的实验性发芽样本。然而,大规模和小规模试

验之间, T2N 潜能相对试验值通常是相似的。

[0272] 类似地, 还注意到在微发芽原料的样本中和在来自发芽原料的产品中测定的 T2N 潜能 (和 T2N 前体) 常常高于来自较大规模生产的原材料, 例如 30-kg 规模的实验性发芽样本。然而, 大规模和小规模试验之间, T2N 潜能相对试验值通常是相似的。

实施例

[0273] 本文的实施例例示说明了本发明的优选实施方式, 并且不应认为这些实施例是对本发明的限制。

[0274] 除非另有说明, 否则用于操作核酸和细菌的基本分子生物学技术均按照 Sambrook and Russel (2001) 中的描述进行。

[0275] 实施例 1

[0276] 在突变的 LOX-1 无效群 (M3 代) 的突变的成熟胚中选择低 LOX-2 活性

[0277] LOX-1 和 LOX-2 两者均在成熟的大麦胚 (LOX-1 是主要的酶) 中合成, 也在萌芽胚 (两个酶水平相等) 中合成。为了测定数千样本中的 LOX 活性, 利用大麦胚的提取物的试验将是最便利的。并且在用于 LOX-2 水平的试验中, 筛选诱变的 LOX-1 无效大麦的麦粒将非常有利 (参见 WO 2005/087934)

[0278] 从无效 LOX-1 突变体 D112 (描述在 WO2005/087934 中, ATCC 的保藏号是 PTA-5487) 的大麦植物收集麦粒, 并与诱变剂 NaN_3 温育以在大麦基因组 DNA 中诱导点突变。按照 Kleinhofs 等人 (见上文) 提供的建议进行试验设定。

[0279] 接着, 在田间土地繁殖 M1 代的突变谷粒经历随后两代, 最后产生用于筛选目的的高比例的 M3 代纯合植物 (过程概述参见图 1)。预期 M3 代的突变谷粒含基因突变的频率为 0.9-2.3/10,000 个谷粒 (Kleinhofs 等人, 参见上文)。

[0280] 通过常规的 LOX-1 实验测定, 发现无效 LOX-1 突变体的成熟胚中 LOX-2 活性低。在此, 同时将反应混合物的储备溶液和提取物合并 (按照 WO2005/087934 中的描述)。在该申请中详述了提高实验灵敏度的方法, 其中同时改变了酶提取条件以及反应混合物储备溶液的混合。

[0281] 对于 LOX 提取, 本发明人惊喜地发现利用 100-mM 乳酸缓冲液 (pH 4.5) 致使 HPODE-消耗活性的背景水平显著降低, 使 HPODE 积累在试验缓冲液中。此外, 本发明人还发现, 通过在加入剩余试验反应物之前, 允许所形成的小部分 HPODE 通过对与 LOX-2 结合的铁原子的 $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ 氧化而活化 LOX-2, 最终形成蓝色吲达胺染料, 可进一步改良所述试验。

[0282] 简而言之, 利用 200 μ l 提取缓冲液 (100mM 乳酸, pH 4.5) 从所分离的成熟胚中提取 LOX-2 酶。提取在 96 孔板中进行, 其中每 1.2-ml 孔含圆形的 5-mm 玻璃珠。将平板在冰上孵育 10 分钟, 然后转移至 MM 300 试验室磨 (Retsch), 经电子调整而以 27sec^{-1} 的频率震荡 35 秒。随后, 将平板在 Allegra 6R 离心机 (Beckman-Coulter) 中以 4,000rpm 在 4°C 离心 10 分钟以沉淀不溶物质, 并随后至进一步加工前保持在冰上最多 2 小时。将 96 孔板转移至 Biomek 2000 Laboratory Automation Workstation (Beckman-Coulter) 以进一步吹吸。最初, 将 96 \times 40 μ l 胚提取物转移至标准的 96-孔微孔平板 (Nunc), 随后加入 90 μ l 试剂 A [12.5mM 3-(二甲基氨基) 苯甲酸, 0.625mM 亚油酸], 其中所述试剂 A 通过首先混合 155 μ l 亚油酸 (相当于 134mg 游离酸, Sigma, L-1376) 和 257 μ l 吐温 -20, 然后

加入 H₂O 至体积为 5ml, 随后加入 600 μl 1M NaOH 而制成。利用 H₂O 将澄清的溶液调整至 20ml。在加入 90 μl 试剂 B(0.25mM 3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脒, 0.125mg/ml 血红蛋白) 前温育混合物 10 分钟。在进一步温育 5 分钟后, 利用 Flourostar Galaxy 分光光度计 (BMG Labtechnologies) 测定 96 孔平板各孔的 A₅₉₅, 颜色形成反映存在由 LOX-2 催化的二加氧作用产生的 HPODE (因此, 活性表示为 A₅₉₅ 单位)。

[0283] 利用以上描述的方法, 分析总共 21,000 个大麦突变系的 LOX-2 活性, 并基于低 LOX-2 活性选择其中的 1,550 个突变系。将这些突变系进一步在田间繁殖, 随后在成熟谷粒中测定 LOX-2 活性。然而, 发现没有一个突变系将低 LOX-2 特征转移至下一代。

[0284] 实施例 2

[0285] 在萌芽大麦胚中选择低 LOX-2 活性

[0286] 改良的筛选材料根据 Kleinhofs 等人 (参见上文) 提供的详述, 将从通过杂交 (无效 LOX-1 突变体 D112×Jersey)×Sebastian 产生的 LOX-1 无效系 Ca211901 的大麦植物收集的麦粒与诱变剂 NaN₃ 一起温育。选择该方法的原因是已知其在大麦基因组 DNA 中诱导点突变, 最终导致诱变 DNA 编码的蛋白的氨基酸残基取代或截短。在本申请的诱变试验中, 选择在田间土地繁殖 M1 代的突变谷粒经历随后两代, 最后产生用于筛选目的的高比例纯合植物 (参见图 1)。尽管没有筛选 M2 代谷粒, 主要原因是预期这些谷粒包含有相对高比例的杂合点突变, 但使用 M3 代的突变谷粒作为筛选材料, 其中预期每 10,000 个谷粒具有 0.9-2.3 个突变 (Kleinhofs 等人, 参见上文)。

[0287] 意外地, 本发明人发现, 与分析成熟胚的提取物 (如上文实施例 1 所述) 相比, 萌芽胚的分析产生试验结果明显改进。因此, 建立高通量筛选方法以测定包括子叶盘组织在内的萌芽胚中的 LOX-2 活性。

[0288] 从 35,125 个大麦穗的成熟麦粒分离两个胚 (无效 LOX-1 突变体 D112 的 M4 代的 20,977 个系, 和 LOX-1 无效系 Ca21190 系的 M3 代的 14,148 个系), 并转移至 96 孔储藏板 (ABgene)。在向各个孔中加入 20 μl 水后开始胚萌芽, 其中用湿的 Kimnett 薄纸和塑料盖覆盖所述孔。将平板在塑料箱中于 20°C 温育 48 小时。温育后, 提取 LOX-2 酶; 首先向各孔中加入 5-mm 玻璃珠和 200 μl 提取缓冲液 (100mM 乳酸缓冲液, pH 4.5), 然后在 MM 300 实验室磨 (Retsch) 中以 27sec⁻¹ 的频率研磨 35 秒。随后, 将平板在 Allegra 6R 离心机 (Beckman-Coulter) 中在 4°C 以 4,000rpm 离心 10 分钟, 以沉淀不溶物质。基本按照用于成熟胚提取物的 LOX-2 活性分析 (实施例 1) 的描述测定 LOX-2 活性, 区别仅在于每个试验仅使用 30 μl 提取物而非 40 μl。

[0289] 潜在突变体的鉴定如上文所述, 分析上述 35,125 个大麦系的各两个谷粒的 LOX-2 活性, 目的在于鉴定当与 LOX-1 无效和野生型谷粒相比时, 所述活性高度降低的谷粒。在 Ca211901 系的 M3 代中, 共鉴定出 7 个潜在原始突变体。在温室中进一步繁殖这些突变体, 收获, 并再选择与非常低的 LOX 活性相关的特征。最后, Ca211901 系的仅一个突变体 (命名为突变体 A689, 在本文中还被称为双无效 LOX 突变体 A689) 显示基本没有 LOX-2 活性。利用 LOX 活性几乎完全由 LOX-2 产生的萌芽胚的提取物进行总 LOX 活性的详细测定 (Schmitt and van Mechelen, 1997)。对于突变体 A689 的 M3 谷粒的萌芽胚, 由 LOX 比色试验测定的总 LOX 活性 (实施例 1, 表 1) 为 0.163±5.5% A₅₉₅U/萌芽胚, 而对于 LOX-1 无效母本品种 Ca211901 则为 1.224±3.8% A₅₉₅U/萌芽胚 (无效 LOX-1 原始突变体 D112 的相应值为

1. 215 ± 6.0% A₅₉₅U/ 萌芽胚)。

[0290] 实施例 3

[0291] 大麦突变体 A689

[0292] 进行分析以确定 M4 和 M5 代的 LOX-2 无效植物在相应的突变表型方面是否为纯合的。这种类型的分析会有助于确定所述突变在遗传上是隐性的, 还是显性的。因此, 如果 M3 代植物对于显性突变是杂合的, 则随后世代的个体将出现表型分离。

[0293] 测定突变体 A689 的 M3、M4 和 M5 代的大麦胚中的总 LOX 活性, 并将活性与母本系 Ca211901 的胚的进行比较, 还与无效 LOX-1 突变体 D112 的进行比较。LOX 活性的测定如按照本申请实施例 1 的描述。在所有试验中, 对照样本均包括来自母本系的萌芽胚的标准提取物, 和来自无效 LOX-1 突变系 Ca211901 和突变体 D112 的胚的热失活标准提取物。对于突变体 A689 的 M4 代谷粒的胚, 平均总 LOX 活性为 0.151 ± 2.6% A₅₉₅U (n = 24), 并且对于突变体 A689 的 M5 代的萌芽胚的平均总 LOX 活性为 0.16 ± 2.3% A₅₉₅U (n = 90)。出于比较, LOX-1 无效系 Ca211901 和突变体 D112 的萌芽胚分别产生 1.210 ± 3.0% A₅₉₅U (n = 90, M4 代) 和 1.199 ± 4.6% A₅₉₅U (n = 90, M5 代)。结果总结在表 1 和图 4A-C 中。总之, 试验数据证明突变体 D112 的 M4 和 M5 代谷粒在表明非常低的总 LOX 活性的遗传特征方面是纯合的, 其反映了双无效 LOX 表型。

[0294] 表 1. 由原始突变体 (M3 代) 和子代 (M4 和 M5 代) 的萌芽大麦胚制备的提取物中的总 LOX 活性 (平均)。

[0295]

提取物	总 LOX 活性	所测试的系	标准偏差
	A ₅₉₅ 单位	No.	%
M3 代			
突变体 A689	0.163	8	5.5
Ca211901	1.224	6	3.8
D112	1.215	6	6.0

[0296]

Ca211901 (热失活)	0.099	10	1.3
D112 (热失活)	0.096	10	1.1
M4 代 (子代)			
突变体 A689	0.151	24	2.6
Ca211901	1.223	6	2.3
D112	1.209	6	5.6
Ca211901 (热失活)	0.096	10	1.7
D112 (热失活)	0.101	10	1.0
M5 代 (子代)			
突变体 A689	0.160	90	2.3
Ca211901	1.210	90	3.0
D112	1.199	90	4.6
Ca211901 (热失活)	0.103	10	2.0
D112 (热失活)	0.097	10	1.2

[0297] 实施例 4

[0298] 基于 HPLC 分析萌芽和微发芽大麦中的 HPODE

[0299] 除了利用萌芽胚代替成熟胚外,基本照常国际专利申请 WO 2005/087934 的描述进行大麦 HPODE 的分析。按照实施例 2 的描述,使 M4 代谷粒萌芽 48 小时。基本按照下文实施例 6 的描述,使 M5 代的谷粒进行微发芽过程,但在萌芽 72 小时后测定具体 HPODE 的水平,并且省略烘干过程。通过使来自 M4 和 M5 代突变体 A689 和对照样本的萌芽胚的粗蛋白提取物与底物亚油酸一起温育而测定 9-HPODE 和 13-HPODE 的水平。通过 HPLC 分析反应产物。

[0300] 利用解剖刀在子叶盘和胚乳之间切割,从而从大麦谷粒分离萌芽胚。然后将规模为 4 个胚的每个样本置于两张称重纸之间,并轻柔地锤打以产生均质粉末。将该粉末转移至 1.5ml 的微离心试管中,加入 600 μ l 200-mM 乳酸缓冲液 (pH 4.5),并在利用塑料槌 (Kontes) 进一步匀质化前,将试管在冰上保持 10 分钟。随后,向各试管中加入 600 μ l H_2O ,并将样本以 20,000 $\times g$ 离心 2 分钟。将所得上清的 100- μ l 试样转移至 15ml 离心管 (Cellstar ;目录号 188271) 中,以准备分析 LOX 作用后的反应产物。含 260 μ M 亚油酸的 2ml 的 100-mM Na- 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5,该底物是通过将 10ml 的 100-mM Na- 磷酸盐缓冲液 (pH6.5) 与 100 μ l 24-mM 亚油酸储备溶液混合而制得,其中的亚油酸储备溶液通过以下而制得:首先混合 155 μ l 亚油酸 (对应于 134mg 游离酸 ;L-1376, Sigma) 和 257 μ l 吐温 -20, 然后加入 H_2O 至体积为 5ml,随后加入 600 μ l 1M NaOH,当溶液变澄清时,用 H_2O 调整体积至 20ml)。在采血管旋转仪上以 ~ 30 rpm 温育 15 分钟后,加入 2ml 乙酸乙酯,并通过剧烈振荡 5 秒混合样本内容物以提取 9-HPODE 和 13-HPODE。然后将样本以 800 $\times g$ 离心 10 分钟,将 1ml 乙酸乙酯转移至 1.5ml 微离心管中,其中在氮气流下蒸发乙酸乙酯。随后,使 HPODE 重悬在 300 μ l 甲醇中,并过滤通过 0.45- μ m 膜 (Millex-HN filter, Millipore)。通过 HPLC 进行 HPODE 含量分析。将来自各样本的总共 15 μ l 注射至装配有 4.6 \times 250mm Symmetry

C18 柱 (Waters) 的 HPLC 设备 (HP 1100 Series, Hewlett Packard) 中。使用的流动相为 16 : 12 : 12 : 10 : 0.5(v : v : v : v : v) 的水 : 甲醇 : 乙腈 : 四氢呋喃 : 三氟乙酸混合物。流动相的流速为 1ml/ 分钟, 并且在柱前测定的压力为 140 巴。分离在 30℃ 下进行。在 234nm 测定具有共轭双键的亚油酸氢过氧化物。

[0301] 在图 5 中显示了所得 HPODE 谱的比较。包含 9-HPODE 和 13-HPODE 的混合物的标准样本的色谱图示于图 5A 中。由无效 LOX 突变体 D112 的 M4 代的 48 小时萌芽谷粒制备的提取物的色谱图 (图 5B) 与双无效 LOX 突变体 A689 的色谱图 (图 5C) 的比较显示了从无效 LOX-1 突变体 D112 的萌芽胚提取的 LOX 形成的显著的 13-HPODE, 而在双无效 LOX 突变体 A689 的提取物中却没有观察到或仅观察到极少的 9-HPODE 和 13-HPODE。

[0302] 当分析野生型 *cv. Barke* (图 6A)、无效 LOX-1 突变体 D112 (图 6B) 和双无效 LOX 突变体 A689 (图 6C) 的 72 小时微发芽胚时, 观察到类似特征。在野生型 *cv. Barke* 的成熟胚的提取物中同样形成了显著水平的 9-HPODE 和 13-HPODE 两者 (图 6A)。无效 LOX-1 突变体 D112 胚的提取物形成非常少量的 9-HPODE, 但形成了大量的 13-HPODE (图 6B), 因此证明 LOX-1 活性的丧失。双无效 LOX 突变体 A689 的胚提取物同样没有形成显著水平的 9-HPODE 和 13-HPODE (图 6C), 证实了完全不存在 LOX-1 和 LOX-2 两种活性。

[0303] 实施例 5

[0304] 大麦双无效 LOX 突变体 A689、其 LOX-1 无效母本品种 Ca211901 和无效 LOX-1 突变体 D112 的性质

[0305] 温室中的植物繁殖使双无效 LOX 突变体 A689 和其母本系 Ca211901 的 M4 和 M5 代谷粒在温室萌芽, 并在 12℃ 和 65% 相对湿度下以光照 20 小时的每日循环生长。Ca211901 系和双无效 LOX 突变体 A689 植物在株高、每株的分蘖数、开始开花和每穗的谷粒数方面的生长特征类似, 这强调说明了突变体 A689 的谷粒发育和生长生理学类似于野生型。

[0306] 突变体 A689 在田间条件下的农艺学性能在标准的田间试验中比较双无效 LOX 突变体 A689 和无效 LOX-1 突变体 D112 的植物以及 Ca211901 系的植物, 目的在于鉴定在株高、抽穗期、抗病性、倒伏、穗破损、成熟时间和产量方面可能的差异 (参见表 2)。因此, 将等量的上述麦粒播种在一个地点 7.88-m² 的小块土地上, 每种包含两个重复。在整个生长季节中仔细观察农艺学性质, 同样着重于上述性质。对于所测试的任何植物在农艺学特征方面都没有观察到差异。

[0307] 表 2. 农艺性能的比较

[0308]

性质	突变体 A689	亲系 Ca211901	突变体 D112
LOX 基因型	无效 LOX-1, 无效 LOX-2	无效 LOX-1, 野生型 LOX-2	无效 LOX-1, 野生型 LOX-2
2007 年的播种日期	3 月 29 日	3 月 29 日	3 月 29 日
成熟时的长度(cm)	68	69	74
2007 年的抽穗日期	6 月 14 日	6 月 14 日	6 月 12 日
粉状霉病*	0	0	0
斑枯*	3	3	2
网斑*	1	1	1
柱隔孢菌(Ramularia) *	3	3	2
锈病*	1	1	2
倒伏*	2	2	4
2007 年成熟日期	8 月 1 日	8 月 1 日	8 月 1 日
2007 年相对产量**	107	108	100
2008 年相对产量**	104	103	99

[0309] *0-9 的等级,其中 0 代表没有感染或倒伏,9 代表极度感染或倒伏。

[0310] ** 与 cv. Barke (无效 LOX-1 突变体 D112 的母本品种) 相比的相对产量性能。

[0311] 实施例 6

[0312] 微麦芽及其麦芽汁的分析

[0313] 利用大麦突变体 A689 和 D112 以及 cv. Barke 和 cv. Power 的 100g 样本进行微发芽。在田间将所述突变系繁殖数个季节以获得足以用于发芽和酿造试验的谷粒材料。

[0314] 浸泡条件是:在 16°C 的浸泡水中,润湿 8 小时;干燥 14 小时;润湿 8 小时;干燥 10 小时;润湿 4 小时。

[0315] 发芽条件是 18°C 12 小时;16°C 24 小时;14°C 24 小时;12°C 60 小时。烘干条件是 60°C 12 小时;68°C 3 小时;74°C 4 小时;80°C 3 小时。对最后形成的麦芽进行 T2N 测定。

[0316] 此外,通过标准的 EBC 法,分析突变体 A689 和 D112 的大麦和麦芽样本以及 cv. Barke 和 cv. Power 的大麦和麦芽样本(参见表 3)。

[0317] 麦芽汁制备为了与 cv. Power 比较测定突变体 A689 和 D112 的性质,生产 25-225g,的麦芽样本并用在实验室糖化系统中,所述糖化系统包含外部搅拌器和装配有能够以指定方式改变温度的自动调温器的水浴。糖化以小规模进行,通过滤纸分离最后形成的醪液以获得甜麦芽汁。利用加热罩和与回流冷却器相连的圆底烧瓶进行实验室规模的麦芽汁煮沸。

[0318] 对甜麦芽汁和煮沸麦芽汁二者进行 T2N 测定(参见图 7-9)。对于源自双无效 LOX 突变体 A689 的 M5 代谷粒的样本,观察到 T2N 水平显著降低~75%(三个 A689 突变系的平均值)。此外,还发现由微发芽样本产生的麦芽汁中游离 T2N 和 T2N 前体两个水平的显著降低(参见图 8-9)。

[0319] 基本按照 Groenqvist 等人(1993)的描述,在利用 0-(2,3,4,5,6-五氟苄基)羟基胺对羰基衍生化后,通过具有质谱检测的气相色谱(GC-MS)测定 T2N 的水平。

[0320] 表 3. 微发芽分析

[0321]

样本		cv. Power	突变体 A689	突变体 D112
LOX 基因型		野生型 LOX-1, 野生型 LOX-2	无效 LOX-1, 无效 LOX-2	无效 LOX-1, 野生型 LOX-2
大麦				
含水量	%*	9.3	9.5	10.5

[0322]

蛋白	%*	12	10.6	10.9
淀粉	%*	61.7	63.0	62.4
萌芽 72 小时	%	100	95	95
萌芽指标		9.9	6.6	8.3
筛选	>2.5 mm	97	98.8	91.6
TKW	G	48.6	55.8	37.5
β -葡聚糖	%, 干燥	4.0	3.6	3.3
β -淀粉酶**	U/g	1039	1458	1027
预测的 DP	WK	385	538	381
麦芽				
发芽时间	H	124	148	124
麦芽产率	%	95.1	95.9	95.3
水分含量	%*	4.8	5.6	4.6
蛋白, 干燥	%*	11.2	10.3	9.9
N, 干燥	%*	1.72	1.65	1.58
可溶 N	%*	0.67	0.62	0.64
麦芽汁				
提取物	%*	81.0	81.0	80.9
β -葡聚糖	%, 干燥	0.2	0.3	0.26
麦芽修饰	%	95	95	96
麦芽同质	%	81	70	71
β -淀粉酶**	U/g	956	1235	937
预测的 DP	WK	385	478	379
α -淀粉酶***	U/g	242	234	264

[0323] * 通过标准的近红外透射光谱测定。

[0324] ** 利用 Megazyme 试剂盒 (产品编号 K-BETA) 测定 β -淀粉酶活性。[0325] *** 利用 Megazyme 试剂盒 (产品编号 K-CERA) 测定 α -淀粉酶活性。

[0326] 实施例 7

[0327] 由双无效 LOX 突变体 A689 的麦芽生产的啤酒中的 THA

[0328] 啤酒特异性的 THA 很可能源于亚油酸 (Drost 等人, 1974)。数个报道已经证明, 啤酒中 THA 的总含量为 5.7-11.4 $\mu\text{g/ml}$ (Hamberg, 1991 ; 和该文件中的参考文件)。9,12,13-THA 通常构成啤酒中 THA 的 75-85%, 而 9,10,13-THA 通常仅构成 15-25% 的 THA。还发现痕量的其它异构体。

[0329] 在由双无效 LOX 大麦突变体 A689 的麦芽制备的麦芽汁产生的啤酒 (参见实施例 8, 不同之处在于使用 60°C 的糖化温度) 中, 与由 cv. Power 的麦芽制备的对照啤酒相比, 9,12,13-THA 的浓度降低 75% ; 且与 LOX-1 无效原始突变体 D112 相比, 降低 45% (表 4)。对于 9,10,13-THA 异构体, 也观察到类似差异。利用标准的 HPLC 质谱分析进行这些测定 (Hamberg, 参见上文)

[0330] 表 4. 由 cv. Power、无效 LOX-1 突变体 D112 和双无效 LOX 突变体 A689 的麦芽产生的啤酒中的 THA (3 次测量的平均值)。

[0331]

麦芽类型	THA		
	9,12,13-	9,10,13-	9,12,13-:9,10,13-
	<i>ppm</i>		<i>比例</i>
cv. Power	3.76	1.12	3.35
突变体 D112	1.72	0.94	1.80
突变体 A689	0.94	0.50	1.88

[0332] 实施例 8

[0333] 实验性发芽和酿造

[0334] 发芽利用双无效 LOX 突变体 A689、无效 LOX-1 突变体 D112 和 cv. Power 的麦粒 (所有情况均为 2007 年收获) 进行所述试验。按照下述在麦芽室中进行 30-kg 规模的发芽:

[0335] (i) 在 16°C 浸泡: 润湿 8 小时; 干燥 14 小时; 润湿 8 小时; 干燥 10 小时; 润湿 4 小时;

[0336] (ii) 发芽: 18°C 12 小时; 16°C 24 小时; 14°C 24 小时; 12°C 60 小时;

[0337] (iii) 干燥: 60°C 12 小时; 68°C 3 小时; 74°C 4 小时; 80°C 3 小时。

[0338] 大麦和麦芽的性质列于表 5。结果的观察表明样本满足酿造用原材料的麦芽规格。

[0339] 表 5. 试验数据

[0340]

样本	cv. Power	突变体 A689	突变体 D112	cv. Barke
LOX 基因型	野生型 LOX-1	无效 LOX-1	无效 LOX-1	野生型 LOX-1

[0341]

		野生型 LOX-2	无效 LOX-2	野生型 LOX-2	野生型 LOX-2
大麦					
蛋白	%*	12.0	10.6	10.9	10.6
淀粉	%*	61.7	63.0	62.5	64.2
萌芽 72 小时	%	100	95	85	100.0
麦芽指标	1-10	9.9	6.6	8.3	9.6
水敏感度	%	1	78	45	14
分级 >2.5 mm	%	97.0	98.8	91.6	88.3
TKW	g	48.6	55.8	37.5	49.5
β -葡聚糖	%, 干燥	4.0	3.6	3.3	3.6
β -淀粉酶**	U/g	1039	1458	1027	1093
麦芽					
浸泡和萌芽时间	h	124	148	124	124.0
提取物	%*	81.0	80.7	80.9	82.5
Kolbach 指标	%	37.5	37.1	40.2	42.0
修饰	%	95	94	97	96
同质	%	81	61	81	83
β -葡聚糖	%, 干燥	0.2	0.3	0.2	0.1
β -淀粉酶**	U/g	956	1261	928	985
α -淀粉酶***	U/g	242	222	262	201

[0342] * 通过标准的近红外透射光谱测定。

[0343] ** 利用 Megazyme 试剂盒 (产品编号 K-BETA) 测定 β -淀粉酶活性。

[0344] *** 利用 Megazyme 试剂盒 (产品编号 K-CERA) 测定 α -淀粉酶活性。

[0345] 利用麦芽进行实验性酿造初始的 200-1 试验 (其主要结果示于图 10A、B) 包括以下步骤:

[0346] (i) 麦芽汁制备;

[0347] (ii) 麦芽汁分离;

[0348] (iii) 麦芽汁煮沸;

[0349] (iv) 发酵;

[0350] (v) 储藏;

[0351] (vi) 清啤酒过滤;和

[0352] (vii) 装瓶。

[0353] 利用野生型 cv. Power、无效 LOX-1 突变体 D112 和双无效 LOX 的 30kg 规模麦芽样本制备麦芽汁。初始糖化 (marshing-in) 在 48°C 持续 20 分钟,然后加热 18 分钟 (其中温度从 48°C 升高至 67°C)。糖化在 67°C 停止 30 分钟,然后为在 72°C 持续 5 分钟的加热步骤,并且在 78°C 结束糖化 (mashing-off) 前静止 15 分钟。上文所指的酿造步骤,即麦芽汁煮沸和过滤、涡旋分离、发酵、储藏和包装在绿色玻璃瓶中,符合用于标准酿造实践的规范。

[0354] 利用与实施例 6 所述相同的试验设定测定所制成的啤酒的 T2N 前体 (图 10)。此

大规模试验的结果显示的 T2N 前体相对水平的趋势与微发芽麦粒的煮沸麦芽汁中相同（比较图 9 和 10），同样显示无效 LOX-1 突变体 D112 和双无效 LOX 突变体 A876 两者与 cv. Power 相比的显著较低的值。更具体地，当与野生型 cv. Power 麦芽的啤酒相比时，无效 LOX-1 和双无效 LOX 的啤酒样本中的 T2N 前体分别降低了 ~ 40% 和 ~ 70%。

[0355] 此外，在上述实验性酿造啤酒中测定了游离 T2N 的水平，同样显示出与观察到的 T2N 潜能相同的趋势，即由无效 LOX-1 和双无效 LOX 麦芽制备的啤酒的 T2N 显著低于用 cv. Power 的麦芽酿造的啤酒。因此，同样证明双无效 LOX 麦芽的啤酒在 T2N 水平方面优于 LOX-1 无效的啤酒。

[0356] 另一个单独目的是确定利用双无效 LOX 原料以 200 升规模生产啤酒时，这些啤酒在强制老化后是否具有优异的品尝性质。因此，要求实施例 9 所述的啤酒品尝专家小组利用 0（无）至 5（极大）的分值评估实验性酿造的正常啤酒在 37°C 强制老化 1 周后的纸样异味味道。发现当 cv. Power 的啤酒产生的纸样分值为 1.6 时，LOX-1 无效和双无效 LOX 的啤酒的纸样分值分别为 1.2 和 0.6。该结果证实了双无效 LOX 原料用于生产风味稳定的啤酒的优越性。

[0357] 实施例 9

[0358] 正常啤酒和大麦酿造啤酒的比较

[0359] 将未发芽的双无效 LOX 突变体 A689、LOX-1 无效大麦突变体 D112 和野生型 cv. Power 的麦粒应用于相同的大麦酿造工艺，其中均使用 25kg 碾磨的未发芽大麦作为生产 2001 啤酒的原料（出于比较目的，在平行进行的试验中使用 30kg 经碾磨的麦芽用以生产 2001 正常啤酒）。目的不仅是比较麦芽汁、来自大麦的啤酒和源自麦芽的酿造物的性质，还在于确定上述突变体是否在大麦酿造的和正常成品啤酒两者中均产生改良的异味性质。200-1 规模的酿造试验包含与上文实施例 8 中所列相同的生产步骤，具体细节描述在下文。

[0360] 利用大麦进行糖化和酿造在本实验中，在根据厂商提供的建议（即每 801H₂O 含 87.5g 酶混合物）在初始糖化时加入的酶混合物 Onda Pro (Novozymes；批号 NFNG0005) 存在下制备麦芽汁。糖化条件为：在 54°C 初始糖化 30 分钟；加热 10 分钟以将温度提高至 64°C；在 64°C 温育 45 分钟；加热至 78°C 持续 13 分钟；在 78°C 停止 10 分钟。所述酿造步骤（麦芽汁过滤和煮沸、涡旋分离、发酵、储藏和包装在绿色玻璃瓶中）符合用于标准酿造实践的规范。

[0361] 标准发芽、糖化和酿造发芽利用双无效 LOX 突变体 A689、无效 LOX-1 突变体 D112 和野生型 cv. Power 的麦粒（均来自 2009 年的收获）。在 16°C 的浸泡温育时间为：湿润 8 小时；干燥 14 小时；湿润 8 小时；干燥 10 小时；湿润 4 小时。发芽条件为：18°C 12 小时；16°C 24 小时；14°C 24 小时；12°C 60 小时。烘干条件为：60°C 12 小时；68°C 3 小时；74°C 4 小时；80°C 3 小时。根据标准的 EBC 方法进行上述原料的大麦和麦芽分析，结果列在表 6。认为所有麦芽均适合酿酒。

[0362] 糖化条件为：在 48°C 初始温育 20 分钟；加热至 67°C，18 分钟；在 67°C 温育 30 分钟；然后加热至 72°C 持续 5 分钟；在 72°C 温育 15 分钟；加热至 78°C 持续 6 分钟；在 78°C 温育 5 分钟结束。所述酿造步骤（麦芽汁过滤和煮沸、涡旋分离、发酵、储藏和包装在绿色玻璃瓶中）符合用于标准酿造实践的规范。

[0363] 煮沸麦芽汁的分析-游离 T2N 基本按照 Groenqvist 等人 (1993)，也可参见实施例

5, 在 C18 柱上固相提取并用 0-(2,3,4,5,6- 五氟苄基) 羟基胺对羰基衍生化后, 通过气相色谱和质谱 (GC-MS) 检测测定提取物中的 T2N 水平。

[0364] 在 cv. Power 和无效 LOX-1 突变体 D112 的样本的直接比较中, 观察到在由双无效 LOX 突变体 A689 的大麦酿造的和正常的麦芽生产的煮沸麦芽汁中游离 T2N 均显著降低 (图 11)。与由无效 LOX-1 突变体 D112 生产的大麦酿造的煮沸麦芽汁相比, 双无效 LOX 突变体 A689 生产的大麦酿造的煮沸麦芽汁显示游离 T2N 水平降低 ~ 45% (对于相应的发芽样本, 降低 ~ 15%)。

[0365] 类似地, 观察到与 cv. Power 的啤酒中游离 T2N 相比, 在双无效 LOX 突变体 A689 的啤酒中游离 T2N 降低 ~ 72% (对与相应的发芽样本, 降低 ~ 45%)。

[0366] 煮沸麦芽汁的分析-T2N前体基本按照 Groenqvist 等人 (参见上文) 的描述, 在用 0-(2,3,4,5,6- 五氟苄基) 羟基胺对羰基衍生化后, 通过 GC-MS 测定 cv. Power、无效 LOX-1 突变体 D112 和双无效突变体 A689 的煮沸的大麦酿造麦芽汁和正常麦芽汁样本中的 T2N 前体。

[0367] 如图 12 所示, 煮沸的大麦酿造麦芽汁和正常麦芽汁的 T2N 前体在来自双无效 LOX 突变体 A689 的样本中明显是最低的, 与野生型 cv. Power 的相比降低 ~ 70% (还记录了与来自无效 LOX 突变体 D112 的样本相比的降低)。

[0368] 仅大麦酿造的啤酒的分析-游离 T2N、强制老化分析源自大麦酿造的麦芽汁样本的发酵并包含类似水平的亚硫酸盐的瓶装啤酒在一个月内随时间产生的 T2N。

[0369] 按照上文的描述使上述大麦酿造啤酒在 37°C 强制老化以形成游离 T2N。

[0370] 如图 13A 所例示, 根据 T2N 形成动力学的显著差异的结果, 可以容易地区分三种类型的大麦酿造啤酒。当 cv. Power 大麦的对照啤酒的表现与所预期相同 (在 37°C 8 周后 64ppt T2N, T2N 水平比基于麦芽的类似啤酒高 10-20% (未显示)) 的同时, 在源自双无效 LOX 突变体 A689 的大麦啤酒中观察到意外且显著低的 T2N 形成 (在 37°C 8 周后 16ppt T2N), 相当于最终啤酒中的游离 T2N 降低 75%。无效 LOX-1 突变体 D112 的大麦酿造啤酒中, 8 周后游离 T2N 比野生型麦粒的相同类型的啤酒相比少 52%。

[0371] 强制老化试验强调了所分析的啤酒之间的显著差异。在 1.5 周后, cv. Power 的大麦酿造对照啤酒的 T2N 水平超过 ~ 50ppt 的品尝阈值水平, 而双无效 LOX 突变体 689 的 T2N 水平稳定在 ~ 16ppt, 因此远好于无效 LOX-1 突变体 D112 的大麦酿造啤酒的 32ppt T2N。

[0372] 大麦酿造啤酒和正常啤酒的比较-T2N前体在图 13B 中提供了表明均以大麦酿造原材料和发芽原材料生产的 200 升体积的新鲜啤酒中的 T2N 前体水平的数据概述。双无效 LOX 原料在所测定的性质方面同样较好, 实际上大麦酿造的啤酒中的 T2N 潜能 (1.2ppb) 比用 LOX-1 无效麦芽产生的啤酒的 T2N 潜能 (1.5ppb) 低。

[0373] 大麦酿造啤酒和正常啤酒的比较-强制形成的 T2N在 37°C 强制老化的情况下, 由野生型原材料和突变体原材料制备的啤酒之间也具有显著差异 (图 13C)。野生型 cv. Barke 麦粒的大麦酿造啤酒和正常啤酒在 2 周后均显示 ~ 50ppt T2N, 无效 LOX-1 突变体 D112 和双无效 LOX 突变体 A876 的原材料的相应值分别降低 ~ 50% 和 ~ 75%。在强制老化三周后观察到同样的趋势。因此, 证实在啤酒生产中使用 LOX 酶具有缺陷的原材料代表了显著降低老化过程中 T2N 的形成的优选途径。并且, 在此方面, 双无效 LOX 突变体 A876 的原材料也优于无效 LOX-1 突变体 D112 的原料。

[0374] 大麦酿造啤酒和正常啤酒的比较 -THA 在过去的数十年已经对由亚油酸衍生的啤酒特异性 THA 进行了描述 (Drost 等人, 1974)。自此, 多个报道都已经证明, 啤酒中 THA 的总量在 ~ 5 -12ppm 的范围 (Hamberg, 1991 ; 和其中的参考文献)。9, 12, 13-THA 通常构成啤酒中 THA 的 75-85%, 而 9, 10, 13-THA 占 THA 的 15-25%, 还发现痕量的其它异构体。

[0375] 在利用无效 LOX-1 突变体 D112 和双无效 LOX 突变体 A689 的原料的 200 升规模试验的新鲜大麦酿造啤酒中, 发现与 cv. Power 对照相比, 源自 LOX-1 和 LOX-2 通路的 9, 12, 13-THA 和 9, 10, 13-THA 的水平分别降低 $\sim 60\%$ 和 $\sim 80\%$ (图 14A)。在无效 LOX-1 突变体 D112 的大麦酿造啤酒中测出意外高水平的 9, 10, 13-THA (来自 LOX 通路的 LOX-2 分支的主要 THA 产物), 即与 cv. Power 的啤酒的相比为 +47%。此结果与用双无效 LOX 突变体 A689 获得的结果相反, 同样与 cv. Power 相比, 利用双无效 LOX 突变体 A689 获得的所述结果降低了 60%。独立试验的结果证明了上述结论。所述观察结果的分子基础仍不清楚, 但推测可能是某些细胞机制被激活, 从而通过增强参与 9, 10, 13-THA 形成的酶的合成而弥补突变体 D112 中缺失的 LOX-1。

[0376] 出于该原因, 由双无效 LOX 突变体 A689 产生的大麦酿造啤酒产生显著低于 cv. Power 的 9, 12, 13-THA : 9, 10, 13-THA 比例。

[0377] 9, 12, 13-THA 和 9, 10, 13-THA 水平的测定以及其比例的测定代表了用以显示啤酒是否为利用双无效 LOX 突变体 A689 的大麦生产的便利的初级工具。然而, 更严格的评价方法可包括如本申请所描述的其他检测。

[0378] 在由双无效 LOX 突变体 A689 产生的啤酒中, 发现源自 LOX 通路的 9, 12, 13-THA 和 9, 10, 13-THA 的浓度与发芽 cv. Power 的对照啤酒相比分别降低 $\sim 75\%$ 和 $\sim 40\%$ (图 14B)。在所述啤酒中, 还可以计算出与 cv. Power 的啤酒相比非常低的 9, 12, 13:THA : 9, 10, 13-THA 比例。通常 (但非所有情况下), 基于麦芽的啤酒中的 THA 水平略低于大麦酿造的啤酒 (比较图 14A 和 B)。

[0379] 单独的大麦酿造啤酒分析 - 味道和风味稳定性 风味专家小组评价了 cv. Power、无效 LOX-1 突变体 D112 和双无效 LOX 突变体 A689 的上述强制老化的大麦酿造啤酒。

[0380] 大体上, 品尝小组发现所有类型的新鲜和在 37°C 下持续 1 周后的强制老化啤酒都具有令人满意的风味谱。然而, 对照啤酒的“纸样”味道分值显著高于利用双无效 LOX 突变体 A689 和无效 LOX-1 突变体 D112 产生的啤酒 (图 15A), 即对照啤酒的特征在于所述异味的味道较重。通常, 品尝小组优选由突变体 A689 的双无效 LOX 大麦产生的大麦酿造啤酒。

[0381] 受过培训的品尝小组还评价了啤酒在 30°C 储藏 1 个月和 3 个月后较一般的“老化”味道, 同样证明 cv. Power 和 LOX-1 无效的啤酒的所述风味分值显著高于双无效大麦突变体 A689 (图 15B)。

[0382] 总之, 双无效 LOX 突变体 689 的大麦酿造啤酒和正常啤酒的风味稳定性的改善是显著的, 简要的原因在于在储藏后, 特别是高温储藏后的低 T2N 水平。因此, LOX-1 和 LOX-2 在酿造背景中的作用提供了老化啤酒中的主要异味化合物 T2N 产生的决定性作用。

[0383] 大麦酿造啤酒和正常啤酒的比较 - 啤酒泡沫 在 150ml 啤酒中加入 50ml H_2O 前, 将大麦酿造啤酒和对照啤酒在超声浴中脱气 20 分钟。将混合物缓慢倒入由 16-cm 长、7-cm 宽的玻璃管组成的泡沫塔中 (在底部和顶部分别带有玻璃滤器和连接器)。将 N_2 气以 $400ml\ min^{-1}$ 流速从底部鼓动通过所述混合物以产生啤酒泡沫, 将其引导通过试管, 并收集到置于

秤 (weight) 上的分级沉淀锥中。

[0384] 对于大麦酿造的啤酒 (图 16A) 和麦芽酿造的啤酒 (图 16B) 两者均以 5 分钟的时间间隔记录泡沫总重直至停止泡沫形成。在任一种情况下, 来自双无效 LOX 突变体 A689 的原材料的啤酒均产生最多泡沫。实际上, 大麦酿造的啤酒中的泡沫形成优于基于麦芽的相应啤酒。

[0385] 表 6. 大麦、麦芽、麦芽汁和啤酒分析

[0386]

样本		cv. Power	突变体 D112	突变体 A689
大麦分析物				
蛋白	%*	11.7	11.2	10.1
淀粉	%*	63.3	62.9	62.7
麦芽、麦芽汁和啤酒分析物				
萌芽 72 小时	%	98	99	99
萌芽指数	1-10	8.4	7.8	7.8
水敏感度	%	9	17	24
分级>2.5 mm	%	96.2	98.9	98.0
TKW	g	48.2	54.2	47.7
β -淀粉酶(大麦)*	U/g	1039	979	1491
反式-2-壬烯醛 [†]	ppb	270	190	150
浸泡和萌芽				
浸泡和萌芽	h	120	120	120
提取物	%*	81.5	81.2	81.4
可溶性 N	%, NIT*	0.67	0.63	0.64
修饰	%	96	97	97
同质	%	88	86	81
β -淀粉酶**	U/g	768	865	1007
α -淀粉酶***	U/g	175	172	200
反式-2-壬烯醛 [†]	ppb	1100	470	390
醇	%	3.94	3.87	3.80
真实提取物	% Plato	3.76	3.80	3.30
Ph		4.3	4.2	4.2
颜色	EBC U	7.1	8.2	5.2
起始提取物	% Plato	11.42	11.33	10.72
真实的发酵程度	%	68.4	67.8	70.4
醇	%(vol.)	4	3	4
CO ₂	g/l	5.6	6.1	5.9
SO ₂	ppm	4	4	5
联乙酰	ppm	23	21	10

[0387]

[0388] * 通过标准的近红外透射光谱测定。

[0389] ** 利用 Megazyme 试剂盒 (产品编号 K-BETA) 测定 β -淀粉酶活性。

[0390] *** 利用 Megazyme 试剂盒 (产品编号 K-CERA) 测定 α -淀粉酶活性。

[0391] † 基本按照 Groenqvist 等人 (1993) 的描述测定。

[0392] 实施例 10

[0393] 大麦突变体 A689 中的 LOX-2 基因是突变的

[0394] 按照下文的描述获得编码 cv. Barke 的 LOX-2 的基因组核苷酸序列 (SEQ ID NO: 1) 和双无效 LOX 突变体 A689 的 LOX-2 的基因组核苷酸序列 (SEQ ID NO: 2)。随后比较所获得的序列, 以确定突变体 A689 的 LOX-2 无效基因型的分子基础, 其中突变体 A689 的表型特征在于在萌芽大麦谷粒中没有 LOX-2 活性。

[0395] 出于所述比较目的, 利用植物 DNA 提取试剂盒 (Roche) 从秧苗的子叶分离突变体 A689 和野生型 cv. Barke 的大麦基因组 DNA。利用引物 5' -CGCAGCGAGCTAACTTAGAAGCGTGC CACA-3' (SEQ ID NO: 3) 和 5' -CCTCATGCCTTTGTGCTATCCTTGCTTGCT-3' (SEQ ID NO: 4) 通过 PCR 扩增覆盖突变体 A689 和 cv. Barke 的基因组 DNA 中的 LOX-2 的蛋白编码区的两个 3331-bp 的序列, 引物序列的基础包含 LOX-2 基因的基因组序列 (即 SEQ ID NO: 1)。

[0396] PCR 反应由重悬在含 5pmol 各引物和 3.0U FailSafe 聚合酶 (Epicentre) 的 20 μ l 反应缓冲液中的 100ng 基因组 DNA 组成。利用以下参数在 MJ 循环仪中进行 PCR 扩增: 98°C 30 秒 1 个循环; 98°C 15 秒、65°C 30 秒、72°C 60 秒共 30 个循环; 72°C 10 分钟 1 个循环。将所产生的 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上分离, 利用 Qiaex II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 纯化长度与扩增子对应的 DNA 片段, 并插入到质粒载体 pCR Blunt II TOPO Blunt (Invitrogen) 中。将所述编码序列应用至利用特定寡核苷酸引物的二脱氧核苷酸链式终止反应, 然后在 MegaBACE1000DNA 测序仪 (GE Biosystems) 上进行序列测定。在图 17 中显示了跨越 LOX-2 编码区的起始密码子和终止密码子的基因组序列的示意图。利用 Lasergene 序列分析软件包第 5.2 版 (DNASTAR) 进行序列比较, 表明在外显子 6 中的 SEQ ID NO: 2 的第 2689 位以 G \rightarrow A 取代形式的一个点突变 (图 17)。

[0397] LOX-2 的野生型序列编码长度为 864 个残基的蛋白 (SEQ ID NO: 5), 预测的质量为 96.7kDa。而突变体 D112 在 LOX-1 编码序列中第 684 位的突变引起提前终止密码子的引入, 突变体 A689 的 LOX-2 编码序列中的突变导致 180 个氨基酸的 C 末端截短, 因此编码 76.8-kDa 蛋白 (SEQ ID NO: 6)。

[0398] 表 7 提供了与野生型大麦、LOX-1 无效大麦突变体 D112 (描述在 W02005/087934 中) 和大麦突变体 A689 (双无效 LOX) 的 LOX-2 基因有关的分子差异的总结。

[0399] 表 7. 野生型和突变大麦的分子数据

[0400]

性质	野生型大麦	突变体 D112*	突变体 A689
LOX 基因型	野生型 LOX-1, 野生型 LOX-2	无效-LOX-1, 野生型 LOX-2	无效-LOX-1, 无效-LOX-2
碱基突变**			
LOX-1	-	G3474→A	G3474→A
LOX-2	-	-	G2689→A
蛋白数据***			
LOX-1	862 aa (96.4 kDa)	665 aa (74.2 kDa)	665 aa (74.2 kDa)
LOX-2	864 aa (96.7 kDa)	864 aa (96.7 kDa)	684 aa (76.8 kDa)

[0401] * 突变体 A689 的母本系 Ca211901 显示相同的性质。

[0402] ** 根据 WO 2005/087934 的 SEQ ID NO :1 的 LOX-1 基因的序列编号,和根据本申请的 SEQ ID NO :1 的 LOX-2 基因的序列编号。

[0403] *** 预测的蛋白的氨基酸长度 (aa),和括号内预测的相应质量。

[0404] 实施例 11

[0405] 大麦双无效 LOX 突变体 A689 的遗传检测

[0406] 单核苷酸多态性 (SNP) 试验代表了用以鉴定植物突变体的常规方式。SNP 在此表示在一个位点将有至少两个不同核苷酸的突变点。所述试验基于利用基因组 DNA 作为模板的两组 PCR 反应的组合应用。两个反应均包含位点特异性引物和两个 SNP 引物之一 (每个等位基因序列各一个)。每个植物系进行两组 PCR 反应,PCR 反应的结果为 SNP 引物结合至突变体的序列或者结合至野生型等位基因 (图 18A)。在数个方法中的一个方法中,SNP 分析可基于评价在 PCR 产物的凝胶电泳后的条带图而鉴定突变系。

[0407] 根据厂商的建议,使用植物 DNA 提取试剂盒 (Roche) 从秧苗的叶组织分离来自大麦育种系和野生型 cv. Quench 的大麦基因组 DNA。用以扩增野生型 LOX-2 基因的 SNP 的寡核苷酸引物为 5' -ACCTCAAGGACGCGGCGTGG-3' (SEQ ID NO :7) 和 5' -GAGCGAGGAGTACGCGGAG-3' (SEQ ID NO :8),而用于相应突变基因的引物为 5' -ACCTCAAGGACGCGGCGTGA-3' (SEQ ID NO :9) 和 5' -GAGCGAGGAGTACGCGGAG-3' (SEQ ID NO :8)。在 PCR 反应中使用这些引物组合,以扩增分别包含双无效 LOX 突变体 A689 和 cv. Quench 的 LOX-2 部分编码区的 200bp 的 DNA 片段 (图 18A)。PCR 反应物由在含 25pmol 引物和 7 μ l REDTaq 混合物 (Sigma) 的 20 μ l 反应缓冲液中的 100ng 基因组 DNA 组成,根据厂商的说明使用。在 MJ 循环仪中进行 29 个循环的 PCR 扩增 :96°C 2 分钟 1 个循环 ;95°C 1 分钟 ;68°C 1 分钟 ;72°C 1 分钟 ;72°C 延伸 10 分钟结束。

[0408] 具有 LOX-1 突变的纯合大麦植物和具有 LOX-2 突变的纯合植物之间的交互授粉可导致 4 个不同的事件。利用至少两组引物 :用于鉴定 LOX-1 突变 (LOX-1 基因在第 3474 位的 G → A 突变) 的一个 SNP 引物对 FL820 (SEQ ID NO :10 和 FL823 (SEQ ID NO :11) 和用于鉴定 LOX-2 突变 (LOX-2 基因 (SEQ ID NO :1) 在第 2689 位的 G → A 突变) 的一个 SNP 引物对 FL1034 (SEQ ID NO :9) 和 FL1039 (SEQ ID NO :8),应该可能鉴定四个上述杂交事件之一 (列于图 18B)。换句话说,可以利用单个组合的 PCR 反应产生特异于上述 LOX-1 和 LOX-2 两个突变的 PCR 产物。用以扩增用来检测 LOX-1 基因中第 3474 位的 G → A 突变的 SNP PCR 产物的寡核苷酸引物为 5' -CAAGGTGCGGTTGCTGGTGTC-3' (SEQ

- [0421] American Association of Cereal Chemists, " Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. " ISBN 0-913250-86-4(1995).
- [0422] American Society of Brewing Chemists, " Methods of analysis of the American Society of Brewing Chemists. " ISBN 1-881696-01-4(1992).
- [0423] Baur, C. and Grosch. W., " Investigation about the taste of di-, tri- and tetrahydroxy fatty acids. " Z. Lebensm. Unters. Forsch. 165 :82-84(1977).
- [0424] Baur, C. et al., " Enzymatic oxidation of linoleic acid; Formation of bitter tasting fatty acids. " Z. Lebensm. Unters. Forsch. 164 :171-176(1977).
- [0425] Briggs, D. E. et al., " Malting and brewing science. Volume I Malt and sweet wort. " Chapman and Hall, New York, USA. ISBN 0412165805(1981).
- [0426] Drost, B. W. et al., " Role of individual compounds in beer staling. " Tech. Q. MBAA 11 :127-134(1974).
- [0427] Durai, S. et al., " Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. " Nucleic Acids Res. 33 :5978-5990(2005).
- [0428] European Brewery Convention. " Analytica-EBC. " ISBN 3-418-00759-7(1998).
- [0429] Groenqvist, A. et al., " Carbonyl compounds during beer production in beer. " Proceedings of the 24th EBC Congress, Oslo, pp. 421-428(1993).
- [0430] Hamberg, M., " Trihydroxyoctadecenoic acids in beer; Qualitative and quantitative analysis. " J. Agric. Food Chem. 39 :1568-1572(1991).
- [0431] Hansen, M. et al., " Antisense-mediated suppression of C-hordein biosynthesis in the barley grain results in correlated changes in the transcriptome, protein profile, and amino acid composition. " J. Exp. Bot. 58 :3987-3995(2007).
- [0432] Hough, J. S. et al., " Malting and brewing science. Volume II Hopped wort and beer. " Chapman and Hall, New York, USA. ISBN 0412165902(1982).
- [0433] Iida, S. and Terada, R., " Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants. " Plant Mol. Biol. 59 :205-219(2005).
- [0434] Institute of Brewing, " Institute of Brewing. Methods of analysis. " ISBN 0-900489-10-3(1997).
- [0435] Jamieson, A. M. and van Gheluwe, J. E. A., " Identification of a compound responsible for cardboard flavor in beer. " Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 29 :192-197(1970).
- [0436] Kleinhofs, A. et al., " Induction and selection of specific gene mutations in *Hordeum* and *Pisum*. " Mut. Res. 51 :29-35(1978).
- [0437] Kumar, S. et al., " Gene targeting in plants: fingers on the move. " Trends Plant Sci. 11 :159-161(2006).

- [0438] Kuroda, H. et al., " Characterization of factors involved in the production of 2(E)-nonenal during mashing. " *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 : 691-697 (2003).
- [0439] Kuroda, H. et al., " Characterization of 9-fatty acid hydroperoxide lyase-like activity in germinating barley seeds that transforms 9(S)-hydroperoxy-10(E).12(Z)-octadecadienoic acid into 2(E)-nonenal. " *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 :1661-1668 (2005).
- [0440] Lermusieau, G. et al., " Nonoxidative mechanism for development of trans-2-nonenal in beer. " *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57 :29-33 (1999).
- [0441] Liégeois, C. et al., " Release of deuterated(E)-2-nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized before boiling. " *J. Agric. Food Chem.* 50 :7634-7638 (2002).
- [0442] Maquat, L. E. and Carmichael, G. G., " Quality control of mRNA function. " *Cell* 104 :173-176 (2001).
- [0443] Meilgaard, M. C., " Flavor chemistry of beer :Part II :Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. " *Tech. Q. MBAA* 12 :151-167 (1975).
- [0444] Mendell, J. T. and Dietz, H. C., " When the message goes awry : Disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. " *Cell* 107 :411-414 (2002).
- [0445] Nevo, E., " Resources for Breeding of Wild Barley. " In : " *Barley : Genetics. Biochemistry. Molecular Biology and Biotechnology.* " Shewry, P. R., ed., pp. 3-18. C. A. B. International. ISBN 0-85198-725-7 (1992).
- [0446] Noordermeer, M. A. et al., " Fatty acid hydroperoxide lyase : A plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. " *ChemBioChem* 2 :494-504 (2001).
- [0447] Nyborg, M. et al., " Investigations of the protective mechanism of sulfite against beer staling and formation of adducts with trans-2-nonenal. " *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57 :24-28 (1999).
- [0448] Rasmussen, S. K. and Hatzack, F., " Identification of two low-phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) grain mutants by TLC and genetic analysis. " *Hereditas* 129 :107-112 (1998).
- [0449] Robbins, M. P. et al., " Gene manipulation of condensed tannins in higher plants. " *Plant Physiol.* 116 :1133-1144 (1998).
- [0450] Sambrook, J. and Russell, D. W., " *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 3rd Ed. " , Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. ISBN 0-87969-577-3 (2001).
- [0451] Schmitt, N. F. and van Mechelen, J. R., " Expression of lipoxygenase isoenzymes in developing barley grains. " *Plant Sci.* 128 :141-150 (1997).
- [0452] Stahl, Y. et al., " Antisense downregulation of the barley limit

dextrinase inhibitor modulates starch granule sizes distribution. starch composition and amylopectin structure" .Plant J. 39 :599-611(2004).

[0453] Tzfira, T. and White. C., " Towards targeted mutagenesis and gene replacement in plants. " Trends Biotechnol. 23 :567-569(2005).

[0454] von Bothmer, R. et al., " Diversity in barley (Hordeum vulgare). " In: " Diversity in Barley (Hordeum vulgare). " von Bothmer, R., van Hintum, T., Knüpffer, H., Sato. K., eds., pp. 129-136. ISBN 0-444-50587-7(2003). Also available at <http://www.genres.de/>.

[0455] Wackerbauer, K. and Meyna, S., "Freie und triglyceride-gebundene **Hydroxyfettsäuren** in Gerste und Malz ", Monatsschrift für Brauwissenschaft, heft3/4 :52-57(2002).

[0456] Wu, J. et al., " Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) silences the accumulation of aberrant trypsin proteinase inhibitor mRNA in *Nicotiana attenuata*. " Plant J. 51 :693-706(2007).

[0001]

序列表

<110> 嘉士伯酿酒有限公司(Carlsberg Breweries A/S)
海尼肯供应链股份有限公司(Heineken Supply Chain B.V.)

<120> 脂加氧酶活性降低的大麦

<130> P1599PC00

<160> 11

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 3229

<212> DNA

<213> 大麦cv: Barke

<400> 1

```

atgtttggcg tcggcggcat cgtgagcgcac ctgacggggg gcctccgggg cgcccacctc      60
aagggtcccg tcgtcctcat gcgcaagaac gcgctcgact tcaacgactt cggcgccacc      120
gtcatggacg gcgtcaccga gctcctcggc cgcggcgctca cctgccagct catcagctcc      180
accacgctcg accacagtga gcactcactc gccactcccc gttttgtaat ccctgccact      240
gtgatacatg gaaaacggaa gcagatccgc atcctcagc cccaaccaag caaataatat      300
atataaagaa ctaaaatgca cgtatggta cggatgcatg cttatgcttg agcttgagct      360
tgagcttgag agacagggac gtgcaaaaaa taacttaata atggagtaac taatgtgaga      420
catgacgcac ggaggggttt accttactac taattaattg tcgagcagac aacggtgggc      480
gcgggaaggt gggcgcggag gcgaacctgg agcagtggtc cctgccgacg aacctgccgt      540
tcataccac cggcgagaac aagttcgcg tcaccttoga ctggtcggtg gacaagctgg      600
gggtgccggg ggccatcatc gtcaagaaca accacgcctc cgagttcttc ctcaagacca      660
tcacctoga caactgccc ggccgcggca ccatcgtett cgtgccaac tcatgggtet      720
accgcagc caagtaccg tacaaccggt tcttcttcgc caacgacgtg agtattttat      780
acgagtacca ctccatggta gctagtagca tggatttcgc ttgctcgatg cctgactggt      840
cggttccggt gggacatacg tgccgcagac gtacctgccg caccagatgc cggcggcgt      900
gaagccgtac cgcgacgacg agctccggaa cctgaggggc gacgaccagc aggggcccta      960
cctggaccac gaccgcgtct accgctacga cgtctacaac gacctcggcg actcccgcga      1020
cgtcctcggc ggctccaagg acctccccta cccgcgccgc tgccgcaccg gccggaagcc      1080
ctcggacagc agtgcgtgtc tectcectc tecttcttt cgatctcccc ataacgtgta      1140

```

[0002]

cttggctctga caagcatgtg tggccgacgc agagcccagc cacgagagcc ggctgctgcc	1200
gctggtgcag aacgtctacg tgccgcgcga cgagctcttc ggccacctca agcagtcgga	1260
cttcctgggc tacacgctca aggcgctggt ggacgggatc ataccggcca tccgcaccta	1320
cgtcgacctc tccccggcg agttogactc cttcgccgac atcctcaagc tctacgaggg	1380
cggcacaaag ctgcccaca tcccggccct cgaggagggtg cgcaagcgct tcccgtcca	1440
gctcgtcaag gacctcatc ccaagggcgg cgacttctc ctcaagctcc ccaagccgga	1500
gatcatcaag gtagaccaga aagcgtggat gactgacgag gatttcgcca gggagatgct	1560
cgccggcgtc aacccatga tgatcaaag cctcacctg agtgaccac tccatctacc	1620
ggccattgaa caaaatcgtc catacatgct actaatcaat actcacaccg ttttgaccgc	1680
gtgtgcagga gttccctccc aagagcactc tggatccgag caagtacggc gaccacacca	1740
gcacatgac cgaggagcac gtggccaaga gcttgaggg cctcacctg cagcaggcgc	1800
tcgccgcaa caggtcttac atcgtagacc agcacgaaa cctgatgcc ttctgatcg	1860
acatcaaaa cctcgacgcc agcttcgtgt acgccaaa gacgctgctc ttctgagag	1920
gggacggcac gctggcgccg gtcgcatcg agctgagctc gccgctgac cagggcgagc	1980
tgaccaccgc caagagcgc gtgtacacgc cgcagcacgc cggcgtggag ggctggatat	2040
ggcagctcgc caaggcctac gcctccgtga acgactacgg gtggcaccag ctcatcagcc	2100
actggctcaa cacgcacgcc gtcatggagc cttcgtcat ccccaccaac aggcagctca	2160
gcgtcaccca cccgtctac aagctcctgc accgcacta ccgcgacacc atgaacatca	2220
acgcgcgggc gcgcgggctg ctcatcaacg ccggcggcgt catcgagatg accgtgttcc	2280
cgcacaagca cgccatgcc atgtcctcca tggctacaa gacttgaac ttcaccgaac	2340
aagctctccc cgccgatcta atcaagaggt gcaacatggt tacattatat aattgacgaa	2400
acggtccttg atttgatcaa aatgattaat cgatcttgat ggttgatgat gatgtagggg	2460
catggcggtg gaggacgcat cgagcccgca caaggtgcgg ctgctgatca aggactaccc	2520
gtacgcgacc gacgggctgg ccgtgtggga cgccatcgag cagtgggtgt cggactacct	2580
gaccatctac taccccaacg acggcgtgct gcagggcgac gtggagctgc aggcgtggtg	2640
gaaggagggtg agggaggctg ggcacggcga cctcaaggac gcggcgtggt ggccaaagat	2700
gcagacggtg gcggagctga tcaaggcgtg cgccaccatc atctggaccg ggtcggcgct	2760
ccacgcggcc gtcaacttcg ggcagtacc cttactcggc taccaccca acaagccgtc	2820
ggcgagccgg aggccgatgc cgtgcaggg gagcaggag tacgcggagc tggagcgaga	2880

[0003]

cccggagaag gccttcatcc gcaccatcac cagccagttc catgccctgg tgggcatctc 2940
 gctcatggag atcctctcca agcactcctc cgacgaggtc tacctgggcc agcacgacac 3000
 gccggcgtgg acgtcggacg ccaaggcgct ggaggcgttc aagcggttcg gggcgaagct 3060
 ggagggcata gagaagcagg tggtgccat gaactcggac ccgcagctaa agaaccgcac 3120
 cgggccggcc aagttcccat acatgctgct ctacccaaac acctccgacc acacgggaca 3180
 ggccgagggg ctcaccgcca ggggcatccc gaacagcata tccatctga 3229

<210> 2

<211> 3229

<212> DNA

<213> 大麦突变体A689

<400> 2

atgtttggcg tcggcggcat cgtgagcgac ctgacggggg gctccgggg cgcccacctc 60
 aagggctccg tegtctcat gcgaagaac gcgctcgact tcaacgactt cggcgccacc 120
 gtcattggac ggtcaccga gctcctcggc cgcggcgtea cctgccagct catcagctcc 180
 accaacgtcg accacagtga gcaactcactc gccactcccc gttttgtaat cectgccact 240
 gtgatacatg gaaaacggaa gcagatccgc atcctcagc ccgaaccaag caaataatat 300
 atataaagaa ctaaaatgca cgtatggtta cggatgcatg cttatgcttg agcttgagct 360
 tgagcttgag agacaggac gtgcaaaaaa taacttaata atggagtaac taatgtgaga 420
 catgacgcac ggagggggtt accttactac taattaattg tcgagcagac aacgggtggc 480
 gcgggaaggt gggcgcggag gcgaacctgg agcagtggct cctgccgacg aacctgccgt 540
 tcataccac cgcgagAAC aagttcgccg tcaccttga ctggtcggtg gacaagctgg 600
 ggggtgccggg ggccatcatc gtcaagaaca accacgctc cgagttcttc ctcaagacca 660
 tcaccttga caactgccc ggccgcggca ccatcgtctt cgtcggcaac tcattgggtct 720
 acccgcaggc caagtaccgc tacaaccgag tcttcttcgc caacgacgtg agtattttat 780
 acgagtacca ctccatggtg gctagtagca tggatttcgc ttgctcgatg cctgactggt 840
 cggttccggt gggacatacg tgccgcagac gtacctgccg caccagatgc cggcggcgct 900
 gaagccgtac cgcgacgacg agctccggaa cctgaggggc gacgaccagc aggggcctta 960
 cctggaccac gaccgctct accgctacga cgtctacaac gacctcggcg actcccgcga 1020
 cgtcctcggc ggtccaagg acctccccta cccgcgccg tggcgcaccg gccggaagcc 1080
 ctcggacagc agtgcgtgtc tctccttctc tcttctttt cgatctcccc ataactgtga 1140

[0004]

cttggtctga caagcatgtg tggccgacgc agagcccgcac cacgagagcc ggctgctgcc 1200
 gctggtgcag aacgtctacg tgccgcgcga cgagctcttc ggccacctca agcagtcgga 1260
 cttcctgggc tacacgctca aggcgctggt ggacgggatc ataccggcca tccgcaccta 1320
 cgtcgacctc tccccggcg agttcgactc cttegcgcac atcctcaagc tctacgaggg 1380
 cggcatcaag ctgccaaca tcccggccct cgaggagggtg cgcaagcgtc tcccgtcca 1440
 gctcgtcaag gacctcatcc ccaagggcgg cgacttctc ctcaagetcc ccaagccgga 1500
 gatcatcaag gtagaccaga aagcgtggat gactgacgag gagttcgcca gggagatgct 1560
 cgccggcgtc aaccccatga tgatcaaacg cctcaccgtg agtgaccac tccatctacc 1620
 ggccattgaa caaaatcgtc catacatgtc actaatcaat actcacaccg ttttgaccgc 1680
 gtgtgcagga gttccctccc aagagcactc tggatccgag caagtacggc gaccacacca 1740
 gcacatgac cgaggagcac gtggccaaga gcctggaggg cctcaccgtg cagcaggcgc 1800
 tcgccggcaa caggctctac atcgtagacc agcacgacaa cctgatgccg ttctgatcg 1860
 acatcaacaa cctcgacgcc agcttcgtgt acgccacaag gacgctgctc ttctgagcg 1920
 gggacggcac gctggcgccg gtcgccatcg agctgagctc gccgctgatc cagggcgagc 1980
 tgaccaccgc caagagcgcg gtgtacacgc cgcagcacgc cggcgtggag ggctggatat 2040
 ggcagctcgc caaggcctac gcctcctgta acgactacgg gtggcaccag ctcatcagcc 2100
 actggctcaa cacgcacgcc gtcattggagc ccttcgtcat gccaccaac aggcagctca 2160
 gcgtcaccca cccggtctac aagctcctgc acccgacta ccgcgacacc atgaacatca 2220
 acgcgcgggc gcgcgggctg ctcatcaacg ccggcggtg catcgagatg accgtgttcc 2280
 cgcacaagca cgccatgcc atgtctcca tggctctaaa gcaactggaac ttcaccgaac 2340
 aagctctccc cgccgatcta atcaagaggt gcaacatggt tacattatat aattgacgaa 2400
 acggtccttg attgatcaa aatgattaat cgatcttgat ggttgatgat gatgtagggg 2460
 catggcgggtg gaggacgcat cgagcccgc caaggtgcgg ctgctgatca aggactaccc 2520
 gtacgcgacc gacgggctgg ccgtgtggga cgccatcgag cagtgggtgt cggactacct 2580
 gaccatctac taccccaacg acggcgtgct gcagggcgac gtggagctgc aggcgtggtg 2640
 gaaggaggtg agggaggtcg ggcacggcga cctcaaggac gcggcgtgat ggccaaagat 2700
 gcagacggtg gcggagctga tcaaggcgtg cgccaccatc atctggaccg ggtcggcgtc 2760
 ccacgcggcc gtcaacttcg ggcagtacc ctactcgggc taccaccca acaagccgtc 2820

[0005]

ggcgagccgg aggccgatgc cgggtgcaggg gagcgaggag tacgcggagc tggagcgaga 2880
cccggagaag gccttcatcc gcaccatcac cagccagttc catgccctgg tgggcatctc 2940
gctcatggag atcctctcca agcactcctc cgacgaggtc tacctgggcc agcacgacac 3000
gccggcgtgg acgtcggacg ccaaggcgtc ggaggcgttc aagcggttcg gggcgaagct 3060
ggagggcata gagaagcagg tgggtgceat gaactcggac ccgcagctaa agaaccgcac 3120
cgggcccggc aagtcccat acatgctgct ctacccaaac acctccgacc acacgggaca 3180
ggccgagggg ctaccgccca ggggcatccc gaacagcata tccatctga 3229

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 大麦LOX-2 gDNA的扩增用引物

<400> 3
cgcagcgagc taacttagaa gcgtgccaca 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 大麦LOX-2 gDNA的扩增用引物

<400> 4
cctcatgcct ttgtctatc cttgcttget 30

<210> 5
<211> 864
<212> PRT
<213> 大麦cv: Barke

<400> 5

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

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

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

[0006]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0007]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0008]

500					505					510					
Trp	His	Gln	Leu	Ile	Ser	His	Trp	Leu	Asn	Thr	His	Ala	Val	Met	Glu
		515					520					525			
Pro	Phe	Val	Ile	Ala	Thr	Asn	Arg	Gln	Leu	Ser	Val	Thr	His	Pro	Val
	530					535					540				
Tyr	Lys	Leu	Leu	His	Pro	His	Tyr	Arg	Asp	Thr	Met	Asn	Ile	Asn	Ala
545					550					555					560
Arg	Ala	Arg	Gly	Leu	Leu	Ile	Asn	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Glu	Met	Thr
				565					570						575
Val	Phe	Pro	His	Lys	His	Ala	Met	Pro	Met	Ser	Ser	Met	Val	Tyr	Lys
			580					585					590		
His	Trp	Asn	Phe	Thr	Glu	Gln	Ala	Leu	Pro	Ala	Asp	Leu	Ile	Lys	Arg
		595					600					605			
Gly	Met	Ala	Val	Glu	Asp	Ala	Ser	Ser	Pro	His	Lys	Val	Arg	Leu	Leu
	610					615					620				
Ile	Lys	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Ala	Thr	Asp	Gly	Leu	Ala	Val	Trp	Asp	Ala
625					630					635					640
Ile	Glu	Gln	Trp	Val	Ser	Asp	Tyr	Leu	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Pro	Asn	Asp
				645					650					655	
Gly	Val	Leu	Gln	Gly	Asp	Val	Glu	Leu	Gln	Ala	Trp	Trp	Lys	Glu	Val
			660					665						670	
Arg	Glu	Val	Gly	His	Gly	Asp	Leu	Lys	Asp	Ala	Ala	Trp	Trp	Pro	Lys
		675					680						685		
Met	Gln	Thr	Val	Ala	Glu	Leu	Ile	Lys	Ala	Cys	Ala	Thr	Ile	Ile	Trp
	690					695					700				
Thr	Gly	Ser	Ala	Leu	His	Ala	Ala	Val	Asn	Phe	Gly	Gln	Tyr	Pro	Tyr
705					710					715					720
Ser	Gly	Tyr	His	Pro	Asn	Lys	Pro	Ser	Ala	Ser	Arg	Arg	Pro	Met	Pro
				725					730					735	

[0009]

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6

<211> 684

<212> PRT

<213> 大麦突变体A689

<400> 6

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

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

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

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

[0010]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Asp Leu Ser Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Ala Asp Ile Leu

[0011]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 大麦LOX-2 gDNA的扩增用引物

<400> 7
acctcaagga cgcggcgtgg

20

<210> 8
<211> 19
<212> DNA

[0013]

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	大麦LOX-2 gDNA的扩增用引物	
<400>	8	
	gagcgaggag tacgcggag	19
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	大麦突变体A689 LOX-2 gDNA的扩增用引物	
<400>	9	
	acctcaagga cgcggcgtga	20
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	大麦突变体D112 LOX-1 gDNA的扩增用引物	
<400>	10	
	caaggtgcgg ttgctggtgt c	21
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	大麦LOX-1 gDNA的扩增用引物	
<400>	11	
	ctcgcgctc tccttccat	19

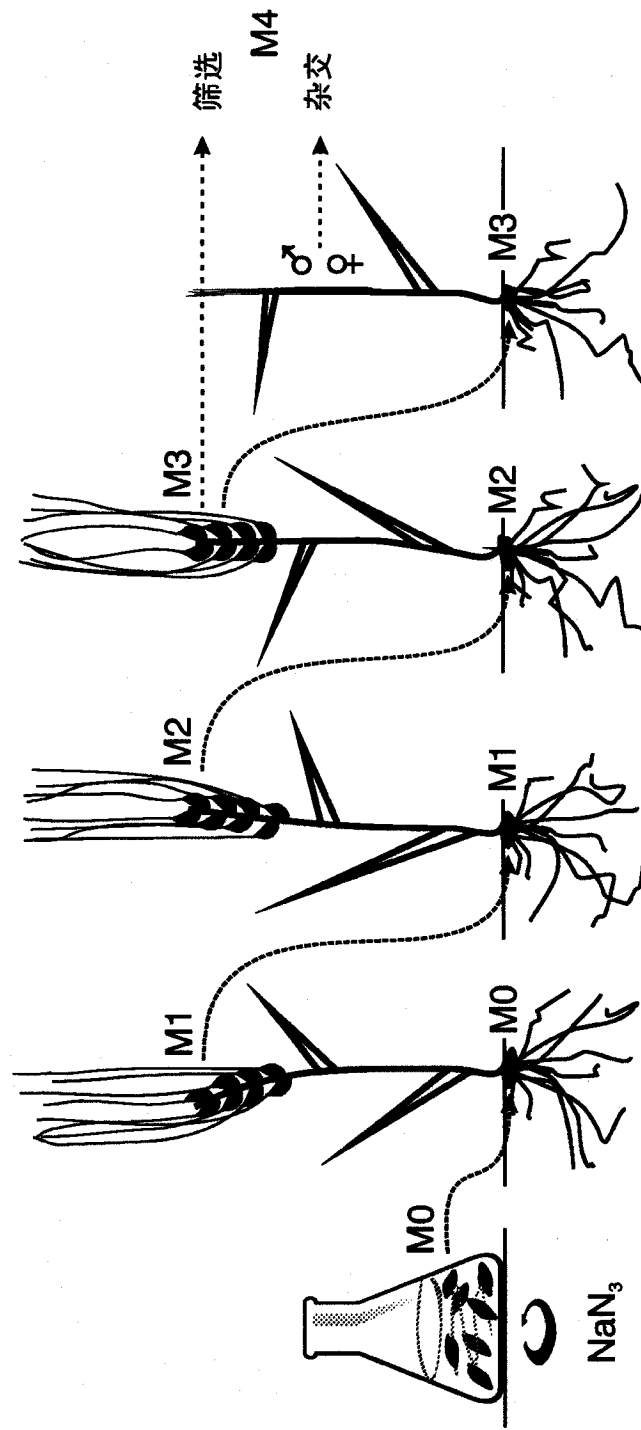


图 1

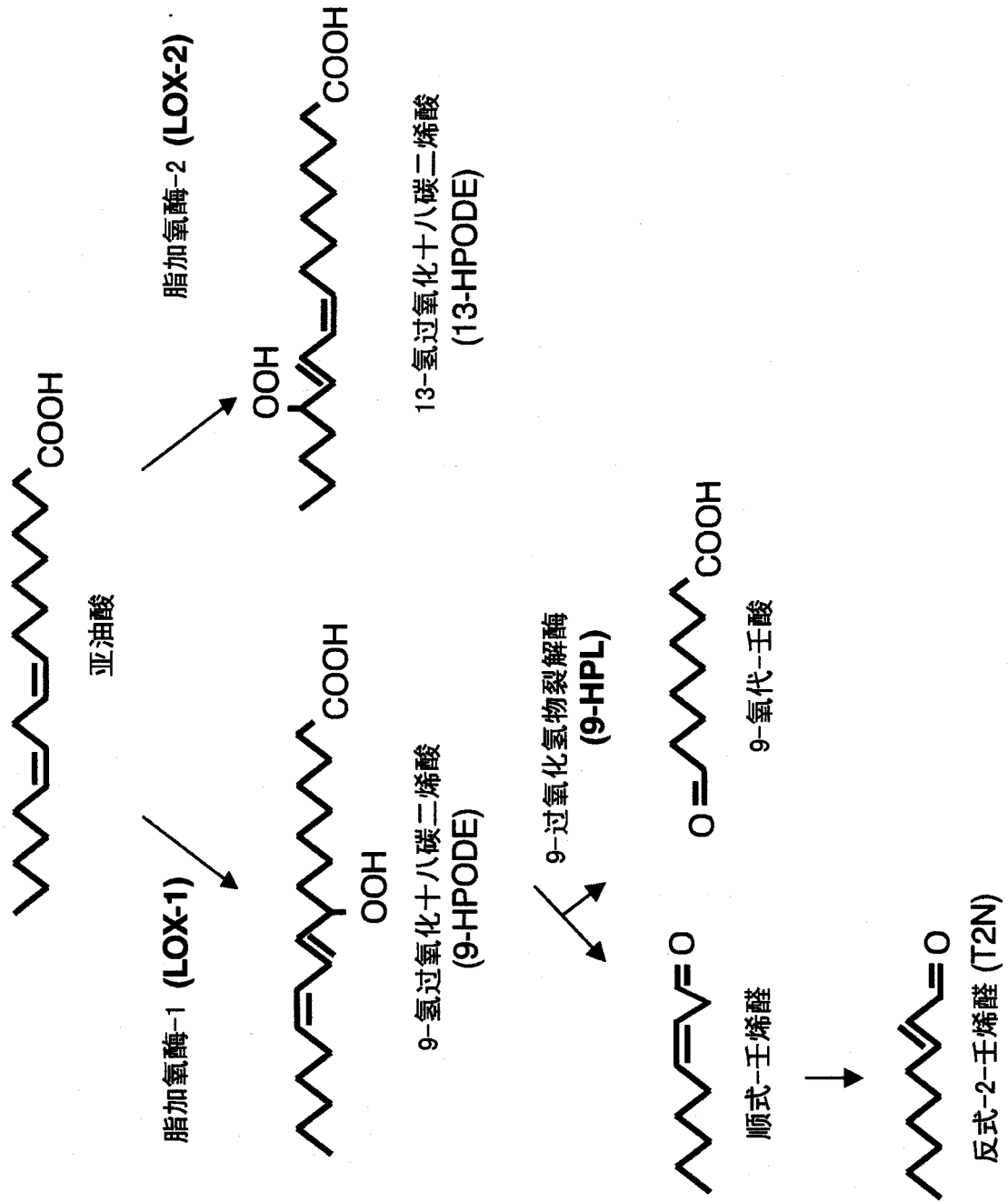


图 2

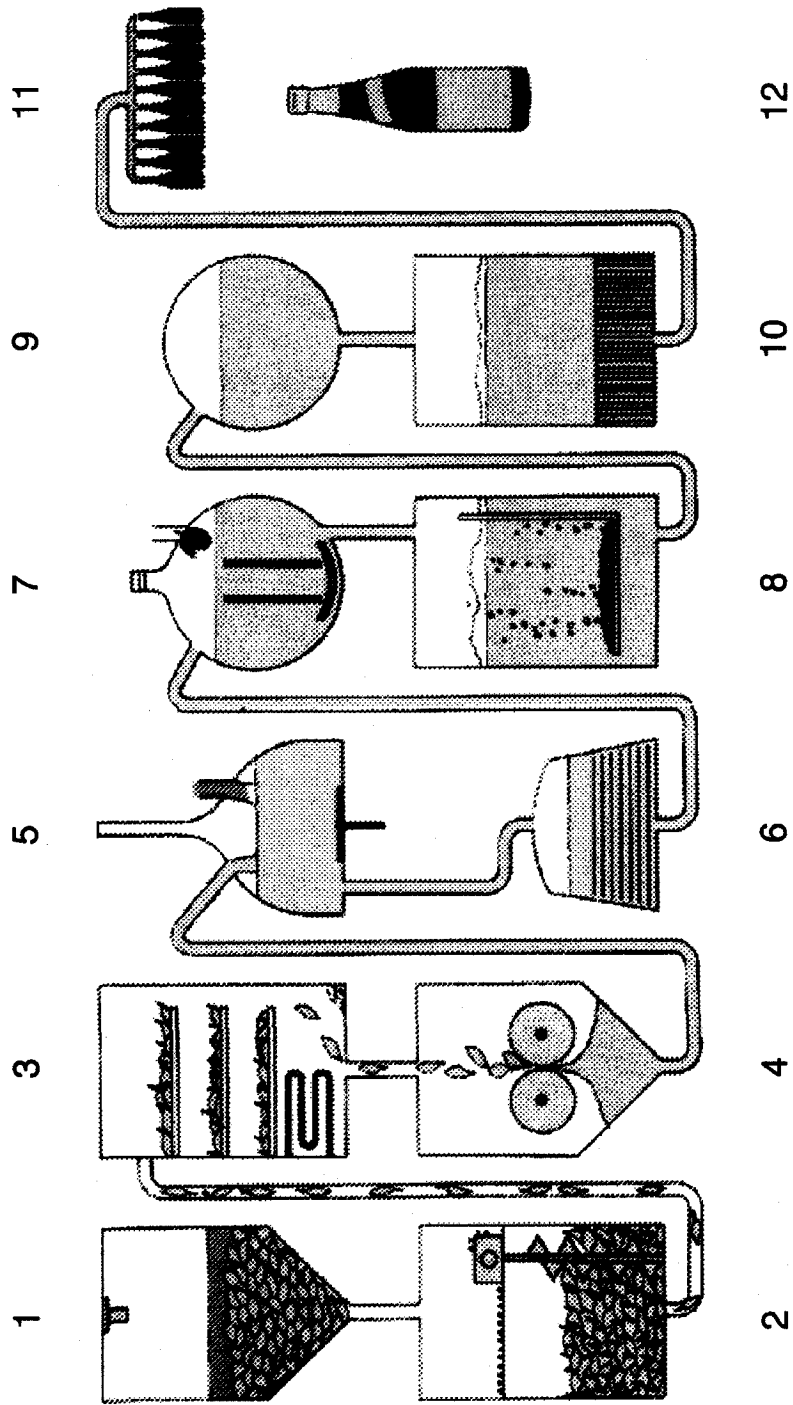


图 3

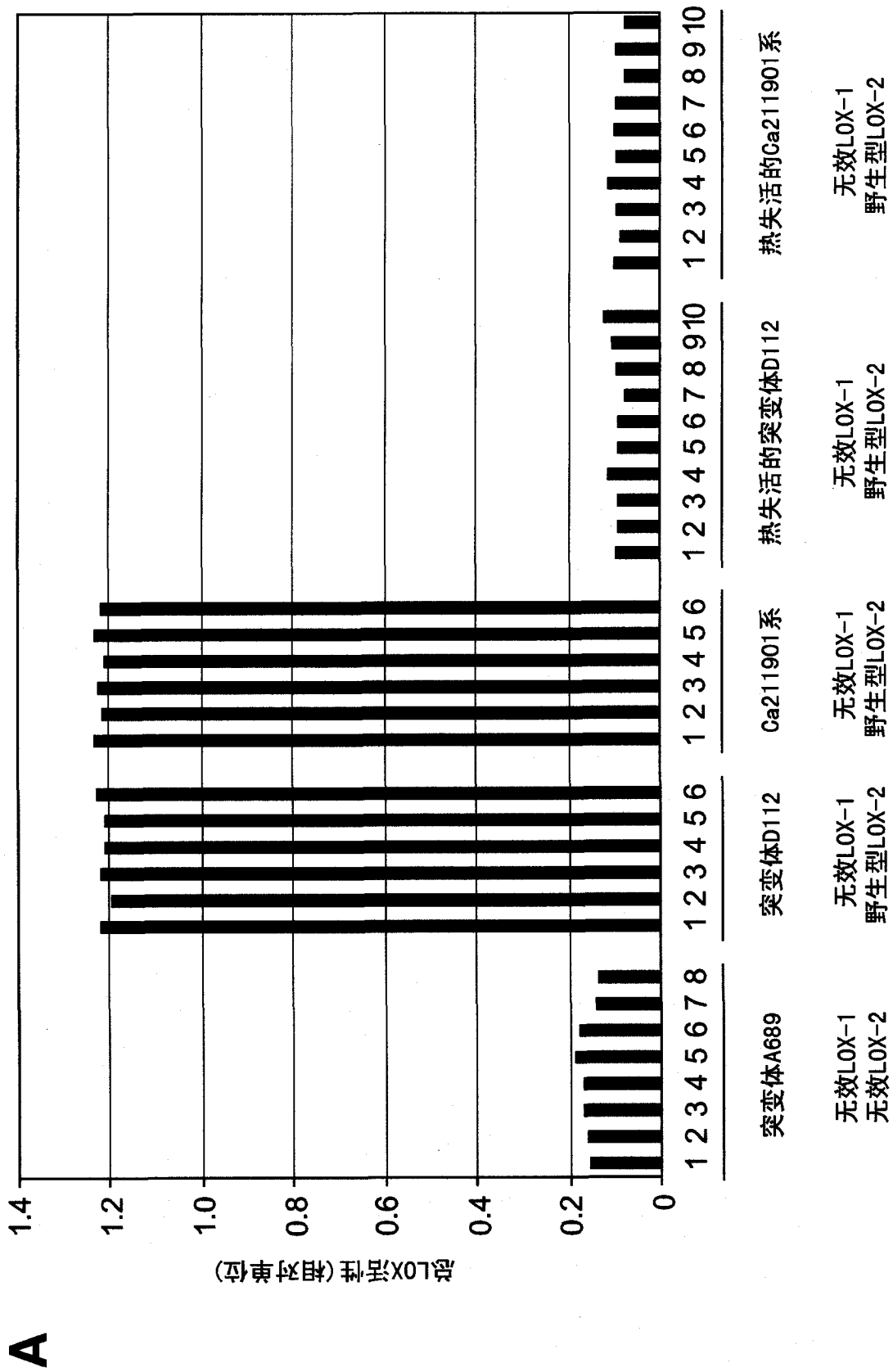


图 4

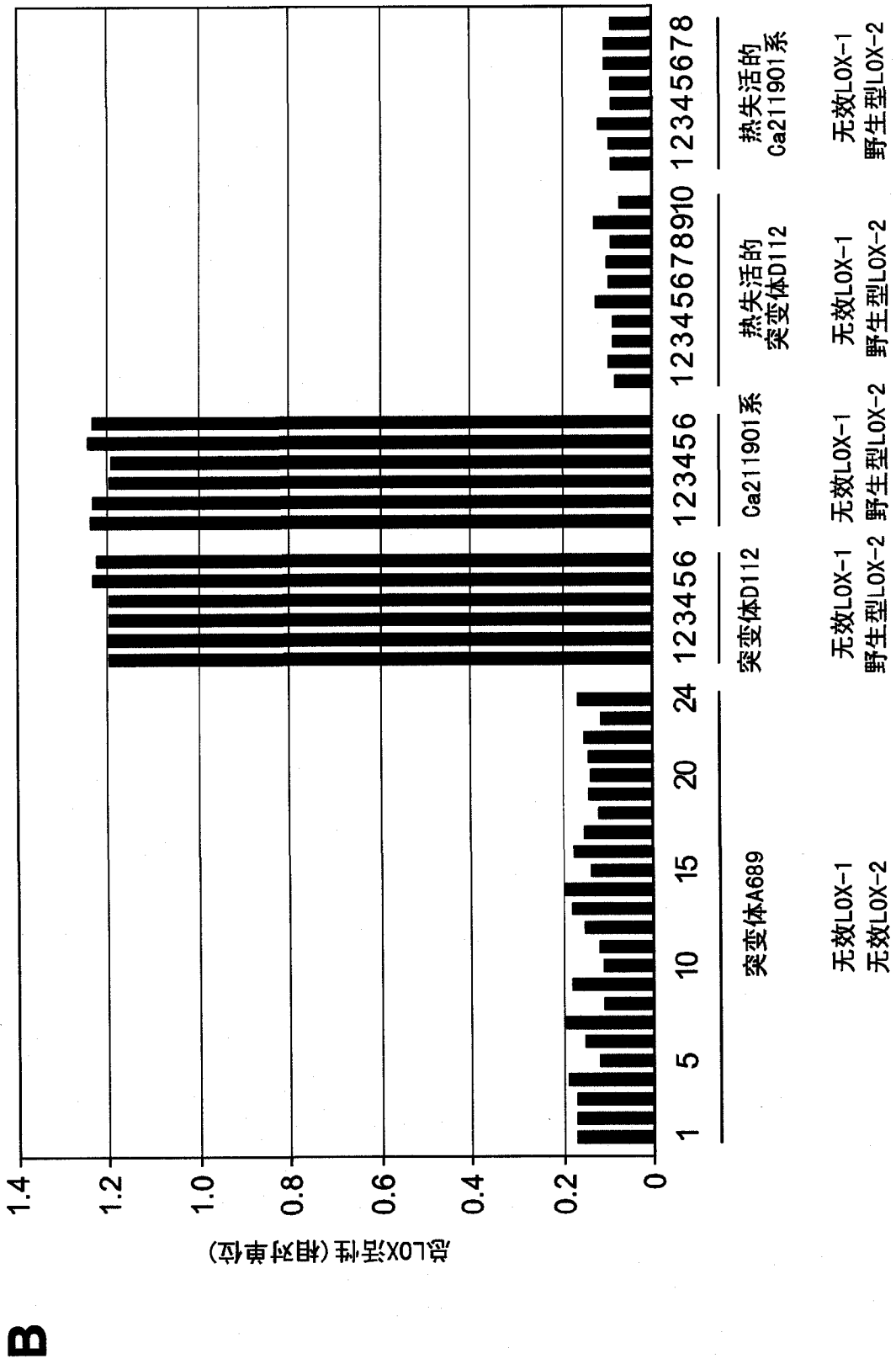


图 4

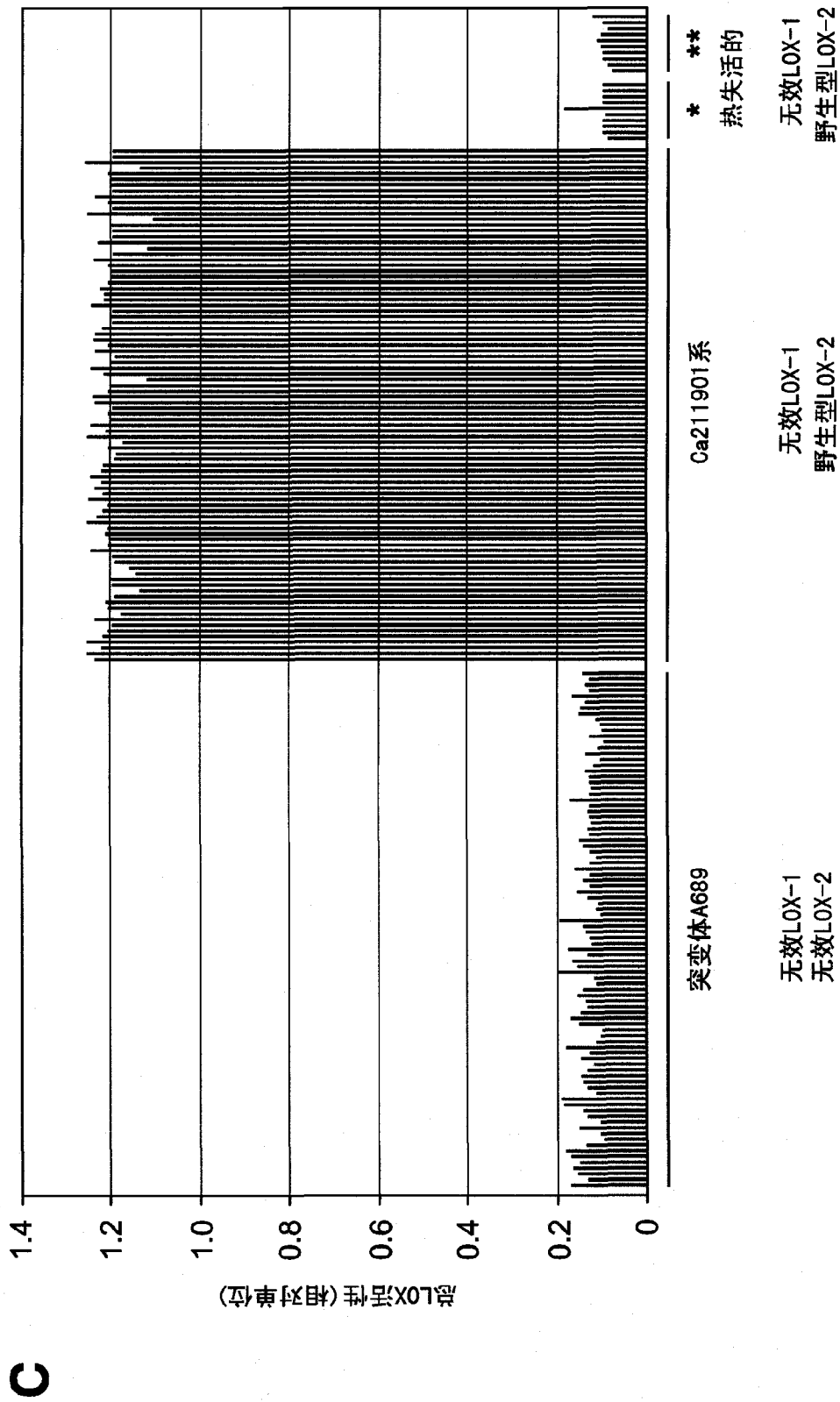


图 4

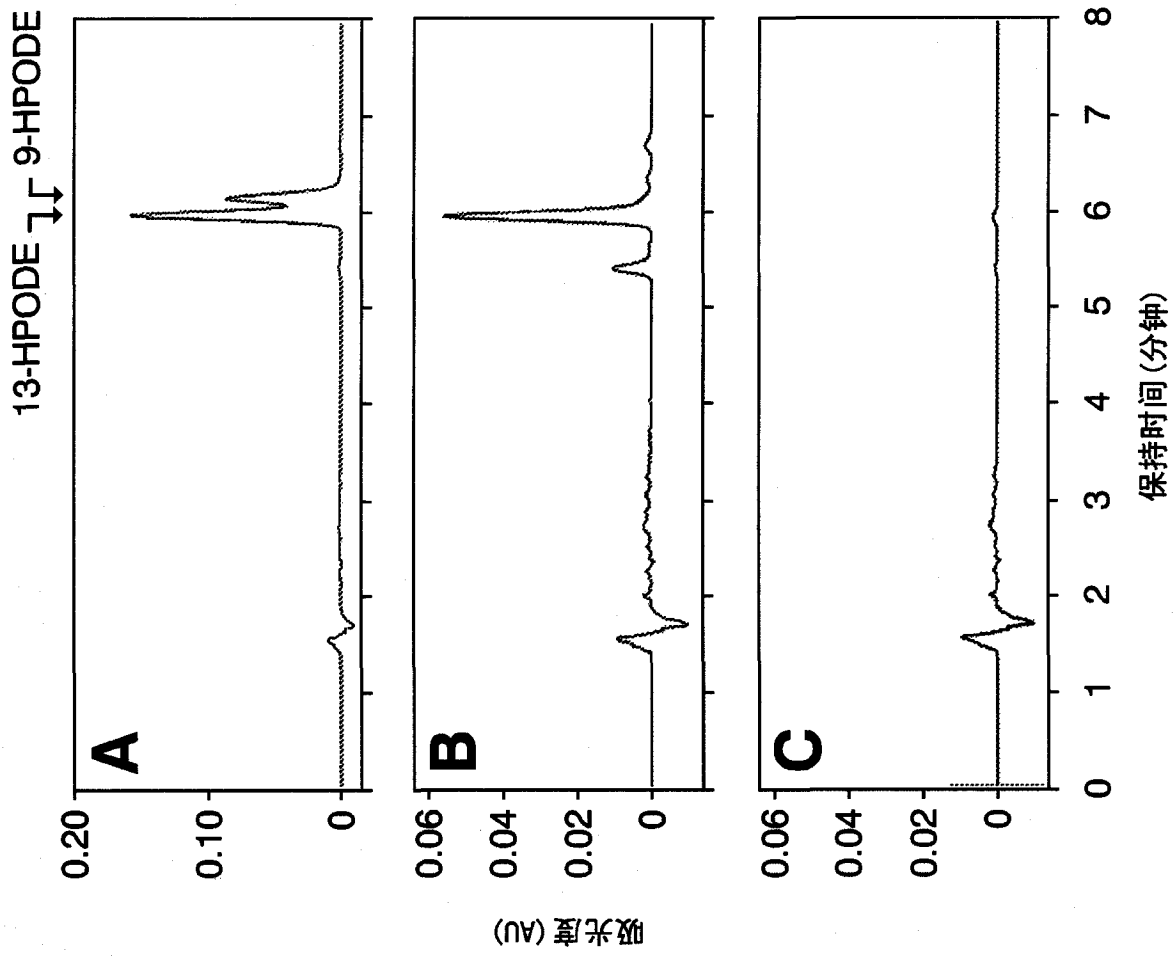


图 5

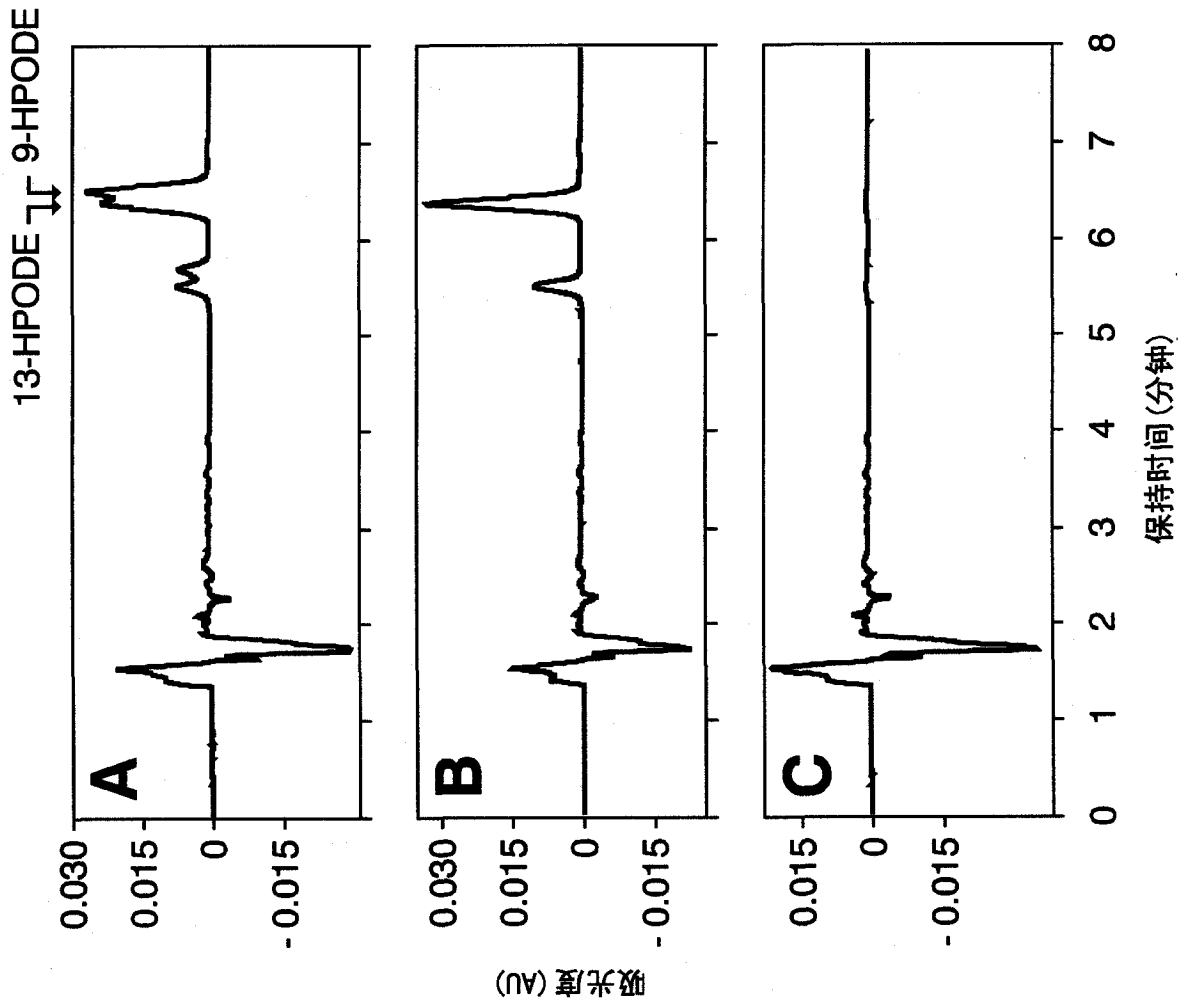


图 6

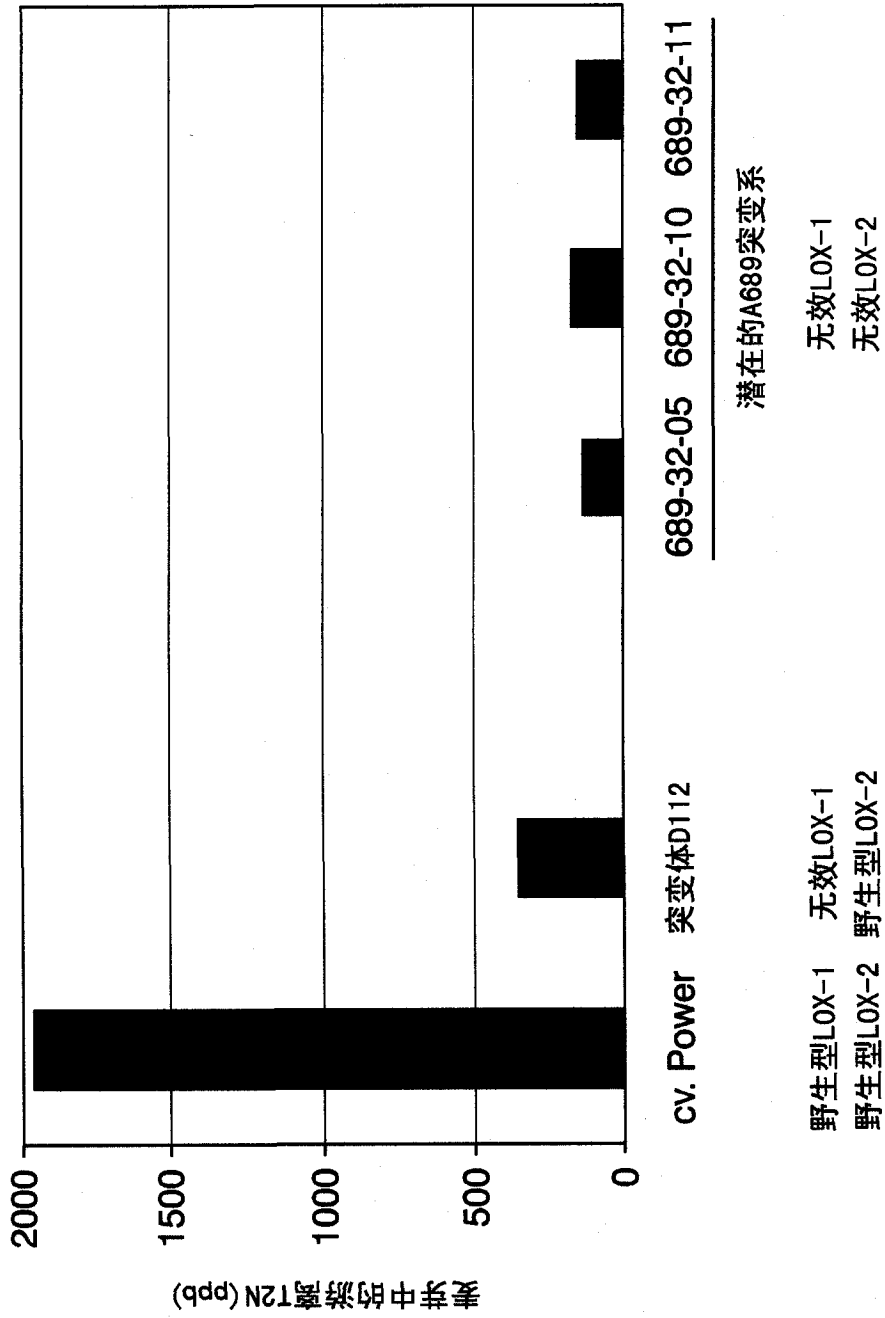


图 7

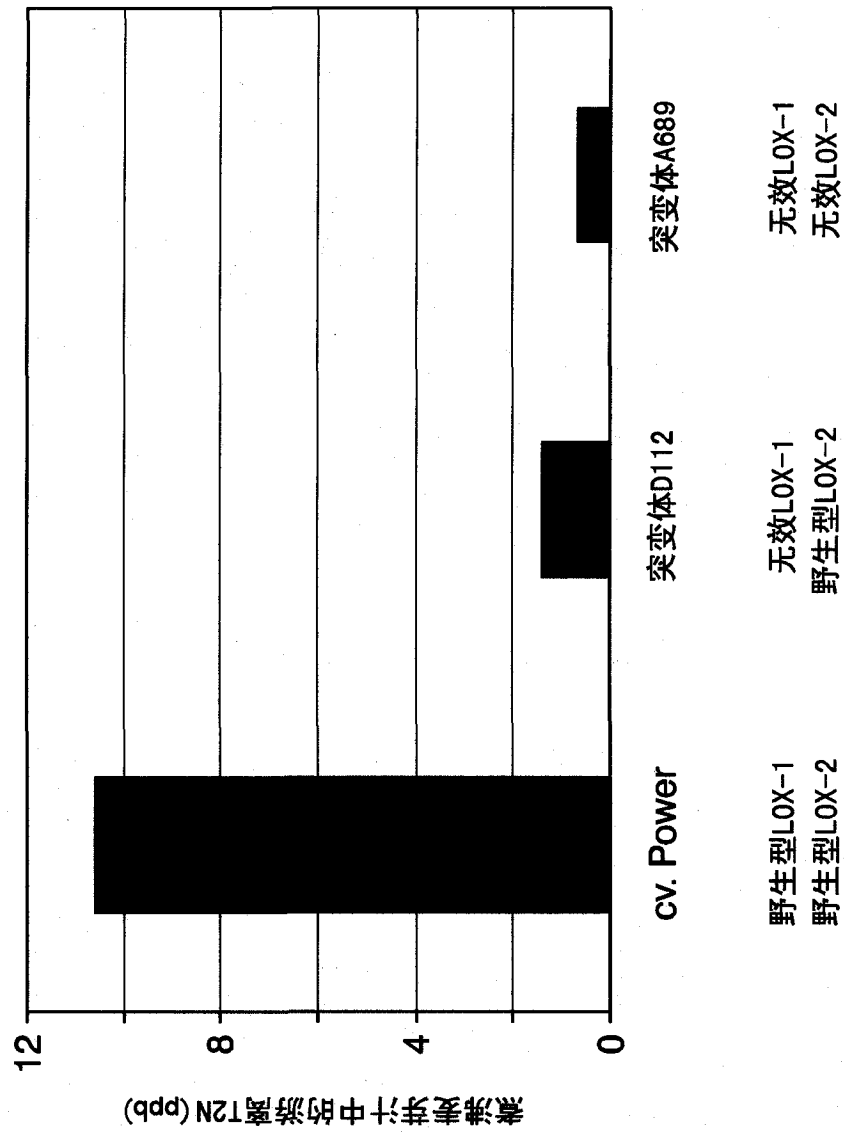


图 8

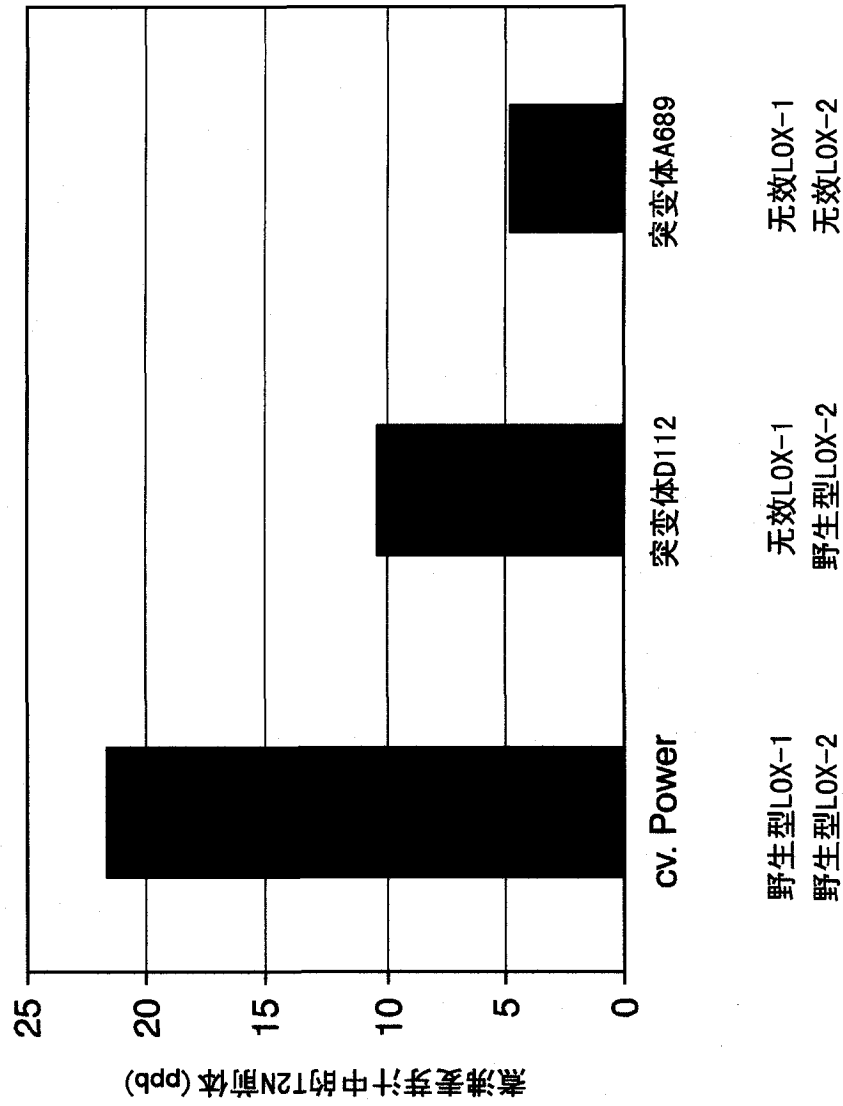


图 9

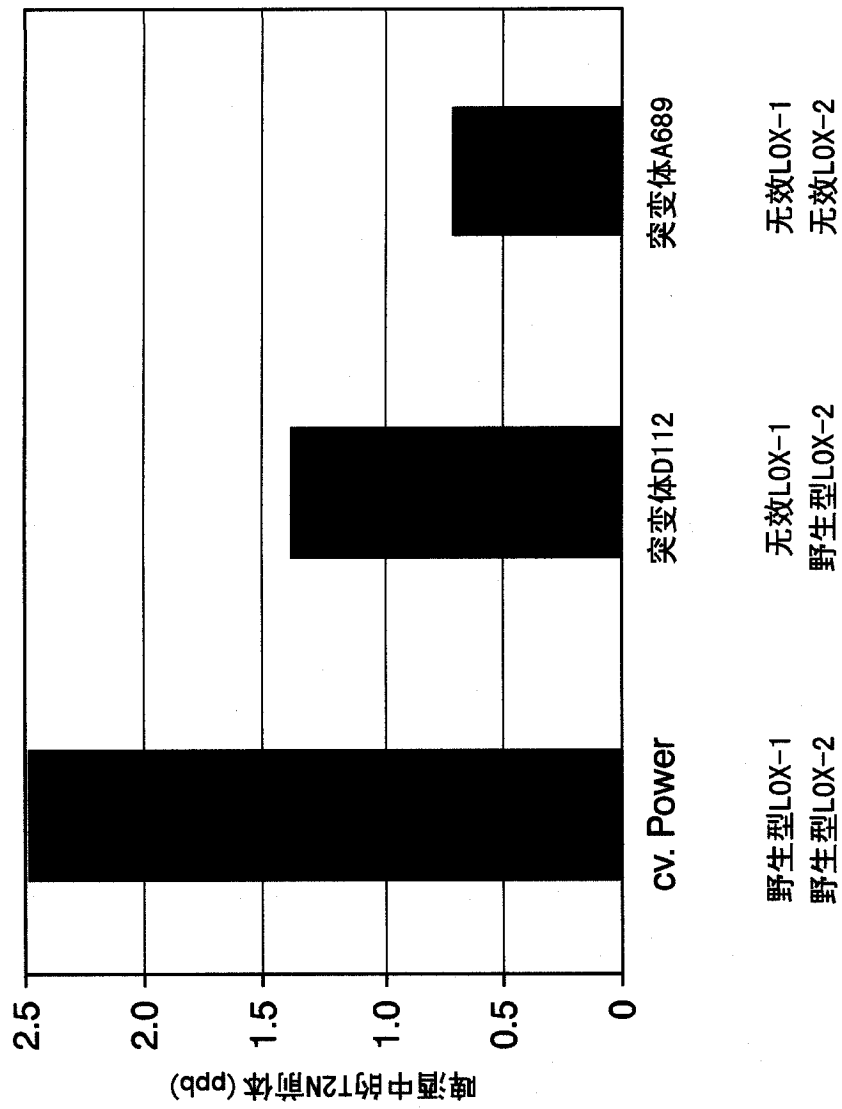


图 10

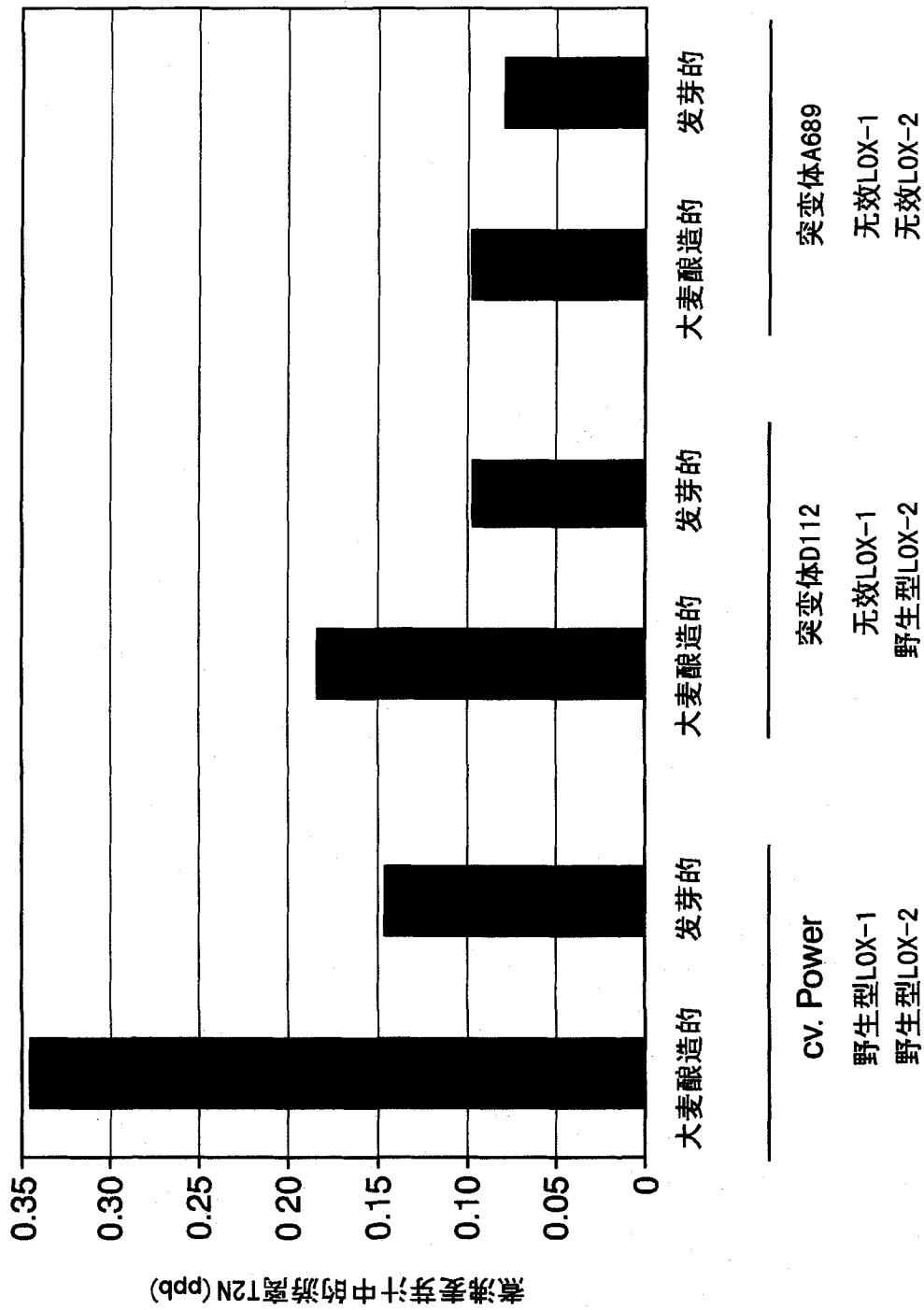


图 11

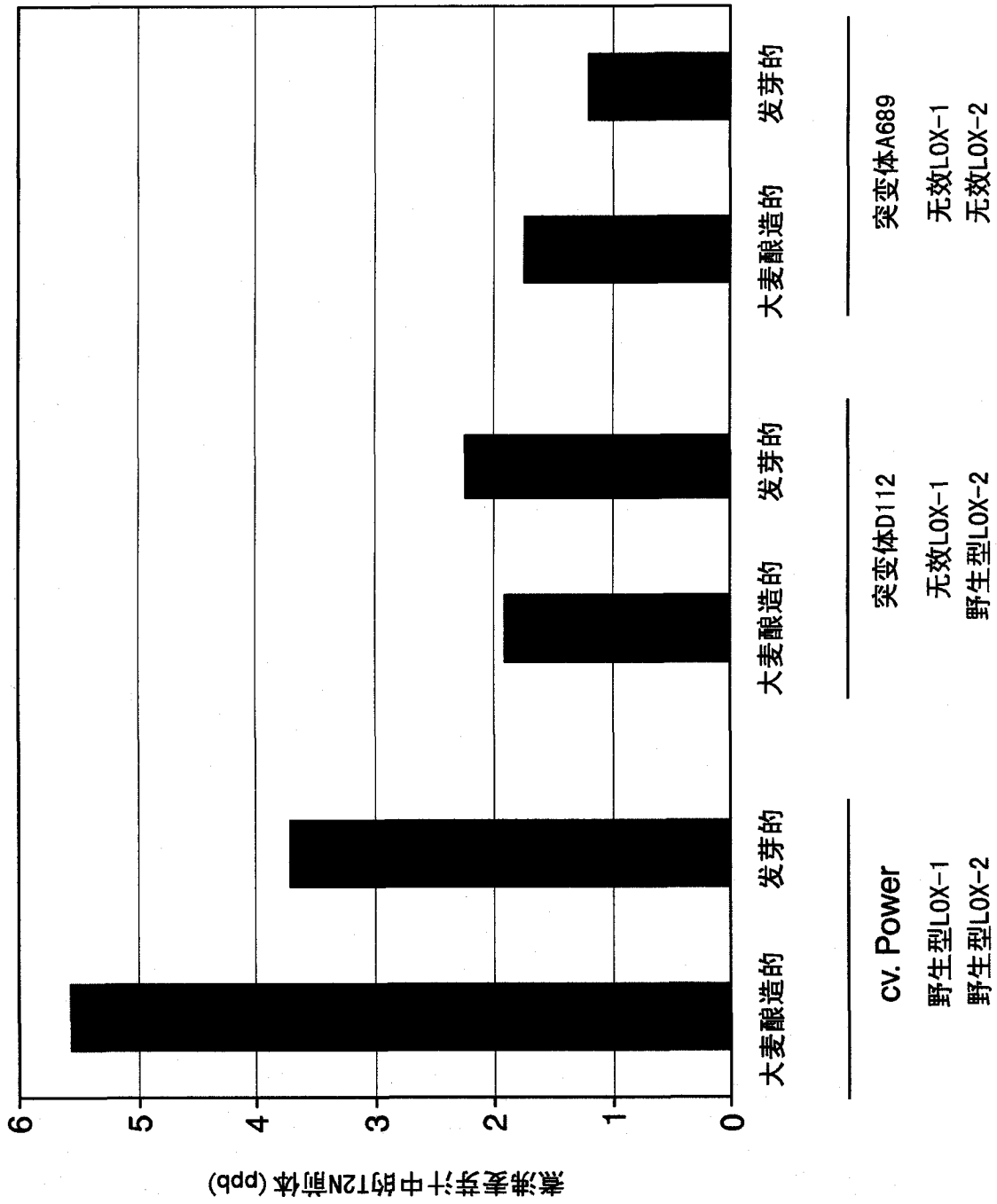


图 12

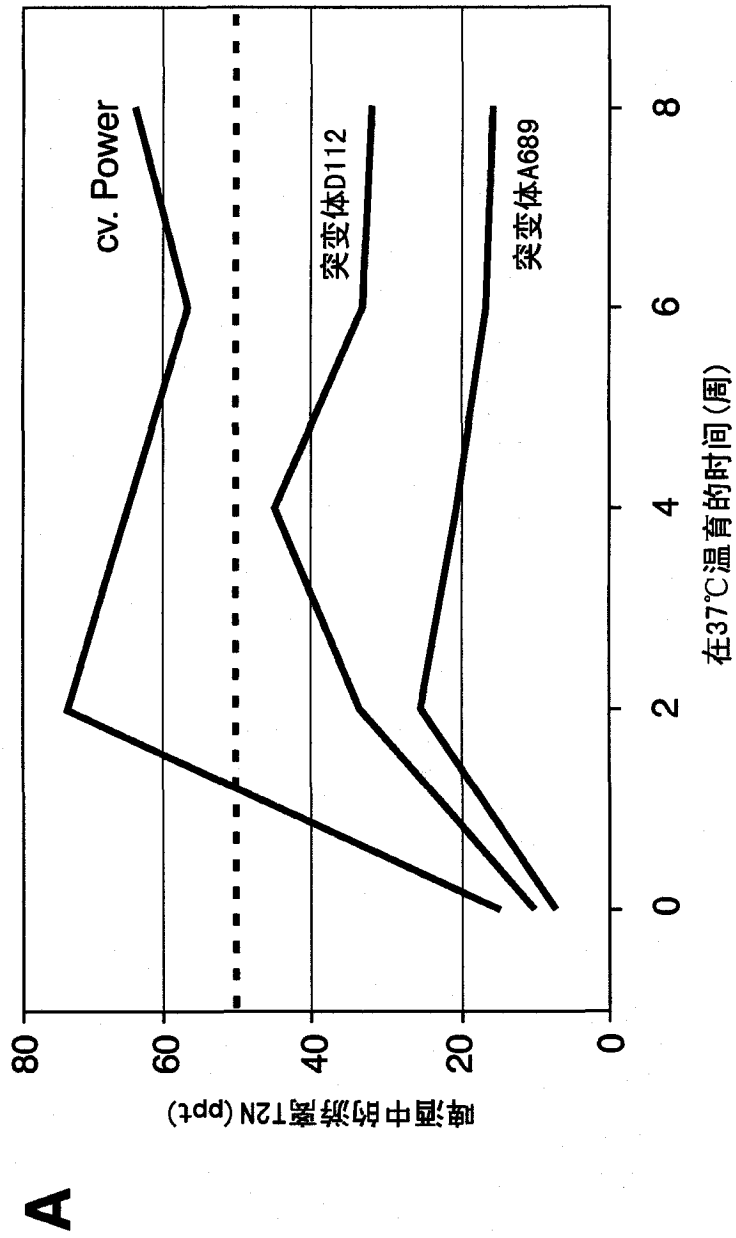


图 13

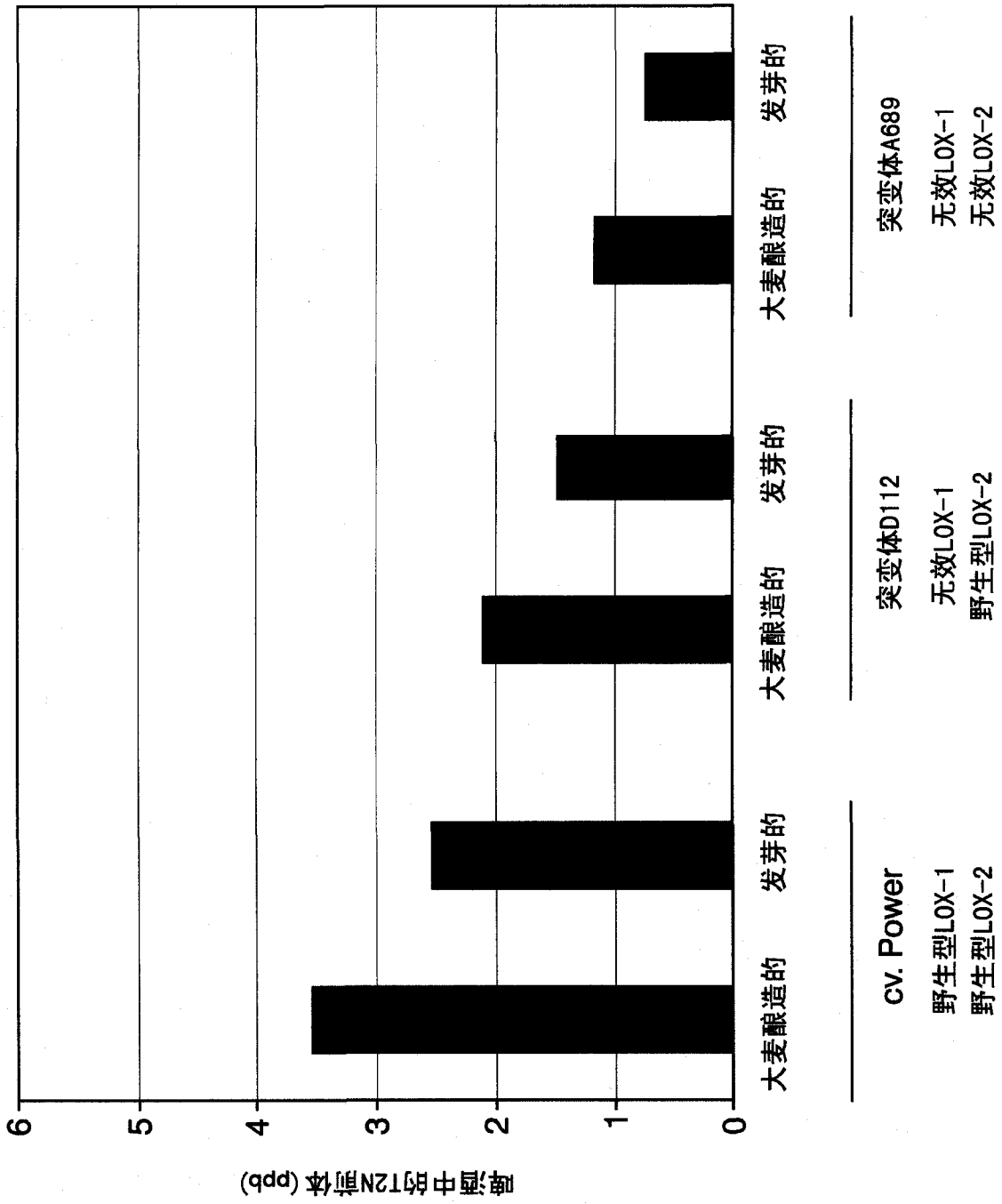


图 13

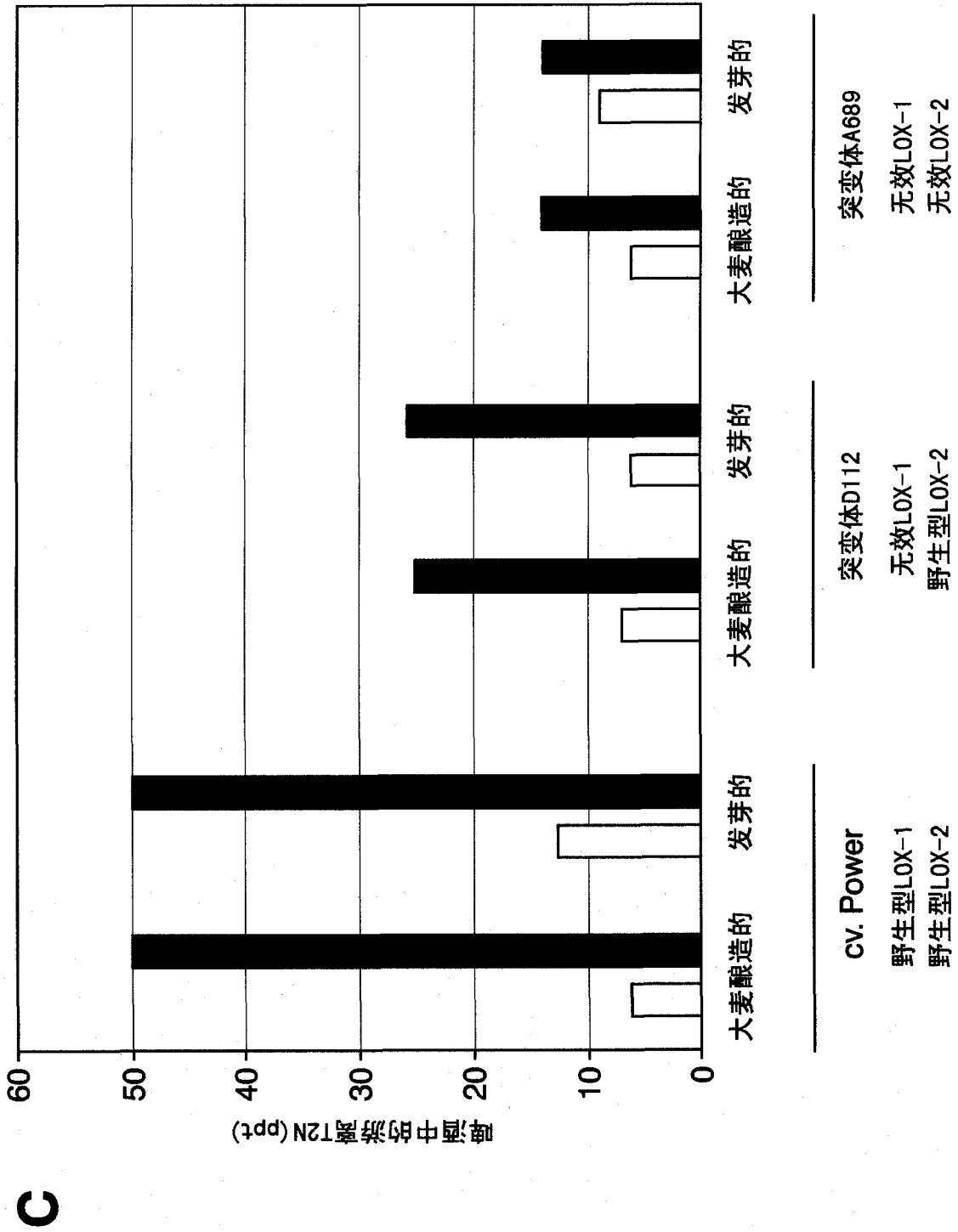


图 13

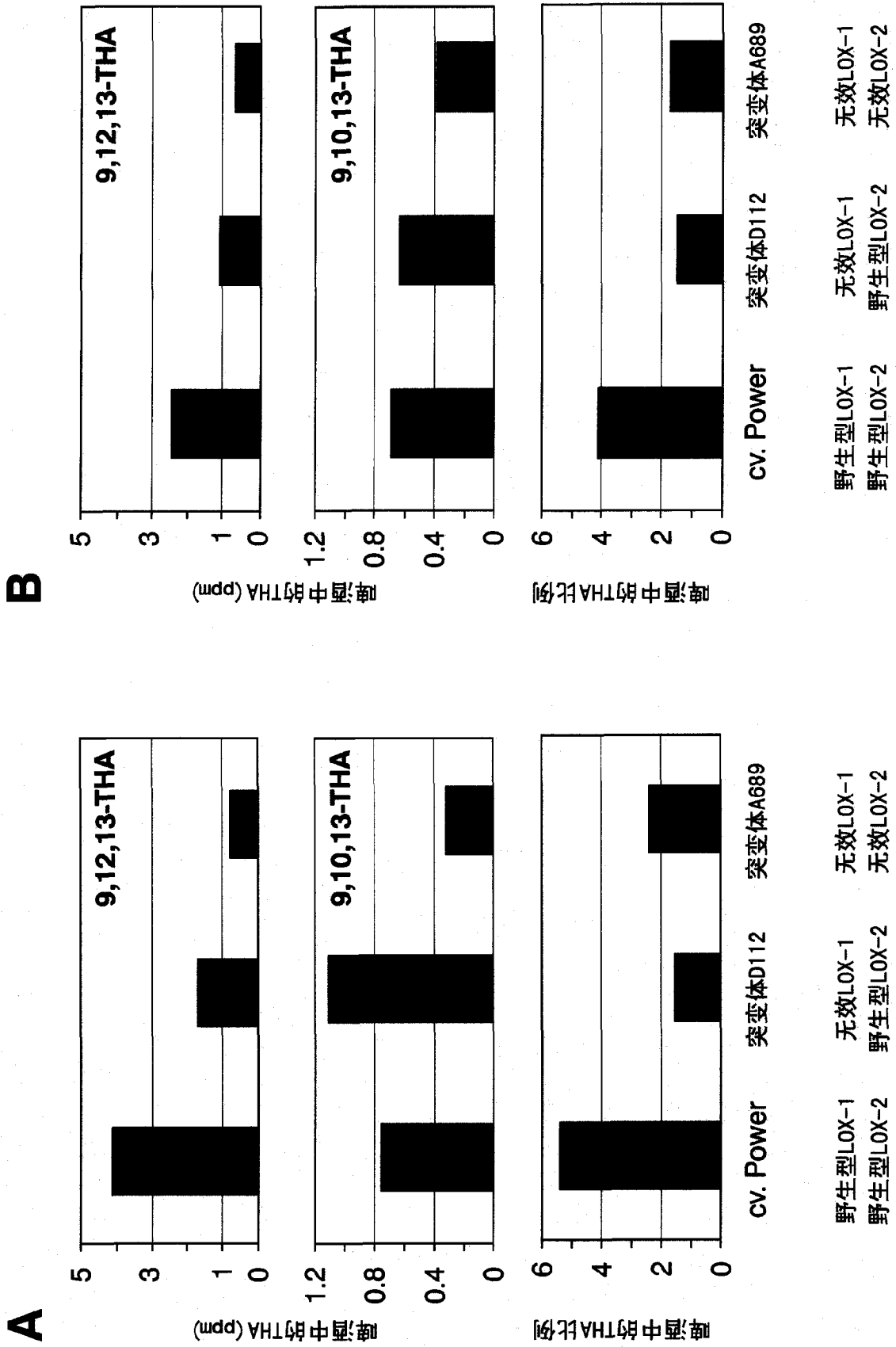


图 14

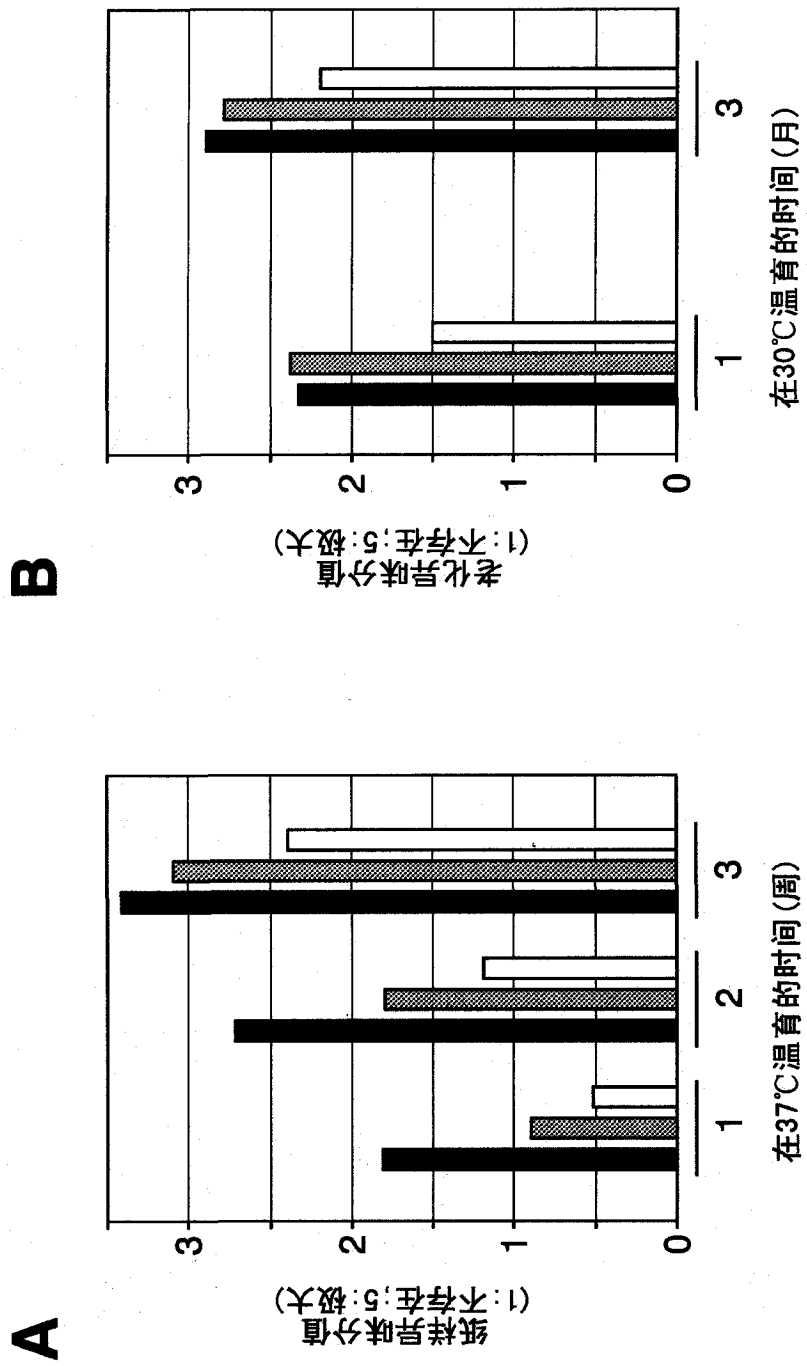


图 15

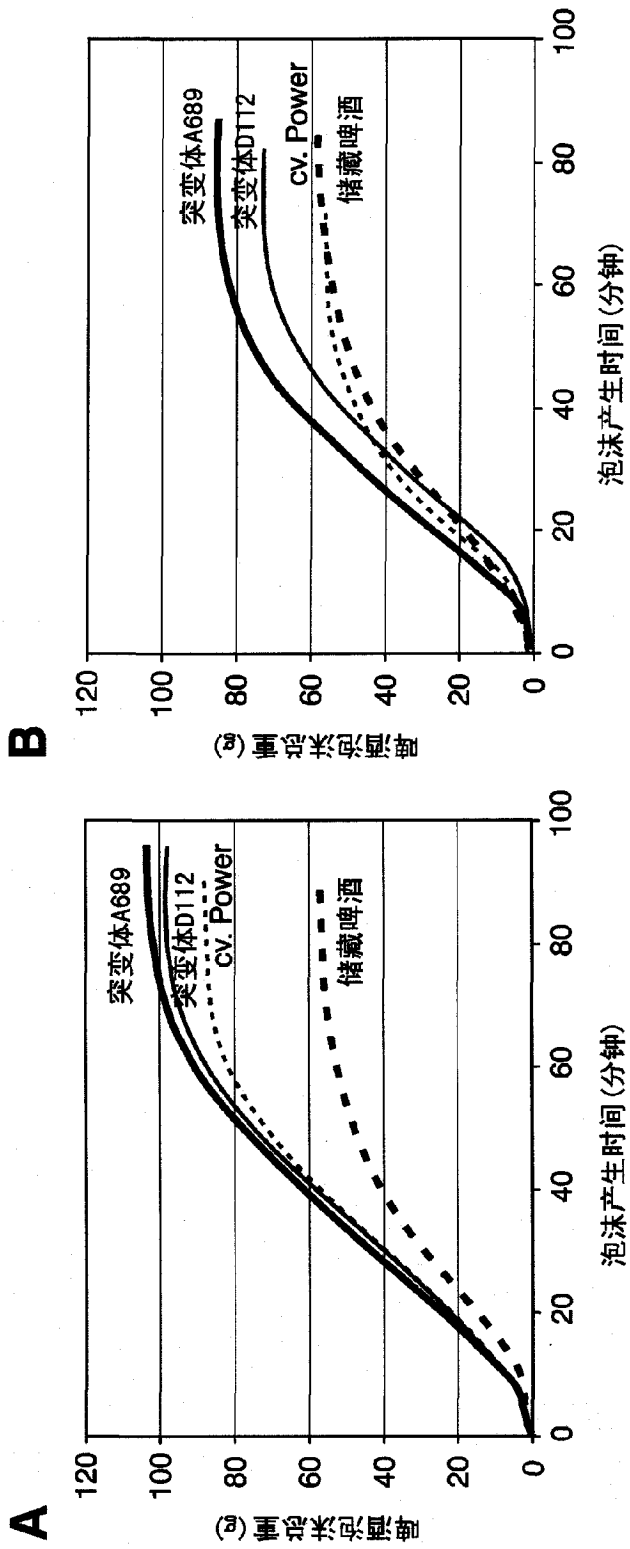


图 16

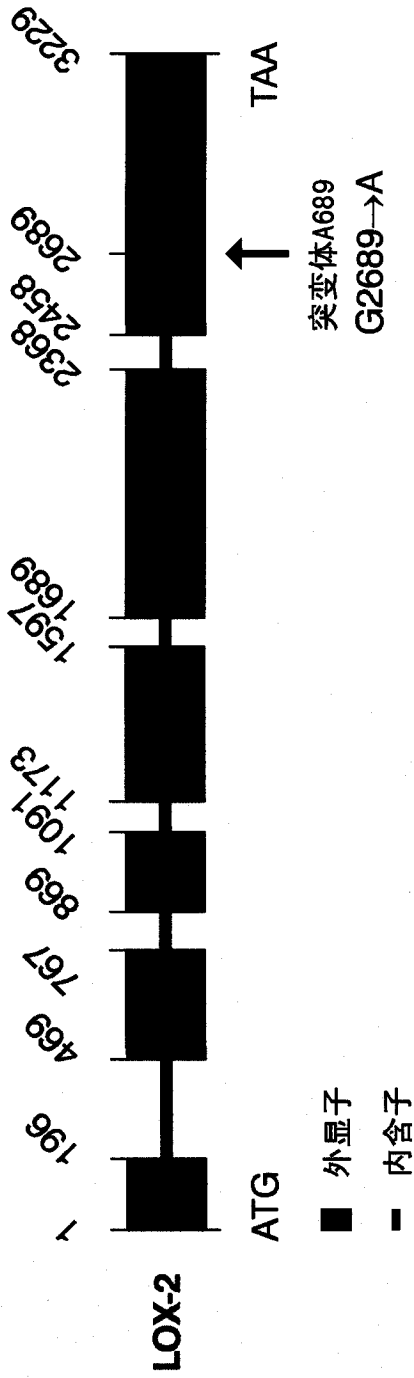


图 17

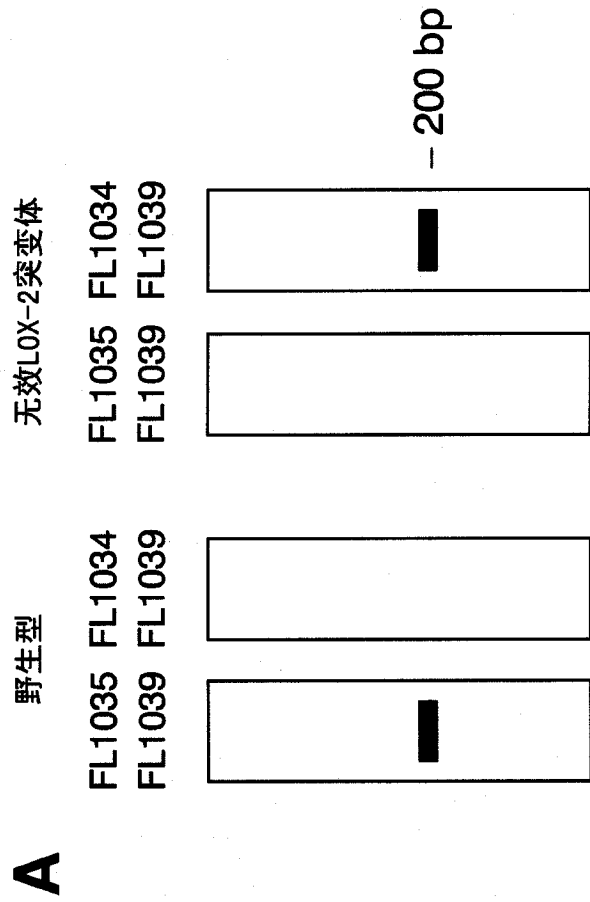


图 18

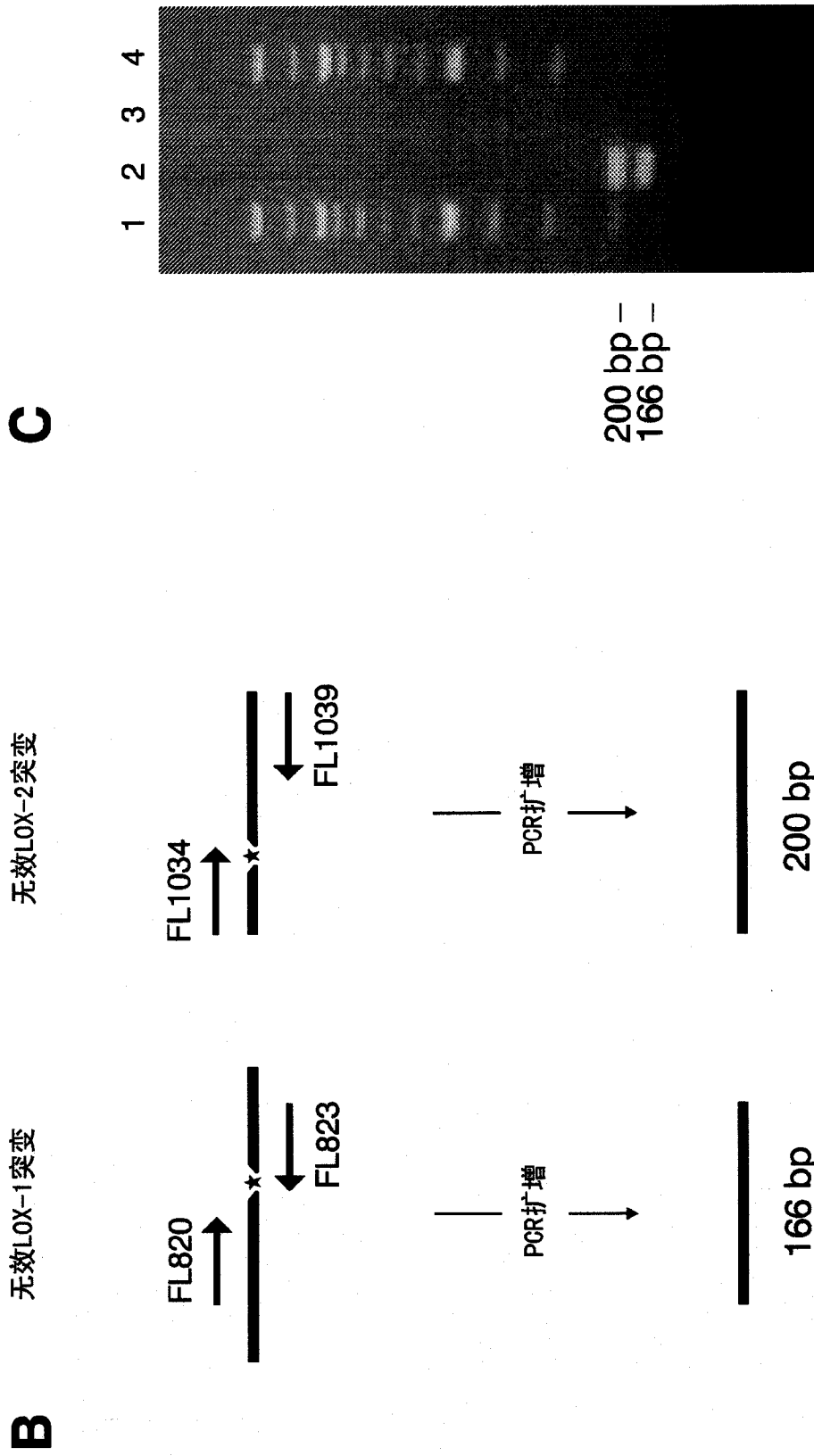


图 18

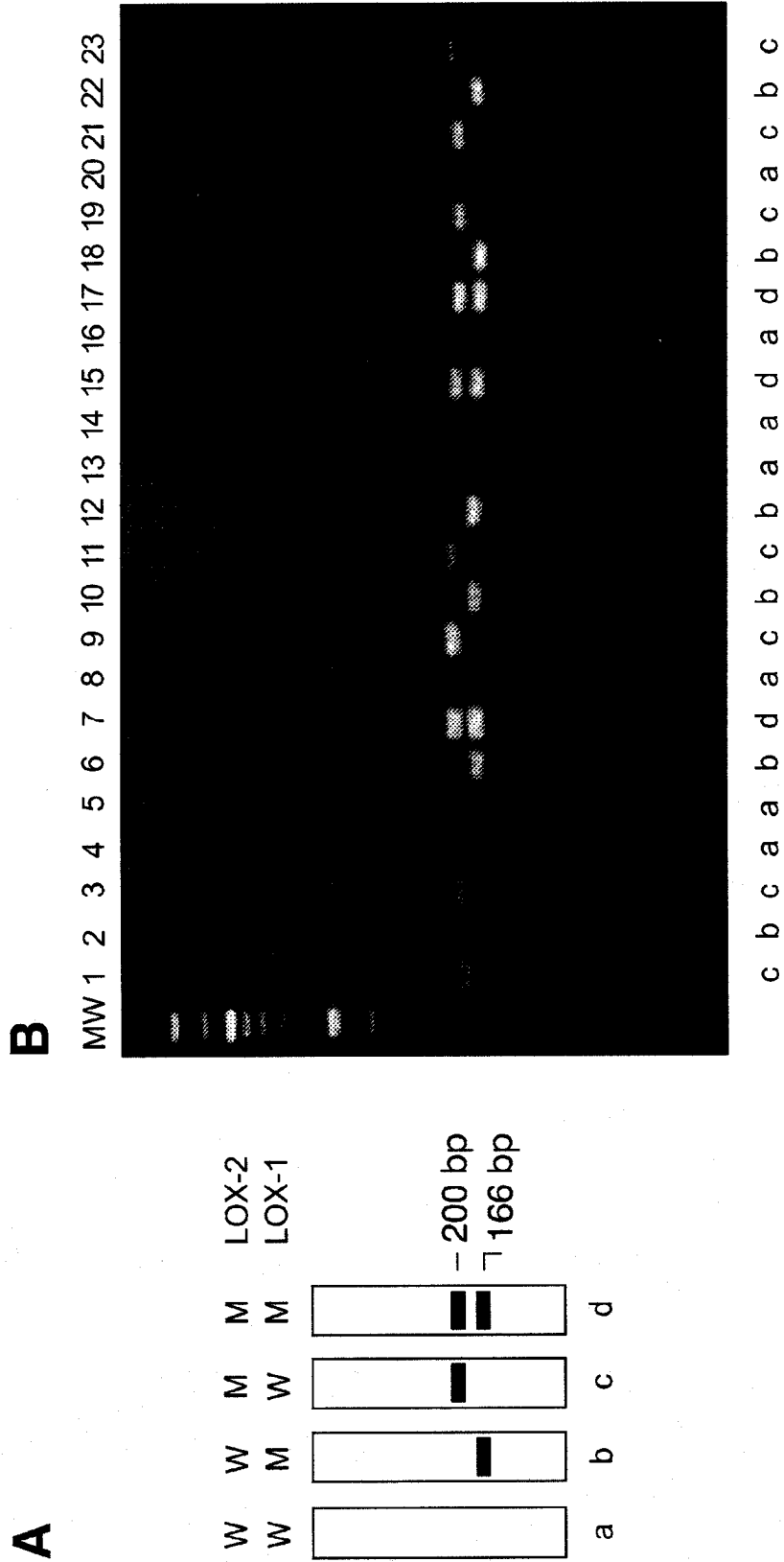


图 19