

Даний винахід відноситься до гена ліпоксигенази-1 ячменю, способу відбору ячменю, матеріалів для солодових алкогольних напоїв і способу отримання солодових алкогольних напоїв.

Ліпоксигеназа-1 ячменю (далі "LOX-1") є ферментом, присутнім у солоді, який окисляє лінолеву кислоту, що утворюється солодом, до 9-гідропероксіоктадекадієнової кислоти під час затирання солоду для отримання солодових алкогольних напоїв [Kobayashi, N. et al., J. Ferment. Bioeng., 76, 371-375, 1993]. Далі, 9-гідропероксіоктадекадієнова кислота перетворюється в тригідроксіоктадеєнову кислоту (THOD) пероксигеназа-подібною активністю [Kuroda, H., et al., J. Biosci. Bioeng., 93, 73-77, 2002]. Відомо, що THOD зменшує піностійкість пива, додає терпкий смак і погіршує однорідність смаку пива [Kobayashi, N., J. Am. Soc. Brew. Chem. 60: 37-41, 2002; i Kaneda, H. et al., J. Biosci. Bioeng., 92, 221-226, 2001], призводячи до більш низької якості солодових алкогольних напоїв. Крім того, 9-гідропероксіоктадекадієнова кислота перетворюється в транс-2-ноненаль, який є речовиною, відповідальною за неприємний присмак картону у витриманих солодових алкогольних напоях [Yasui, Journal of the Brewing Society of Japan, 96:94-99 (2001)].

Як стратегія інгібування утворення транс-2-ноненалу для поліпшення стабільності смаку солодових алкогольних напоїв буч запропонований спосіб отримання солодових алкогольних напоїв з використанням солоду з низькою активністю LOX-1 [Drost, J. Am. Soc. Brew. Chem. 48:124-131 (1990)].

Douma et al. індукували мутацію в ячмені мутагенною (хімічною) обробкою для створення індукованої мутованої лінії, що виявляє на 9% більш низьку активність LOX-1 у порівнянні з контролями, і намагалися отримувати солодові алкогольні напої з використанням такого ячменю [WO 02/053721].

Однак навіть при використанні такого ячменю зменшена концентрація транс-2-ноненалу у отриманих солодових алкогольних напоїв є недостатньою, і стабільність смаку не є досить поліпшеною. Крім того, абсолютно невизначені результати отримували відносно зменшення THOD або поліпшення піностійкості.

Даний винахід був виконаний у світлі вищезгаданих проблем рівня техніки, і його метою є забезпечення гена LOX-1 ячменю, який є застосовним для отримання солодових алкогольних напоїв, що виявляють поліпшену стабільність смаку та стійкість піни, без маніпуляцій генами, способу відбору LOX-1-недостатнього ячменю, матеріалів для солодових алкогольних напоїв, що отримуються з ячменю, отриманого за допомогою цього способу відбору, та способу отримання солодових алкогольних напоїв з використанням цих матеріалів для солодових алкогольних напоїв.

Внаслідок дуже ретельного дослідження, що проводиться для досягнення вищеприписаної мети, автори даного винаходу завершили цей винахід виявленням природного різновиду ячменю, який повністю позбавлений активності LOX-1, та ідентифікацією нового мутантного гена LOX-1 з цього різновиду ячменю.

Конкретно, мутантний ген LOX-1 даного винаходу характеризується тим, що гуанін у донорному сайті сплайсинга (5'-GT-3') 5-го інтрона відомого гена LOX-1 ячменю мутований в іншу основу. Переважно, цією іншою основою є аденін.

Спосіб відбору ячменю, позбавленого LOX-1 ячменю, відповідно до даного винаходу характеризується розпізнаванням ячменю, позбавленого LOX-1 ячменю, за допомогою визначення, є чи не є гуанін в донорному сайті сплайсинга 5-го інтрона гена LOX-1 мутованим в іншу основу. Переважно, цією іншою основою є аденін.

Спосіб відбору ячменю, позбавленого LOX-1 ячменю, характеризується також включенням стадії екстракції геномної ДНК, в якій геномну ДНК екстрагують з проби ячменю; стадії ампліфікації ДНК-фрагмента, в якій ДНК-фрагмент, що містить донорний сайт сплайсинга 5-го інтрона гена LOX-1, ампліфікують з екстрагованої геномної ДНК; і стадії детектування ДНК-фрагмента, в якій ДНК-фрагмент, що містить донорний сайт сплайсинга 5-го інтрона гена LOX-1, ампліфікований у стадії ампліфікації ДНК-фрагмента, розщеплюють рестрикційним ферментом (рестриктазою), детектують ДНК-фрагмент, що має вказану кількість основ, і ячміль, позбавлений LOX-1 ячменю, розпізнають за допомогою визначення, є чи не є гуанін у донорному сайті сплайсинга мутованим в іншу основу.

Рестрикційним ферментом, що використовується у стадії детектування цього ДНК-фрагмента, є переважно Afal і/або RsaI, які впізнають нуклеотидну послідовність 5'-GTAC-3'.

Згідно з даним винаходом, сорт ячменю, що має ознаку недостатності активності LOX-1, розпізнають на основі присутності або відсутності мутації гуаніну в донорному сайті сплайсинга 5-го інтрона гена LOX-1.

У результаті, можна легко розпізнати різновид ячменю, позбавлений активності LOX-1, за допомогою аналізу на генетичному рівні, без прямого вимірювання активності LOX-1. На активність ферменту впливають індивідуальні стадії росту, середовище та інші фактори, і, отже, її важко точно виміряти, але даний спосіб дозволяє розпізнати різновид ячменю з відмінною активністю LOX-1 способом, відмінним від вимірювання активності ферменту, і, отже, незалежно від факторів навколишнього середовища та інших факторів. Крім того, у той час як активність ферменту не може бути виміряна, поки насіння не дозріє, скринінг ДНК може ідентифікувати присутність або відсутність ознаки відсутності цієї активності на ранній стадії росту, так як його проводять перед цвітінням, та, отже, є ефективним для безперервного зворотного схрещування.

Матеріал для солодових алкогольних напоїв даного винаходу характеризується тим, що він є насінням, солодом, екстрактом солоду, продуктом розщеплення ячменю або обробленим ячменем, отриманими з ячменю, що має мутантний ген LOX-1 відповідно до даного винаходу.

Матеріал для солодових алкогольних напоїв даного винаходу характеризується також тим, що він є насінням, солодом, екстрактом солоду, продуктом розщеплення ячменю або обробленим ячменем, отриманими з ячменю, відібраного з використанням способу відбору позбавленого LOX-1 ячменю відповідно до даного винаходу.

Спосіб отримання солодових алкогольних напоїв даного винаходу характеризується використанням матеріалу для солодових алкогольних напоїв відповідно до даного винаходу.

Згідно з даним винаходом, можна отримувати солодові алкогольні напої з поліпшеною стабільністю смаку та стійкістю піни, оскільки LOX-1 не присутній у цьому матеріалі, і, отже, не відбувається легкого утворення 9-гідропероксіоктадекадієнової кислоти з лінолевої кислоти і, отже, не відбувається також легкого утворення THOD і транс-2-ноненалу в цьому способі отримання солодових алкогольних напоїв.

Крім того, даний винахід забезпечує нуклеїнову кислоту, що містить нуклеотидну послідовність від положення 1 до положення 1554, представлену в SEQ ID NO:10. Ця нуклеотидна послідовність

представляє кодуючу ділянку гена, що кодує мутантний білок LOX-1, позбавлений ліпоксигеназної активності білка LOX-1. За допомогою детектування присутності або відсутності цієї нуклеїнової кислоти в пробі ячменю можна дізнатися, має чи не має цей ячмінь ознаку недостатності активності LOX-1.

Далі, даний винахід забезпечує нуклеїнову кислоту, що містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:11. Ця нуклеотидна послідовність представляє геномну послідовність гена, що кодує мутантний білок LOX-1, позбавлений ліпоксигеназної активності білка LOX-1. За допомогою детектування присутності або відсутності цієї нуклеїнової кислоти в пробі ячменю можна дізнатися, має чи не має цей ячмінь ознаку недостатності активності LOX-1.

Далі, даний винахід забезпечує нуклеїнову кислоту, що містить нуклеотидну послідовність з 10-60 суміжних основ, в тому числі основу 3178, у нуклеотидній послідовності, представленій в SEQ ID NO:11. Основа 3178 є поліморфізмом єдиного нуклеотиду, який є G у випадку аутентичного LOX-1 і A у випадку мутантного LOX-1. За допомогою детектування присутності або відсутності нуклеїнової кислоти, що включає в себе цей поліморфний сайт, у пробі ячменю, можна дізнатися, має чи не має цей ячмінь ознаку недостатності активності LOX-1.

Крім того, даний винахід забезпечує спосіб детектування присутності активності LOX-1 в ячмені, що включає стадію виділення геномної ДНК з проби ячменю та стадію детектування основи 3178 нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO:11, причому присутність цієї основи є показником присутності активності LOX-1 в ячмені. Згідно з цим способом, можна дізнатися, має чи не має випробуваний ячмінь ознаку недостатності активності LOX-1.

Насіння, солод, екстракт солоду, продукт розщеплення ячменю або оброблений ячмінь, отримані з ячменю, позбавленого активності LOX-1, виявленого за допомогою цього способу, можуть бути використані як сировинний матеріал для отримання солодових алкогольних напоїв для отримання солодових алкогольних напоїв з поліпшеною стабільністю смаку та стійкістю піни.

Фіг.1 є діаграмою, що показує результати активності LOX-1 у тесті пошуку 1.

Фіг.2 є діаграмою, що показує результати інгібуючої LOX-1 активності у тесті верифікації 1.

Фіг.3 є парю зображень електрофорезу, що показують результати Вестерн-аналізу білка LOX-1 насіння ячменю в тесті верифікації 2. Зображення А показує результати Вестерн-аналізу після електрофорезу в ПААГ, а В показує результати Вестерн-аналізу після ізоелектрофокусування (IEF).

Фіг.4 є зображенням електрофорезу, що показує результати аналізу ОТ-ПЛР РНК насіння ячменю в тесті верифікації 3.

Фіг.5 є діаграмою, що показує структуру донорного сайту сплайсинга 5-го інтрона гена LOX-1 у тесті верифікації 4.

Фіг.6 є парю зображень електрофорезу, що показують результати аналізу сплайсинга мутантного гена LOX-1 у тесті верифікації 5. Зображення А є зображенням електрофорезу ампліфікованих фрагментів, що містять 3-й - 5-й інтрон, а В є зображенням електрофорезу тих самих фрагментів, що і в А, після розщеплення Stul.

Фіг.7 є зображенням електрофорезу, що показує індуковані експресією білки в E. coli в тесті верифікації 7 і 8.

Фіг.8 є діаграмою, що показує активність індукованою експресією LOX-1 в E. coli в тесті верифікації 1.

Фіг.9 є зображенням електрофорезу, що показує поліморфізм ДНК у 2-ому дочірньому поколінні гібриду для Kendall x SBOU2 у тесті верифікації 9.

Фіг.10 є таблицею, що підсумовує поліморфізм ДНК у гібридному 2-ому дочірньому поколінні й активність LOX-1 в 3-ому дочірньому поколінні гібриду для Kendall x SBOU2 у тесті верифікації 9.

Фіг.11 є зображенням електрофорезу, що показує результати аналізу основного сорту/лінії ячменю з використанням Afal-способу в прикладі 1.

Фіг.12 є зображенням електрофорезу, що показує результати аналізу LOX-1-недостатнього ячменю з використанням Afal-способу в прикладі 2.

Фіг.13 є парю діаграм, що показують результати активності LOX-1 LOX-1-недостатнього насіння ячменю в прикладі 2. Діаграма А показує результати за часу реакції ферменту 5 хвилин, а діаграма В показує результати за часу реакції 90 хвилин.

Фіг.14 є таблицею, що показує результати аналізу солоду насіння з популяції LOX+F4 і LOX-F4 в прикладі 5.

Фіг.15 є точковою діаграмою, що показує концентрації транс-2-ноненалю і потенціали нененалю для сусла в прикладі 5.

Даний винахід буде тепер пояснений більш детально.

Спочатку будуть дані пояснення з приводу мутантного гена LOX-1.

Мутантний ген LOX-1 даного винаходу є новим геном, виявленим авторами даного винаходу, і він характеризується тим, що 60-а основа G відомого гена LOX-1 ячменю (SEQ ID NO:1) замінена на A (SEQ ID NO:2). Оскільки основи 60-61 SEQ ID NO:1 складають донорний сайт сплайсинга (5'-GT-3'), ця заміна основи дає аберацію у сплайсинга LOX-1, так що активний LOX-1 не може бути експресований.

Нуклеотидна послідовність ділянки 5-го інтрона відомого гена LOX-1 наведена у вигляді SEQ ID NO:1 у списку послідовностей, а нуклеотидна послідовність частини мутантного гена LOX-1 даного винаходу, що відповідає ділянці 5-го інтрона гена LOX-1, наведена в списку послідовностей у вигляді SEQ ID NO:2.

Тепер буде пояснений спосіб відбору LOX-1-недостатнього ячменю відповідно до даного винаходу.

Спосіб відбору LOX-1-недостатнього ячменю відповідно до даного винаходу характеризується розпізнаванням ячменю, позбавленого LOX-1 ячменю, на основі того, є чи не є гуанін у донорному сайті сплайсинга 5-го інтрона гена LOX-1 мутантом в іншу основу.

Способом відбору LOX-1-недостатнього ячменю, що використовує вищезазначену мутацію основи, може бути, наприклад, спосіб з використанням праймера, що містить вищезазначений сайт мутації на 3'-кінці послідовності праймера або всередині послідовності праймера, для ампліфікації ДНК, детектування мутації основи на основі присутності ампліфікації або ефективності ампліфікації і відбору LOX-1-недостатнього ячменю, або спосіб ампліфікації ДНК-фрагмента, що містить вищезазначений сайт мутації, і відбору LOX-1-недостатнього ячменю.

Немає конкретних обмежень відносно способу детектування мутації нуклеотидної послідовності, доки даний спосіб дозволяє детектувати ДНК-фрагменти, але відповідні способи, які повинні бути використані, включають у себе електрофорез в агарозному гелі та електрофорез в поліакриламідному гелі. Коли мутація ДНК, що підлягає детектуванню, заснована на присутності ампліфікації або ефективності ампліфікації, замість електрофорезу може бути використана кількісна ПЛР, наприклад, спосіб TAQMAN.

Спосіб відбору LOX-1-недостатнього ячменю даного винаходу характеризується включенням, переважно, стадії екстракції геномної ДНК, в якій геномну ДНК екстрагують з проби ячменю; стадії ампліфікації ДНК-фрагмента, в якій ДНК-фрагмент, що містить донорний сайт сплайсинга 5-го інтрона гена LOX-1, ампліфікують з екстрагованої геномної ДНК; і стадії детектування ДНК-фрагмента, в якій ДНК-фрагмент, що містить донорний сайт сплайсинга 5-го інтрона гена LOX-1, ампліфікований у стадії ампліфікації ДНК-фрагмента, розщеплюють рестрикційним ферментом (рестриктазою), детектують ДНК-фрагмент, що має вказану кількість основ, і позбавлений LOX-1 ячменю ячмінь розпізнають за допомогою визначення, є чи не є гуанін у донорному сайті сплайсинга мутованим в іншу основу.

Спочатку буде пояснена стадія екстракції геномної ДНК.

Немає особливих обмежень відносно способу екстракції геномної ДНК, і може бути використаний будь-який широко відомий спосіб. Конкретно, екстракцію можна провести, наприклад, способом STAB [Murray et al., 1980, Nucleic Acids Res. 8:4321-4325] або способом з бромідом етидію [Varadarajan and Prakash 1991, Plant Mol. Biol. Rep. 9:6-12]. Тканина, що використовується для екстракції геномної ДНК, не обмежується насінням ячменю, але може бути також листям, стеблом, корінням або т.п. Наприклад, листя може бути використане для відбору з партії індивідуумів у генераціях зворотного схрещування.

Тепер буде пояснена стадія ампліфікації ДНК-фрагмента.

Немає особливих обмежень відносно способу ампліфікації ДНК-фрагмента, і, наприклад, може бути використаний спосіб ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції). Праймери, що використовуються для способу ПЛР, не обмежені конкретно в їх нуклеотидних послідовностях, поки вони представлені ділянкою, що дозволяє ампліфікувати ДНК-фрагмент, що містить донорний сайт сплайсинга 5-го інтрона гена LOX-1, і, конкретно, вони є переважно 10-60 суміжними основами і, більш переважно, 15-30 суміжними основами гена LOX-1. Зазвичай нуклеотидна послідовність праймера буде переважно мати GC-вміст 40-60%. Переважно також, щоб відмінність у величинах Tm двох праймерів, які використовуються для способу ПЛР, була така, що дорівнює нулю або була дуже малою. Ці праймери переважно не утворюють вторинну структуру один з одним.

Тепер буде пояснена стадія детектування ДНК-фрагмента.

Мутантний ген LOX-1 відповідно до даного винаходу має нуклеотидну послідовність, відмінну від відомого LOX-1, як пояснено вище, і, отже, при використанні рестриктази, яка впізнає або розщеплює цю відмінну частину, для розщеплення продукту ампліфікації, відмінність у розмірах отриманих ДНК-фрагментів буде очевидною. Немає особливих обмежень у відношенні рестриктази, що використовується для даного винаходу, поки вона впізнає або розщеплює відмінну частину, але переважними є рестриктази AfaI і/або RsaI, які, як вже було продемонстровано, виявляють таку активність.

Іншими словами, оскільки мутантний ген LOX-1 даного винаходу має гуанін в донорному сайті сплайсинга, мутований в іншу основу, він не містить сайту розщеплення для рестриктаз AfaI і RsaI (5'-GTAC-3': нуклеотидів 60-63 5-го інтрона), який присутній у відомому гені LOX-1. У результаті, його патерн розщеплення, при розщепленні продукту ампліфікації гена, що містить цей сайт розщеплення, рестриктазами AfaI і/або RsaI, буде відрізнятися від патерна розщеплення відомого гена LOX-1, що дозволяє ідентифікувати мутантний ген LOX-1.

ДНК-фрагмент, що має вказану кількість основ, не обмежується в кількості основ, поки він є ДНК-фрагментом, в якому присутність відмінної частини призводить до відмінності в розмірі ДНК-фрагмента, що отримується розщепленням продукту ампліфікації рестриктазою.

Детектування на цій стадії особливо не обмежується, поки воно є способом, що робить можливим детектування ДНК-фрагмента, що розщеплюється рестриктазою, і, конкретно, детектування може виконуватися, наприклад, електрофорезом в агарозному гелі або електрофорезом в поліакриламідному гелі.

Тепер буде пояснений матеріал для солодових алкогольних напоїв даного винаходу.

Матеріал для солодових алкогольних напоїв даного винаходу характеризується тим, що він є насінням, солодом, екстрактом солоду, продуктом розщеплення ячменю або обробленим ячменем, отриманими з ячменю, що має мутантний ген LOX-1 відповідно до даного винаходу, і тим, що він є насінням, солодом, екстрактом солоду, продуктом розщеплення ячменю або обробленим ячменем, отриманими з ячменю, відібраними способом відбору LOX-1-недостатнього ячменю відповідно до даного винаходу.

Солодовий екстракт є екстрактом з солоду, і як приклади може бути згаданий екстракт цукрових компонентів або білкових компонентів з солоду. Продукт розщеплення ячменю є продуктом розщеплення ячменю ферментами або т.п., і він включає в себе ячмінний затор і т.п. Обробленим ячменем називають оброблений ячмінь, що використовується як домішка для солодових алкогольних напоїв.

Оскільки матеріал для солодових алкогольних напоїв за даним винаходом не містить LOX-1, не відбувається легкого утворення 9-гідропероксіоктадекадієнової кислоти з лінолевої кислоти і, отже, не відбувається легкого утворення THOD і транс-2-ноненалу під час цього способу отримання солодових алкогольних напоїв; таким чином, можна отримувати солодові алкогольні напої з поліпшеною стабільністю смаку і піностійкістю.

Тепер буде пояснене отримання солодових алкогольних напоїв.

Спосіб отримання солодових алкогольних напоїв даного винаходу характеризується використанням матеріалу для солодових алкогольних напоїв відповідно до даного винаходу.

Спочатку буде пояснена стадія отримання солоду, що характеризується використанням LOX-1-недостатнього ячменю, і цей спосіб не є особливо обмеженим і може бути будь-яким широко відомим способом. Більш конкретно, наприклад, замочування до міри замочування 40-45% супроводжується пророщуванням при 10-20°C протягом 3-6 днів і пічним сушінням для отримання солоду.

Тепер буде пояснена стадія затирання.

Стадія затирання відповідно до даного винаходу є стадією отримання сусла затиранням вищезазначеного солоду. Більш конкретно, вона складається з чотирьох стадій.

Першою стадією є стадія затирання, в якій матеріал, що містить солод, змішують з водою, отриману суміш нагрівають для затирання солоду й отримують сусло з цукрованого солоду.

Солод, що використовується для цієї стадії, переважно отримують додаванням води і повітря до ячменю для пророщування з подальшим сушінням для видалення зародків. Цей солод є джерелом необхідних ферментів для отримання сусла, а також основним джерелом крохмалю як матеріала для затирання. Висушений пічним сушінням пророщений солод використовують також для надавання характерного смаку і кольору солодовому алкогольному напою. Крім такого солоду, можуть бути додані домішки, такі як LOX-1-недостатній ячмінь за даним винаходом і/або звичайний ячмінь, кукурудзяний крохмаль, кукурудзяні крупи, рис, сахариди або т.п.

У стадії отримання сусла, описаній вище, продукт розщеплення ячменю або оброблений ячмінь, отриманий з LOX-1-недостатнього ячменю даного винаходу і/або звичайного ячменю, змішують із заторною водою і додають, якщо необхідно, вищезазначені домішки для отримання сусла.

Солод перемішують після додавання заторної води. При додаванні домішок вони можуть бути також змішані в цей момент. Сахариди можуть додаватися перед кип'ятінням, описаним нижче. Немає особливих обмежень відносно заторної води, і може бути використана вода, яка придатна для отримуваних солодових алкогольних напоїв. Затирання проводять по суті при загальноприйнятих умовах. Після фільтрування солодового затору, отриманого таким чином, додають матеріали, які надають аромат або гіркоту, такий як хміль або трави, і суміш кип'ятять і потім охолоджують з отриманням охолодженого сусла.

Другою стадією є стадія додавання дріжджів до охолодженого сусла для ферментації з метою отримання проміжних продуктів солодового алкогольного напою.

Дріжджі, що використовуються в цій стадії, можуть бути будь-якими пивними дріжджами для спиртового бродіння, які метаболізують цукор у суслі, отриманому затиранням солоду, з утворенням спирту та газоподібного діоксиду вуглецю, і, конкретно, можуть бути згадані, наприклад, *Saccharomyces cerevisiae* та *Saccharomyces uvarum*.

Зброджування виконують охолодженням сусла, отриманого в стадії затирання, і додаванням до нього дріжджів. Умови зброджування можуть бути по суті такими самими, що й умови для загальноприйнятої ферментації, і, наприклад, температура зброджування буде зазвичай не вищою 15°C і переважно 8-10°C, тоді як період зброджування складає переважно 8-10 днів.

Третьою стадією є стадія витримування, в якій проміжні продукти солодового алкогольного напою, отриманого в стадії зброджування, витримують.

У цій стадії зброджуваний розчин, який завершив спиртове бродіння, переносять у герметизований чан і витримують. Це повторне зброджування по суті є таким самим, що і зброджування при звичайних умовах, і, наприклад, температура витримування дорівнює переважно 0-2°C і час витримування дорівнює приблизно 20-90 днів. Витримування збродженого розчину робить можливими проходження повторного бродіння і дозрівання екстракту, що залишився.

Четвертою стадією є стадія фільтрування, в якій проміжні продукти солодового алкогольного напою, отриманого на стадії витримування, фільтрують з отриманням солодового алкогольного напою.

Умови фільтрування є по суті такими самими, що і загальноприйняті умови, і, наприклад, фільтруючим матеріалом, що використовується, можуть бути діатомова земля, полівінілпіролідон (PVPP), сілікагель, порошок целюлози або т.п., і температура може бути 0±1°C.

Ця процедура дає солодовий алкогольний напій. Потім відфільтрований солодовий алкогольний напій вміщують в чан, розливають в бочки, розливають в пляшки або в консервні банки для транспортування на ринок, або відразу ж, або після стерильного фільтрування чи теплової обробки.

Частка солоду, що використовується для отримання ячмінного алкогольного напою, особливо не обмежується, і алкогольний напій може бути будь-яким напоєм, що отримується з використанням солоду як початкового матеріалу. Конкретно можуть бути згадані, наприклад, пиво та ігристий солодовий напій. Безалкогольне пиво і безалкогольний ігристий солодовий напій також вважаються солодовими алкогольними напоями, оскільки спосіб отримання, що використовується, є схожим зі способом отримання таких солодових алкогольних напоїв, як пиво.

Оскільки матеріал за даним винаходом не містить LOX-1, не відбувається легкого утворення 9-гідропероксіоктадекадієнової кислоти з лінолевої кислоти і, отже, інгібується утворення THOD і транс-2-ноненалю під час способу отримання солодових алкогольних напоїв, і, отже, можна отримувати солодові алкогольні напої з поліпшеною стабільністю смаку і стійкістю піни.

Тепер будуть пояснені нуклеїнова кислота і спосіб детектування присутності активності LOX-1 в ячмені відповідно до даного винаходу.

Нуклеїнова кислота даного винаходу характеризується тим, що вона містить нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:11. SEQ ID NO:11 представляє геномну послідовність для мутантного LOX-1 у сорті SDOU2 ячменю, позбавленого активності LOX-1. Тобто мутантний ген LOX-1 даного винаходу характеризується тим, що він представлений послідовністю SEQ ID NO:11. Основа, що відповідає положенню 3178, є G в аутентичному гені LOX-1, тоді як основа 3178 є мутованим в A в мутантному гені LOX-1. Ця основа є також першою основою 5-го інтрона аутентичного гена LOX-1, і послідовність GT у вигляді послідовності основ 3178-3179 відповідає донорному сайту сплайсинга (Fig.5). Однак у мутантному гені LOX-1 послідовність основ 3178-3179, що відповідає донорному сайту сплайсинга, є AT, і, отже, відбувається аберація сплайсинга, яка запобігає сплайсингу. Крім того, послідовність основ 3176-3178 є TGA, яка є стоп-кодом, і, отже, у цій точці транскрипція закінчується.

Оскільки мутантний білок LOX-1, що експресується мутантним геном LOX-1, має тільки частину, відповідну 5-ому екзону, він позбавлений амінокислотних залишків на С-кінцевій стороні від 5-го екзона аутентичного білка LOX-1. Молекулярна маса аутентичного білка LOX-1 дорівнює 95кД, тоді як молекулярна маса мутантного білка LOX-1 дорівнює 57кД. Мутантний білок LOX-1 позбавлений ліпоксигеназної активності, і це корелює з відомим фактом, що домен, який відповідає ділянці екзона біля 5-го інтрона в аутентичному білку LOX-1, є активним центром LOX рослин [Shibata and Axelrod (1995) J. Lipid

Таким чином, якщо ячмінь, що має мутантний ген LOX-1, використовується як сировинний матеріал для отримання солодових алкогольних напоїв, білок LOX-1 не буде присутнім у цьому сировинному матеріалі, і, отже, утворення 9-гідропероксіоктадекадієнової кислоти з лінолевої кислоти під час цього способу отримання солодових алкогольних напоїв буде зменшене, так що в результаті може бути досягнуте інгібування утворення THOD і транс-2-ноненалю з метою отримання солодових алкогольних напоїв з поліпшеними стабільністю смаку і стійкістю піни. Таким чином, нуклеїнова кислота, що містить нуклеотидну послідовність, представлена в SEQ ID NO:11, відповідно до даного винаходу, є у високій мірі корисною для отримання солодових алкогольних напоїв з поліпшеними стабільністю смаку і стійкістю піни.

Нуклеїнова кислота даного винаходу забезпечує нуклеїнову кислоту, що містить нуклеотидну послідовність з 10-60 суміжних основ, у тому числі основу 3178, в нуклеотидній послідовності, представлений в SEQ ID NO:11. Ця нуклеїнова кислота може бути використана як зонд для розрізнення між аутентичною і мутантною формами гена LOX-1 ячменю. Тобто, оскільки основа 3178 аутентичного гена LOX-1 є G, отримане помилкове спарювання може бути використане для розрізнення аутентичної та мутантної форм на основі відмінності в гібридизації. Наприклад, за допомогою утворення гібридів між цими нуклеїновими кислотами і нуклеїновою кислотою гена LOX-1, поступового збільшення температури і вимірювання температури плавлення гібридів можна легко розрізнити аутентичний ген LOX-1 і мутантний ген LOX-1, оскільки їх температури плавлення будуть розрізнятися. Ця нуклеїнова кислота може бути також використана для розрізнення форм гена LOX-1 (аутентичної/мутантної форм) з використанням способів, відомих фахівцям з кваліфікацією в даній галузі. З точки зору специфічності, ця нуклеїнова кислота, переважно, містить нуклеотидну послідовність з 20-50 суміжних основ, у тому числі основу 3178, і, переважно, вона включає в себе основи 3178-3181. Ця нуклеїнова кислота може бути також мічена флуоресцентною речовиною, радіоактивним ізотопом або т.п.

Спосіб детектування присутності активності LOX-1 в ячмені відповідно до даного винаходу передбачає стадію виділення геномної ДНК з проби ячменю і стадію детектування основи 3178 нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO:11, причому присутність цієї основи є показником присутності активності LOX-1 в ячмені. Згідно з цим способом, можна дізнатися, має чи не має ячмінь, що тестується, ознаку недостатності активності LOX-1.

Проба ячменю не обмежується насінням ячменю, і вона може бути листям, стеблом, корінням ячменю або т.п. Нуклеїнова кислота може бути виділена широко відомими способами і, наприклад, може бути використаний спосіб CTAB або спосіб з використанням броміду етидію.

Детектування основи 3178 нуклеїнової послідовності, представленої SEQ ID NO:11, може виконуватися за допомогою способу, відомого фахівцям з кваліфікацією в даній галузі. Наприклад, якщо необхідно, нуклеїнова кислота, що містить основу 3178 нуклеотидної послідовності, представленої SEQ ID NO:11, може бути ампліфікована за способом ампліфікації нуклеїнових кислот, таким як ПЛР. Ідентичність основи в положенні 3178 виділеної нуклеїнової кислоти або ампліфікованого фрагмента нуклеїнової кислоти можна розрізнити, наприклад, за допомогою нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, представлену SEQ ID NO:11, причому ця нуклеїнова кислота містить послідовність з 10-60 суміжних основ, у тому числі основу 3178, як описано вище.

Однак спосіб детектування основи 3178 з використанням відмінності в основах 3178-3181 гена LOX-1 є більш зручним і ефективним. Сайт основ 3178-3181 є сайтом розщеплення рестриктаз AfaI/RsaI в аутентичному гені LOX-1, але внаслідок того, що основа 3178 є A у мутантному гені LOX-1, вона не утворює сайту розщеплення для рестриктаз AfaI/RsaI (Fig.5). Іншими словами, при обробці виділеної нуклеїнової кислоти або ампліфікованого фрагмента нуклеїнової кислоти рестриктазами AfaI/RsaI нуклеїнова кислота аутентичного LOX-1 буде розщеплюватися, тоді як нуклеїнова кислота мутантного LOX-1 не буде розщеплюватися. Електрофоретичний аналіз обробленої рестриктазами проби нуклеїнової кислоти буде робити можливим розрізнення форми гена LOX-1 (аутентичної або мутантної) на основі відмінності в картинах електрофорезу, так що може бути розрізнена ідентичність основи в положенні 3178. Крім того, за допомогою використання нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність з 10-60 суміжних основ, у тому числі основ 3178-3181, як зонд для гібридизації з обробленою рестриктазами нуклеїновою кислотою можна розрізнити форму гена LOX-1 і, отже, зробити можливим пізнання ідентичності основи 3178.

Якщо внаслідок розпізнавання основи 3178 таким чином виявляється, що ця основа є G, то можна зробити висновок, що ячмінь, який тестується, має активність LOX-1 і не придатний як сировинний матеріал для солодових алкогольних напоїв з поліпшеними стабільністю смаку і стійкістю піни. З іншого боку, якщо цією основою є A, то можна зробити висновок, що ячмінь, який тестується, не має активності LOX-1 і, отже, придатний як сировинний матеріал для солодових алкогольних напоїв з поліпшеними стабільністю смаку і стійкістю піни.

Нуклеїнова кислота даного винаходу характеризується також тим, що вона містить нуклеотидну послідовність від положення 1 до положення 1554, представлену в SEQ ID NO:10. SEQ ID NO:10 представляє кДНК-послідовність мутантного LOX-1, що експресується сортом ячменю SBOU2, позбавленого активності LOX-1. Нуклеотидна послідовність від положення 1 до положення 1554 представляє кодуючу ділянку. Як пояснено вище, мутантний білок LOX-1, що кодується цією кДНК, не має амінокислотних залишків на С-кінцевому боці від 5-го екзона аутентичного білка LOX-1, його молекулярна маса дорівнює 57кДа і він позбавлений ліпоксигеназної активності.

Таким чином, ячмінь, що експресує цю нуклеїнову кислоту, може бути використаний як сировинний матеріал для отримання солодових алкогольних напоїв з метою отримання солодових алкогольних напоїв з поліпшеними стабільністю смаку і стійкістю піни, як згадувалося вище.

Приклади

Тепер даний винахід буде пояснений більш детально за допомогою наступних прикладів, з розумінням того, що ці приклади ніяким чином не є такими, що обмежують даний винахід.

Тест пошуку 1 (пошук на LOX-1-недостатній ячмінь за допомогою вимірювання активності ферменту LOX-1)

Активність ферменту LOX-1 вимірювали за способом, описаним нижче, а пошук на LOX-1-недостатній ячмінь проводили з ресурсів генів ячменю.

Спочатку розчин неочищеного ферменту екстрагували з насіння ячменю за наступному способом. Одну зрілу насінину ячменю подрібнювали молотком і використовували 500мкл буферу для екстракції (0,1М натрій-ацетатний буфер (pH 5,5)) для екстракції зі струшуванням при 4°C протягом 30 хвилин. Отриманий екстракт центрифугували протягом 10 хвилин при 15000об/хв. і потім супернатант використовували як розчин неочищеного ферменту.

Потім, 5мкл розчину субстрату (40мМ лінолева кислота, 1,0% (маса/об'єм) водний розчин Твіна 20) і 85мкл буферу для екстракції додавали до 10мкл розчину неочищеного ферменту і змішували разом і потім реакцію проводили при 24°C протягом 5 хвилин. Реакцію зупиняли додаванням і змішуванням 100мкл стоп-розчину (80мМ 2,6-ди-трет-бутил-п-крезол, розчин в метанолі). Після відстоювання реакційної суміші при -20°C протягом 30 хвилин її центрифугували при 3000об/хв. протягом 20 хвилин і супернатант використовували в наступній реакції з розвитком забарвлення. Частина 200мкл утворюючого колір розчину (4мМ 2,6-ди-трет-бутил-п-крезол, 25мМ сірчана кислота, 0,25мМ гексагідрат сульфату амонію/заліза(II), 100мМ ксиленоловий оранжевий, 90% водний метанол) додавали до 20мкл отриманого супернатанта і після відстоювання протягом 30 хвилин вимірювали оптичну густину при 550нм. Як негативний контроль реакції проводили таким самим чином з використанням розчину неочищеного ферменту, обробленого нагріванням при 100°C протягом 5 хвилин для інактивації LOX-1, тоді як позитивний контроль використовували насіння Kendall, сорти ячменю.

Як показано на Фіг.1, пошук ресурсів генів не виявив значущої активності LOX-1 в насінні сорту SBOU2. Оскільки SBOU2 є місцевим сортом, він є швидше спонтанним мутантом, ніж штучно мутагенізованою лінією.

Тест верифікації 1 (підтвердження відсутності інгібуючої LOX-1 активності в розчинах неочищеного ферменту SBOU2)

Розчини неочищеного ферменту SBOU2 випробовували на присутність або відсутність інгібуючої LOX-1 активності.

Розчини неочищеного ферменту SBOU2 (10мкл, 20мкл, 50мкл) додавали до розчину неочищеного ферменту, що виявляє активність LOX-1 (позитивний контроль: PC), і досліджували зміни активності LOX-1. Активність LOX-1 не змінювалася при додаванні розчину неочищеного ферменту SBOU2, і, отже, інгібуюча LOX-1 активність не виявлялася розчинами неочищеного ферменту SBOU2 (Фіг.2). Це дозволяє передбачити, що причина недостатності активності LOX-1 в SBOU2 не була зумовлена інгібуючою активністю LOX речовиною.

Тест верифікації 2 (підтвердження рівня експресії білка LOX-1 в насінні SBOU2)

Антитіло анти-LOX-1 використовували для визначення, експресується чи не експресується білок LOX-1 в насінні SBOU2.

Спочатку отримували антитіло анти-LOX-1. Білок LOX-1, що використовується як антиген, отримували очищенням білка LOX-1, що експресується *E. coli* [Kuroda et al. (2002) J. Bioscience and Bioengineering 93:73-77]. Цей очищений білок використовували для імунізації кроликів для отримання антитіла проти LOX-1. Це антитіло впізнає як LOX-1, так і LOX-2.

Потім проводили Вестерн-блотинг наступним чином для випробування експресії білка LOX-1 в насінні SBOU2. Частина 3мкг загального розчинного білка, екстрагованого з SBOU2 з використанням 0,1М натрій-ацетатного буфера (pH 5,5), фракціонували електрофорезом в ДСН-поліакриламідному гелі (електрофорезом в ДСН-ПААГ) і потім блотували на мембрану PVDF (Millipore). Цю мембрану промивали TTBS (20мМ Трис-НСІ (pH 7,5), 0,15М хлорид натрію, 0,05% (м/об.) Твін 20, 0,05% (м/об.) азид натрію) і потім використовували в реакції з розчином LOX-1-антитіла (1000-разовому розведення/TTBS) протягом 30 хвилин. Мембрану промивали TTBS тричі протягом 5 хвилин кожного разу, після чого проводили реакцію протягом 30 хвилин з розчином міченого лужною фосфатазою козячого антитіла проти кролячого IgG (Santa Cruz Biotechnology, розчин в TTBS при 1000-разовому розведенні). Після промивання цієї мембрани TTBS протягом 5 хвилин×2 і потім AP9,5 (10мМ Трис-НСІ (pH 9,5), 0,1М хлорид натрію, 5мМ хлорид магнію) протягом 5 хвилин×1, проводили реакцію з розчином субстрату лужної фосфатази (1мг/мл нітросинього тетразолію, 0,5мг/мл BCIP, розчину в AP9,5) для розвитку забарвлення. У результаті отримували темну смугу з молекулярною масою близько 95кДа з контрольним сортом (Kendall), в той час як дві дуже слабкі смуги детектували в ділянках молекулярної маси близько 95кДа і близько 57кДа у випадку насіння сорту SBOU2 (Фіг.3A).

Потім пробу цього екстракту піддавали ізоелектричному фокусуванню (IEF, рІ 3-9) з використанням PhastSystem (Amersham Pharmacia) і піддавали Вестерн-аналізу, як описано вище. Внаслідок аналізу з використанням SBOU2 детектували смугу в положенні рІ LOX-2, але ясна смуга не була присутньою в положенні рІ LOX-1 (Фіг.3B). Це передбачає, що смуга приблизно 95кД, що виявляється у випадку екстрагованого з насіння SBOU2 білка, була білком LOX-2.

Ці результати підтвердили, що насіння SBOU2 фактично не експресує аутентичний білок LOX-1.

Тест верифікації 3 (аналіз РНК LOX-1 насіння SBOU2)

ОТ-ПЛР проводили з використанням як матриці тотальної РНК, екстрагованої з приблизно 4-тижневого дозріваючого насіння SBOU2 і 3-денного насіння, яке пророщують. Реакцію проводили з використанням комерційно доступних наборів (Roche Diagnostics, Perkin Elmer) відповідно до керівництва наборів. Праймерами були 5'-GGAGAGGAGGCCAAGAACAAGATG-S' (SEQ ID NO:3) і 5'-GGTTGCCGATGGCTTAGAT-3' (SEQ ID NO:4), сконструйовані на основі опублікованої послідовності (DNA Databank: Accession No. L35931). Після інкубації при 94°C протягом 2 хвилин проводили ПЛР з реакцією при 94°C, 1хв., 60°C, 2хв. і 72°C, 4хв., що повторюється 31 раз, з подальшою реакцією подовження при 72°C, 7хв.

При електрофорезі ампліфікованої ДНК ампліфікацію смуги приблизно 2,5т.п.о. детектували для РНК з дозріваючого і проростаючого насіння, ніж трохи більш низьку кількість, ніж у контролі (сорти Kendall) (Фіг.4). Це показало, що ген LOX-1 був належно транскрибований.

Оскільки вищезазначені результати для насіння SBOU2 показали, що (1) активність LOX-1 не була

детектована, (2) була присутньою тільки незначна кількість антигенного білка, що реагує з антитілом LOX-1, (3) детектували присутність білка з молекулярною масою приблизно 57кДа і (4) при детектуванні мРНК LOX-1, був зроблений висновок, що механізмом недостатності активності LOX-1 в SBOU2 була аберація після транскрипції.

Тест верифікації 4 (структурний аналіз інтронних ділянок гена LOX-1 SBOU2)

Для аналізу структури ділянок інтронів і екзонів гена LOX-1 виділяли геномну ДНК ділянки, що містить все ці екзони. Тотальну ДНК з SBOU2 використовували як матрицю. Праймери (5'-CACGTCGCCGTCGATCCATC-3') (SEQ ID NO:5), 5'-GGTTCGATGGCTTAGAT-3') (SEQ ID NO:4)) конструювали на основі відомої послідовності [DNA Databank: Accession Nos. U83904, L35931]. ПЛР проводили з реакцією при 94°C, 1хв., 65°C, 2хв. і 72°C, 3хв., що повторюється 31 раз, з подальшою реакцією подовження при 72°C, 7хв. Отриманий ДНК-фрагмент клонували в pCR2.1 (pGLXABAL1) для застосування як матриці для структурного аналізу. Структурний аналіз проводили з використанням ABI-секвенатора, а реакцію секвенування проводили за способом термінації з барвником. Повна структура показана в SEQ ID NO:11 у списку послідовностей.

SEQ ID NO:1 списку послідовностей показує структуру ділянки повідомленої нуклеотидної послідовності гена LOX-1 (WO 02053721), що містить 5-ий інтрон. Донорним сайтом сплайсинга є нуклеотидна послідовність 5'-GT-3' у положеннях 60-61.

Нуклеотидна послідовність відповідної ділянки SBOU2, визначена з результатів аналізу, знаходиться в списку послідовностей у вигляді SEQ ID NO:2. У випадку SBOU2 ясно, що гуанін у положенні 60 в донорному сайті сплайсинга мутований в аденін.

Заміна 60-ї основи SEQ ID NO:2 аденином утворить новий стоп-кодон (нуклеотидна послідовність 5'-TGA-3' в положеннях 58-60 SEQ ID NO:2), і, отже, передбачувано трансляція білка LOX-1 закінчується в цій точці, якщо цей сайт сплайсинга ніколи не змінюється в напрямку ліворуч відносно 5'-кінця (Fig.5).

Відомо, що ділянка екзона поблизу 5-го інтрона є активним центром LOX рослин [Shibata and Axelrod (1995), J. Lipid Mediators and Cell Signaling 12:213-228], і вважається, що вищезазначена аберація сплайсинга впливає великий чином на активність ферменту LOX-1.

Тест верифікації 5 (аналіз сплайсинга в 5-ому інтроні) ОТ-ПЛР-аналіз проводили для підтвердження, що аберація сплайсинга, дійсно, мала місце в 5-ому інтроні.

Тотальну РНК екстрагували з проростаючих сортів SBOU2 і Kendall і для отримання матричної ДНК використовували комерційно доступний набір (Roche Diagnostics) для синтезу ДНК. ПЛР проводили з використанням двох різних праймерів (5'-CCATCAGCAGGCGATCCTG-3' (SEQ ID NO:6), 5'-GCGTTGATGAGCGTCTGCCG-3' (SEQ ID NO:7)), сконструйованих для отримання ампліфікованого фрагмента, що містить 3-ий інтрон (106п.о.), 4-ий інтрон (132п.о.) і 5-ий інтрон (79п.о.) у послідовності геномної ДНК. ПЛР проводили з реакцією при 94°C, 1хв., 65°C, 2хв. і 72°C, 3хв., що повторюється 31 раз, з подальшою реакцією подовження при 72°C, 7хв. Електрофорез в агарозному гелі ампліфікованих ДНК-фрагментів показав, що ампліфікований фрагмент SBOU2 був приблизно на 80п.о. більше, ніж ампліфікований фрагмент Kendall (Fig.6A). Фрагмент приблизно 1,2т.п.о. ампліфікували з геномної ДНК SBOU2, що передбачає, що ці результати ОТ-ПЛР були результатами для експресованої РНК.

Потім, для дослідження того, в яких інтронах відбулася аберація сплайсинга (3-му інтроні (106п.о.), 4-му інтроні (132п.о.) або 5-му інтроні (79п.о.)), цей ампліфікований фрагмент розщеплювали в сайті рестриктази *StuI*, присутньому в ділянці екзона між 4-им інтроном (132п.о.) і 5-им інтроном. У результаті ДНК-фрагмент, що містить 5-ий інтрон, мав рухливість, приблизно еквівалентну рухливості одного з фрагментів ампліфікації з геномної ДНК, і, отже, явно сталася аберація в сплайсинга 5-го інтрона, яка або запобігала сплайсинга, або зміщувала сайт сплайсинга до 3'-сторони (Fig.6B). Тобто, очевидно, що стоп-кодон, новоутворений, як показано на Fig.5, зупиняв трансляцію білка LOX-1 SBOU2 в цьому кодоні, приводячи до втрати активності LOX-1.

Тест верифікації 6 (структурний аналіз кДНК LOX-1 SBOU2)

Для з'ясування структури LOX-1, отриманої з SBOU2, кДНК виділяли тим самим способом, який описаний вище. Ампліфікацію проводили з використанням праймера, що містить сайт *BamHI* і стартовий кодон (5'-GGATCCATGCTGCTGGGAGGGCTG-3' (SEQ ID NO:8), і праймера, сконструйованого для включення сайту *HindIII* і стоп-кодона (5'-AAGCTTTTAGATGGAGATGCTGTTG-3') (SEQ ID NO:9). Ампліфікований фрагмент клонували у вектор pT7 Blue T (Novagen) (pBDC1) і потім забезпечували структурний аналіз. Результати структурного аналізу давали нуклеотидну послідовність кДНК, показану у вигляді SEQ ID NO:10. Цей кДНК-клон явно включає в себе всю ділянку 5-го інтрона (основи 1554-1632 SEQ ID NO:10).

Тест верифікації 7 (трансформація *E. coli* та індукована експресія)

Для експресії LOX-1, що походить з сорту *Steptoe*, який зберігає LOX-1 дикого типу, отриману з *Steptoe* кДНК виділяли також вищеописаним способом і клонували в *E. coli* (pSDC1), окремо від SBOU2. *BamHI*-*HindIII*-фрагмент вирізали з кожного з клонів pSDC1 і pBDC1 і кожний з отриманих фрагментів інсертували в сайт *BamHI*-*HindIII* експресуючого вектора *E. coli* pQE80L (Qiagen) з отриманням експресуючих векторів *E. coli* (pSQE1 з інсерцією кДНК *Steptoe*) і pBQE1 (з інсерцією кДНК SBOU2)). Ці вектори використовували для трансформації *E. coli* JM109 і потім індукували експресію за допомогою IPTG відповідно до інструкції Qiagen. У результаті індукувалася експресія смуги приблизно 95кДа в pSQE1/JM109, тоді як експресія смуги приблизно 57кДа індукувалася з pBQE1/JM109 (Fig.7). Клітини *E. coli* руйнували обробкою ультразвуком і аналізували активність LOX екстрактів неочищених ферментів. У результаті була виявлена висока активність LOX з pSQE1/JM109, тоді як активність LOX не була виявлена з pBQE1/JM109 (Fig.8). Ці результати цілком узгодилися з результатами аналізу активності LOX-1 і білка LOX-1 для рослин SBOU2, що свідчить про те, що недостатність LOX-1 SBOU2 може бути відтворена в *E. coli*.

Тест верифікації 8 (тест обміну інсерцій та експресії)

Потім *PstI*-*StuI*-фрагмент, що містить мутацію в донорному сайті сплайсинга 5-го інтрона pBQE1 (сайт *StuI* знаходиться в основах 1502-1507 SEQ ID NO:10, а сайт *PstI* знаходиться в основах 2048-2053 SEQ ID NO:10), піддавали взаємному обміну з *PstI*-*StuI*-фрагментом pSQE1 дикого типу (pSQE1+BPS, pBQE1+SPS) і експресію індукували в *E. coli*, як описано вище. У результаті з pSQE1+BPS/JM109, що має фрагмент, який

походить з pBQE1 PstI-StuI, що містить мутацію в донорному сайті сплайсинга 5-го інтрона, вбудований в pSQE1, була індуквана експресія білка приблизно 57кДа (Фіг.7) і активність LOX-1 була втрачена (Фіг.8), подібно pBQE1/JM109. Навпаки, з pBQE1+SPS/JM109, що має фрагмент, який походить з pSQE1 PstI-StuI, вбудований в pBQE1, була індуквана експресія білка приблизно 95кДа (Фіг.7) і була відновлена активність LOX (Фіг.8), що схоже з pSQE1/JM109. Нуклеотидна послідовність PstI-StuI-фрагмента pBQE1 була точно ідентичною гену LOX-1 дикого типу, за винятком донорного сайту сплайсинга 5-го інтрона (G замінений на A в основі 1554 SEQ ID NO:10). Ці результати ясно продемонстрували, що присутність або відсутність мутації в донорному сайті сплайсинга 5-го інтрона SBOU2 визначає, чи присутня активність LOX-1.

Тест верифікації 9 (картування та відбір гібридного сорту ячменю з використанням мутації 5-го інтрона)

У сполученій нуклеотидній послідовності LOX-1, послідовність, що містить донорний сайт сплайсинга 5-го інтрона (нуклеотиди 60-63 SEQ ID NO:1: 5'GTAC-3'), може бути відщеплена рестриктазою AfaI (або RsaI), яка впізнає послідовність GTAC. Дефектний ген LOX-1 був картований з використанням того факту, що в послідовності цієї ділянки в лінії SBOU2 присутня мутація (нуклеотиди 60-63 SEQ ID NO:2: 5'-ATAC-3'), яка запобігає розщепленню рестриктазами AfaI і/або RsaI (Фіг.5). Екстрагували ДНК з листя 144 індивідумів 2-го дочірнього покоління гібридів (F2) схрещування між Kendall і лінією SBOU2 і проводили ПЛР з використанням двох різних праймерів (5'-CCATCACGCAGGGCATCCTG-3' (SEQ ID NO:6), 5'-GCGTTGATGAGCGTCTGCCG-3' (SEQ ID NO:7)), сконструйованих таким чином, що ампліфікований фрагмент повинен містити сайт AfaI. ПЛР проводили з реакцією при 94°C, 1хв., 65°C, 2хв. і 72°C, 3хв., що повторюється 31 раз, з подальшою реакцією подовження при 72°C, 7хв. Кожний з ампліфікованих фрагментів розщеплювали AfaI і аналізували електрофорезом в 2,5% агарозному гелі (далі ця процедура буде називатися "способом AfaI"). У результаті можна було легко виконувати розрізнення між SBOU2, Kendall і гетеротипами (Фіг.9). Крім випробування поліморфізму за способом AfaI, поліморфізм у кожному сорті випробовували також з використанням маркера ДНК (JBC970) поблизу генного локусу LOXA хромосоми 4Н ячменю, що несе ген LOX-1 (Фіг.10).

Зріле насіння кожного з індивідумів F2 використовували для випробування активності LOX-1 насіння. Для ліній, що не виявляють активності LOX, активність вимірювали з використанням декількох (4-7) насінин (Фіг.10).

Внаслідок випробування поліморфізму покоління F2 за способом AfaI і вимірювання активності LOX насіння F3 розщеплення ознаки дефектного LOX-1 SBOU2 точно співпадало з розщепленням поліморфізму за способом AfaI. Таким чином, ці серії генетичних аналізів ясно показали, що дефектний ген LOX-1 SBOU2 знаходиться в генному локусі LOXA.

Ці результати показали також, що застосування способу AfaI як приклад способу відбору ячменю з використанням мутації ДНК дозволяє провести відбір LOX-1-недостатніх ліній потомства на ранній стадії росту, що усуває необхідність очікування до часу дозрівання насіння.

Приклад 1

(Дослідження поліморфізму AfaI інших сортів ячменю)

Звичайні сорти/лінії ячменю використовували для дослідження поліморфізму AfaI Загалом використали 32 сорти/лінії: Mikamo Golden, Golden Melon, Haruna Nijo, Myogi Nijo, Sakitama Nijo, Wasedori Nijo, Agurimochi, Harupin Nijo, Ryofu, Hokuiku 33, Hokuiku 35, Prior, Schooner, Sloop, Lofty Nijo, Franklin, Betzes, Harrington, Manley, B1251, CDC Kendall, CDC Stratus, CDC Copeland, Hanna, Merit, AC Metcalfe, TR145, Chariot, Stirling, Proctor, Koral та Heartland. В результаті дослідження поліморфізму за способом AfaI було визначено, що перевірені сорти не були сортами типу SBOU2, але, замість цього, розщеплювалися в сайті рестриктази AfaI, що містить донорний сайт сплайсинга 5-го інтрона (нуклеотиди 60-63 SEQ ID NO:1: 5'GTAC-3') (Фіг.11). Це показало, що ці життєздатні лінії не мають мутації ДНК в сайті AfaI (нуклеотидах 60-63 SEQ ID NO:1: 5'GTAC-3'), і, отже, спосіб AfaI може бути ефективно використаний для відбору дефектних генів LOX-1 серед ліній потомства.

Приклад 2

(Пошук у ресурсах генів)

Всесвітньо відомі ресурси генів ячменю (місцевого сорту), що зберігаються в Okayama University, досліджували з використанням способу AfaI. У результаті були виявлені п'ять нових ліній (SBOU1, SBOU3, SBOU4, SBOU5 і SBOU6, що зберігаються в Okayama University), які не розщеплялися в сайті рестриктази AfaI, що містить донорний сайт сплайсинга 5-го інтрона (нуклеотиди 60-63 SEQ ID NO:1: 5'GTAC-3')(Фіг.12).

Активність LOX-1 насіння цих ліній вимірювали за способом, описаним у тесті 1 пошуку. Вимірювання активності для SBOU5 і SBOU6 проводили реакцією протягом 5 хвилин (Фіг.13A), тоді як вимірювання активності для SBOU1, SBOU3 і SBOU4 проводили з подовженим часом реакції 90 хвилин для точної ідентифікації активності (Фіг.13B). У результаті в жодній з цих ліній не була виявлена значуща активність (Фіг.13).

Це ясно продемонструвало, що SBOU2, а також SBOU1, SBOU3, SBOU4, SBOU5 і SBOU6 (LOX-1-недостатній ячмінь типу SBOU2) були лініями ячменю, позбавленими LOX-1. Оскільки всі ці лінії є місцевими сортами (створеними поліпшувачим відбором), а не штучно мутагенізованими лініями, вони представляють спонтанні мутанти гена LOX-1.

Вищеописані результати показали, що спосіб AfaI, як приклад способу відбору ячменю з використанням мутації ДНК, є способом, що робить можливим не тільки відбір ліній потомства LOX-1-недостатнього ячменю, але також ефективний відбір LOX-1-недостатнього ячменю з генних ресурсів ячменю.

Приклад 3

(Вирощування ячменю для випробування варіння напоїв)

Сорт ячменю Taishotugi схрещували з SBOU2 і отримане перше дочірнє покоління (F1) самозапилювали для отримання покоління F2. Ознаку недостатності LOX-1 підтверджували за допомогою способу вимірювання активності ферменту LOX-1, описаного в тесті пошуку 1 і за допомогою способу AfaI, описаного в тесті верифікації 9 вище, і групу LOX-1-недостатніх ліній і групу LOX-1-зберігаючих ліній забезпечували у вигляді популяцій для розмноження насіння, як описано нижче.

Розмноження насіння проводили для кожної лінії (популяції) з використанням одноманітної ділянки або оранжереї, доки не отримували насіння F4. При визначенні активності ферменту LOX-1 насіння F4 було

виявлено, що відповідні ознаки активності LOX-1 індивідумів F2 зберігалися, що свідчить про те, що ознака недостатності LOX-1 стабільно передається потомству.

Насіння F4 використовували для наступного випробування отримання солоду і випробування отримання солодових алкогольних напоїв.

Приклад 4

(Отримання солоду для випробування варіння напоїв)

Отримували популяцію F4 LOX-1-недостатнього ячменю (LOX-F4), що містить насіння ячменю, яке не має активності LOX-1, і популяцію F4, що зберігає активність LOX, (LOX+F4), з насіння ячменю з LOX-1, причому обидві популяції походили зі схрещування Taishomugi × SBOU2, і використовували їх для отримання солоду.

Отримання солоду проводили з використанням Automatic Micromalting System (Phoenix Systems) в умовах з температурою замочування 16°C протягом загалом 82 годин (цикл 5год. водяне замочування/7год. сухий стан), пророщування при 15°C протягом 139 годин і пічного сушіння протягом 29 годин (55°C протягом 13,5 годин, 65°C протягом 8 годин, 75°C протягом 3,5 годин, 83°C протягом 4 годин).

Приклад 5

(Аналіз солоду і конгресного сусла)

Солод аналізували відповідно до стандартного способу EBC [European Brewery Convention ed., Analytica EBC (4th Ed.), 1987]. У результаті, не виявляли значущої відмінності в результатах аналізу солоду між солодами, що використовують LOX-F4 і LOX+F4, що свідчить про те, що вони можуть бути використані для варіння солодових алкогольних напоїв з метою порівняння присутності або відсутності активності LOX-1 (Фіг.14).

Потім, 50г цього солоду використовували для отримання сусла відповідно до стандартного конгресного способу [European Brewery Convention ed., Analytica EBC (4th Ed.), 1987] та аналізували окислення ліпідів в конгресному суслі.

Спочатку вимірювали кількість транс-2-ноненалю в конгресному суслі за наступним способом. Пробу сусла 8мл вміщували у флакон, додавали 3г NaCl і флакон закривали кришкою. Потім у верхній простір цього флакона вставляли полідиметилсилоксанове волокно SPME (Supelco, Inc.) і флакон інкубували при 40°C протягом 15 хвилин.

Потім це волокно вставляли в інжекційний отвір приладу для газової хроматографії/мас-спектрометрії, обладнаного колонкою J&W DB-1 як капілярною колонкою (30м×0,25мм, товщина плівки: 1мкм). Як газ-носії використовували гелій (1мл/хв) і умови печі були 60°C-225°C (5°C за хвилину), у режимі відбору іонів (m/z: 70). Кількісне визначення виконували стандартним способом з використанням транс-2-ноненалю (Sigma) як стандартної проби.

У результаті, концентрації транс-2-ноненалю конгресних сусел, що отримуються з використанням LOX-F4 і LOX+F4, були 0,36млд.ч. (мільярдних часток) і 3,85млд.ч. (мільярдних часток), відповідно. Таким чином, було показано, що утворення сусла з використанням солоду відповідно до даного винаходу робить можливим таке інгібування утворення транс-2-ноненалю, як 1/10 або менше звичайного сусла.

Потенціал ноненалю конгресного сусла вимірювали наступним способом. Спочатку конгресне сусло кип'ятили протягом 2 годин за способом Drost et al. [Drost, B.W. van den Berg, R., Freijee, F.J.M., van der Velde, E.G., and Hollemans, M., J. Am. Soc. Brew. Chem., 48, 124-131, 1990]. Потім кількість транс-2-ноненалю в пробі вимірювали за способом вимірювання транс-2-ноненалю, описаним вище, і розраховували потенціал ноненалю конгресного сусла.

У результаті потенціали ноненалю конгресних сусел, що використовують LOX-F4 і LOX+F4, були 2,74млд.ч. (мільярдних часток) і 11,9млд.ч. (мільярдних часток), відповідно. Оскільки потенціал ноненалю відомий як показник старіння продукту [Drost, B.W., et al., J. Am. Soc. Brew. Chem., 48, 124-131, 1990; Ueda et al. (2001) EBC-proceedings 55:p3 28th Congress], солод, отриманий з ячменю відповідно до даного винаходу, може бути використаний для варіння солодових алкогольних напоїв для значного поліпшення стабільності смаку солодових алкогольних напоїв.

Концентрації транс-2-ноненалю і потенціали ноненалю в конгресних суслах, отриманих з використанням LOX-F4, показані на Фіг.15 у порівнянні з концентраціями і потенціалами транс-2-ноненалю, отриманими з використанням комерційно доступного солоду. Як видно з результатів, показаних на Фіг.15, сусла даного винаходу виявляли величини, які не були такими, що досягаються зі звичайним ячменем.

Ці результати показали, що використання ячменю відповідно до даного винаходу дозволяє отримувати солод з поліпшеним рівнем якості, що не виявляється зі звичайними продуктами.

Концентрації THOD конгресних сусел вимірювали, використовуючи метод вискоефективної рідинної хроматографії-мас-спектрометрії (BPM-MS). Умови BPM були наступними. Швидкість струму рухомої фази була 0,3мл/хв, з використанням змішаного розчину 0,5% оцтової кислоти (Розчину А) і ацетонітрилу (розчину В) як рухомої фази, з лінійним градієнтом розчин А:розчин В=35:65 (0хв.) - розчин А:розчин В=5:95 (30хв.). Використовували колонку Waters Asymmetry column (No. 106005; C18, 3,5mkm: 2,1×150мл), температура колонки була 50°C, і використовували систему Model 1100 HPLC (Hewlett-Packard) для відділення проби 5мл сусла або солодових алкогольних напоїв. Аналіз маси виконували з використанням Waters ZQ, з моніторингом маси 329 в негативному режимі електророзпилюючої (ES) іонізації. Початковим стандартним розчином THOD була проба екстракту пива [Kobayashi, N., et al., J. Biosci. Bioeng., 90, 69-73, 2000].

У результаті, концентрації THOD конгресних сусел, що використовують LOX-F4 і LOX+F4, були 6,5млд.ч. (мільярдних часток) і 14,7млд.ч. (мільярдних часток), відповідно, що демонструє можливість інгібування концентрації THOD сусла до ½ або до більш низької концентрації при отриманні сусла з використанням солоду відповідно до даного винаходу.

Як згадувалося вище, THOD утворюється перетворенням з лінолевої кислоти під дією LOX-1 солоду і пероксигеназної активності солоду на стадії затирання, але оскільки, як вважають, активність пероксигенази солоду є стадією для утворення THOD, що обмежує швидкість [Kuroda, H., et al., J. Biosci. Bioeng., 93, 73-77, 2002], не було ясно, до якої міри зменшена активність LOX-1 інгібує утворення THOD. Однак результати в

прикладях, забезпечених в даному описі, показали, що використання солоду, отриманого з насіння ячменю без активності LOX-1, зменшує концентрацію THOD в суслі. Оскільки THOD присутній до кінцевого продукту, не метаболізуючись дріжджами [Kobayashi, N., et al., J. Inst. Brew., 106, 107-110, 2000], використання солоду, отриманого з ячменю відповідно до даного винаходу, може явно призводити до отримання солодових алкогольних напоїв з хорошими якістю смаку і стійкістю піни.

Приклад 6

(Випробування варіння солодових алкогольних напоїв)

1. Отримання та аналіз суслу

Солод LOX-F4 і солод LOX+F4, отриманий у прикладі 4 вище, зтирали з використанням заторного апарату 50-літрового масштабу відповідно до стандартних способів затирання для Harposhu, алкогольного напою з низьким вмістом солоду (вміст солоду: 24%). Умови затирання були наступними.

Зтирали 1,5кг кожного солоду окремо з 15л заторної води відповідно до схеми 50°C протягом 20хв., 65°C протягом 30хв. і 75°C протягом 3хв. Після затирання проводили фільтрування пивного суслу з використанням фільтрувального чана. Отримували 35л відфільтрованих сусел.

Перед кип'ятінням відфільтроване сусло змішували з 5кг крохмального сиропу (75% сахаридів). До суслу додавали 13г гранул хмелю (87,0 BU (одиниць гіркоти) (EBC)). Після кип'ятіння протягом 70 хвилин переварене сусло охолоджували до 10°C. Вміст екстракту охолоджених сусел доводили додаванням води до 11,6-11,8%.

Отримані суслу аналізували відповідно до стандартних способів EBC [European Brewery Convention ed., Analytica EBC (4th Ed.), 1987]. Результати аналізу показані в таблиці 1. Як видно з таблиці 1, не було виявлено чіткої відмінності між LOX-F4 і LOX+F4 відносно цих показників.

Таблиця 1

Сорт	LOX+F4	LOX-F4
Питома вага (відносна щільність)	1,0475	1,0467
Екстракт (%)	11,78	11,60
Дійсний неферментований екстракт (%)	3,45	3,38
Дійсне зброджування (%)	70,7	70,9
Уявний неферментований екстракт (%)	1,54	1,52
Межа уявного зброджування (%)	86,9	86,9
pH	5,88	5,93
Колір (°EBC)	2,1	2,1
BU (одиниці гіркоти)	31,2	27,3
Загальний азот (мг/100мл)	24	22
Поліфенол (мг/л)	44	48
FAN (мг/л)	46	51

2. Отримання солодового алкогольного напою (Harposhu, алкогольного напою з низьким вмістом солоду)

Сусло, отримане вище в 1, переносили в стерилізований парою циліндрично-конічний чан на 30л і потім додавали дріжджі до початкової концентрації 30 мільйонів клітин на мл для головного (власне) бродіння при 13°C. Коли вміст екстракту в рідині, що зброджується, падав до 2,5%, її переносили в новий подібний чан для стадії витримування. Стадію витримування проводили при 13°C протягом перших 6 днів і потім при 0°C протягом 2 тижнів після цього.

Після завершення стадії витримування зброджувану рідину подавали в апарат фільтрування і розливу пива. Солодовий алкогольний напій фільтрували і розливали в пляшки.

3. Аналіз солодового алкогольного напою

Солодовий алкогольний напій, отриманий вище в 2, аналізували таким чином.

Аналіз відповідно до стандартного способу EBC показує, що не було виявлено значущої відмінності між LOX-F4 і LOX+F4 відносно параметрів загального аналізу, інших, ніж параметри окислення ліпідів (таблиця 2).

Таблиця 2

Сорт	LOX+F4	LOX-F4
Питома вага (відносна щільність)	1,00562	1,00565
Початковий екстракт суслу (%)	11,82	11,56
Дійсний екстракт (%)	3,43	3,38
Дійсне зброджування (%)	71,0	70,7
Уявний екстракт (%)	1,44	1,45
Уявне зброджування (%)	87,8	87,4
Спирт (об.%)	5,5	5,35
Спирт (мас.%)	4,33	4,21
pH	3,51	3,28
Тиск газу (20°C) кг/см	2,35	2,55
Колір (°EBC)	1,5	1,7
Загальний азот (мг/100мл)	16	19
BU	11,6	9,5

Поліфенол (мг/л)	45	43
FAN (мг/л)	10	12

Стійкість піни солодового алкогольного напою, отриманого вище в 2, аналізували наступним способом.

Аналіз стійкості піни проводили за способом NIBEM. При аналізі стійкості піни з використанням тестера піностійкості Haffmans (таблиця 3) ячмінь LOX-F4 мав явно більш високу стійкість піни, причому величина NIBEM була на 21 бал вище, ніж у випадку ячменю LOX+F4.

Також, як і результат вимірювання концентрації THOD за способом, описаним у прикладі 5 вище, виявилось зменшення вмісту THOD LOX-F4 до менше, ніж половини вмісту THOD LOX+F4 (таблиця 3).

Ці результати ясно показали, що спосіб отримання солодових алкогольних напоїв даного винаходу дозволяють отримувати солодовий алкогольний напій зі зниженим вмістом THOD і поліпшеним збереженням піни.

Таблиця 3

Сорт	LOX+F4	LOX-F4
NIBEM	239	260
THOD (мг/л)	3,6	1,7

Потім солодовий алкогольний напій, отриманий вище в 2, піддавали наступному сенсорному аналізу, що виконується 13 членами комісії з оцінки якості харчових продуктів.

Спочатку солодові алкогольні напої LOX-F4 і LOX+F4 зберігали при 37°C протягом одного тижня. Потім їх наливали в чашки при звичайній температурі споживання напоїв і забезпечували сенсорний аналіз членами комісії з оцінки якості харчових продуктів для оцінки нестандартного смаку і загальної несвіжості по шкалі 0-4 (причому більш високий показник представляє прогресуюче старіння) (таблиці 4А, В).

У результаті 10 з 13 членів комісії дали більш низькі бали LOX-F4 відносно нестандартного смаку, і, отже, LOX-F4 виявляв більш низький бал (середнє), ніж LOX+F4. Було визначено, що ця відмінність відповідно до парного t-критерію є значущою при 5% ймовірності (таблиця 4А).

Відносно загальної несвіжості, 11 з 13 членів комісії дали більш низькі бали LOX-F4, і, отже, LOX-F4 виявляв більш низький бал (середнє), ніж LOX+F4. Було визначено, що ця відмінність відповідно до парного t-критерію є значущою при 5% ймовірності (таблиця 4В).

Описані вище сенсорний аналіз і статистичний аналіз показали, що LOX-F4 мав менші нестандартний смак і загальну несвіжість, ніж LOX+F4.

Таблиця 4А

Нестандартний смак	LOX+F4	LOX-F4
Член комісії 1	3	2
Член комісії 2	1	2
Член комісії 3	3	2
Член комісії 4	2,5	2,5
Член комісії 5	2	2
Член комісії 6	2,5	2
Член комісії 7	2,5	1,5
Член комісії 8	2,5	1
Член комісії 9	1	0,5
Член комісії 10	2,5	2
Член комісії 11	2	1,5
Член комісії 12	2,5	2
Член комісії 13	2	1,5
Середнє	2,2	1,7

Таблиця 4В

Загальна несвіжість, смак	LOX+F4	LOX-F4
Член комісії 1	2,5	2
Член комісії 2	1	2
Член комісії 3	3	2
Член комісії 4	3	2,5
Член комісії 5	2,5	2
Член комісії 6	2,5	2
Член комісії 7	2,5	1,5
Член комісії 8	2,5	1,5
Член комісії 9	1	0,5
Член комісії 10	2,5	2
Член комісії 11	2	1,5
Член комісії 12	2,5	2,5
Член комісії 13	2	1,5
Середнє	2,3	1,8

Внаслідок вимірювання вмісту транс-2-ноненалю солодового алкогольного напою, отриманого вище в 2, LOX-F4 мав більш низький вміст транс-2-ноненалю до і після зберігання при 37°C протягом одного тижня. Вміст транс-2-ноненалю LOX-F4 зменшувався до приблизно 1/3 у порівнянні з вмістом транс-2-ноненалю LOX+F4 після зберігання (таблиця 5).

Таблиця 5

Концентрація транс-2-ноненалю	LOX+F4	LOX-F4
Перед зберіганням	0,02	0,01
Після зберігання	0,35	0,12

(Одиниці: млд.ч.)

Ці результати сенсорного аналізу і результати аналізу вмісту транс-2-ноненалю в солодових алкогольних напоях показали, що спосіб отримання солодових алкогольних напоїв даного винаходу дозволяє отримувати солодові алкогольні напої з поліпшеною стабільністю смаку.

Нарешті, «тіло» (екстрактивність) та однорідність солодового алкогольного напою, отриманого вище в 2, аналізували сенсорним аналізом і з використанням ліпідної мембрани як датчика.

Спочатку сенсорний аналіз проводився 13 висококваліфікованими членами комісії для порівняння якості смаку. Солодові алкогольні напої LOX-F4 і LOX+F4 були забезпечені для сенсорного аналізу, а "тіло" (екстрактивність) й однорідність оцінювали за шкалою 0-4 (причому більш високі бали означають більш наповнене "тіло" і кращу однорідність) (таблиця 6).

Відносно "тіла" не було виявлено значущої відмінності (рівень ймовірності 5%) між LOX-F4 і LOX+F4 (таблиця 6A).

Що стосується однорідності, 8 з 13 членів комісії дали більш високі бали LOX-F4 (таблиця 6B). LOX-F4 мав більш високий бал (середнє), ніж LOX+F4, і було визначено, що відмінність відповідно до парного t-критерію була значущою при 5% рівні ймовірності.

Ці результати показали, що варіння солодових алкогольних напоїв з використанням LOX-F4 може поліпшувати однорідність без впливу на "тіло" (екстрактивність) напою.

Таблиця 6A

Тіло	LOX+F4	LOX-F4
Член комісії 1	2	1
Член комісії 2	3	2
Член комісії 3	3	2,5
Член комісії 4	3,5	3,5
Член комісії 5	3	3
Член комісії 6	2	2
Член комісії 7	2	2
Член комісії 8	3	2
Член комісії 9	3	2
Член комісії 10	2,5	2,5
Член комісії 11	3	2
Член комісії 12	2	3
Член комісії 13	2	3
Середнє	2,6	2,3

Таблиця 6B

Однорідність	LOX+F4	LOX-F4
Член комісії 1	1	2
Член комісії 2	1	3
Член комісії 3	1,5	3
Член комісії 4	3	3
Член комісії 5	1	1
Член комісії 6	2	2
Член комісії 7	2	3
Член комісії 8	1,5	3
Член комісії 9	1	2
Член комісії 10	1,5	2
Член комісії 11	2	3
Член комісії 12	3	2
Член комісії 13	3	2
Середнє	1,8	2,4

«Тіло» й однорідність оцінювали також з використанням ліпідної мембрани як датчика відповідно до способу Kaneda et al. [Kaneda, H. et al., J. Biosci. Bioeng., 92, 221-226, 2001] (таблиця 7).

«Тіло» оцінювали на основі адсорбції на ліпідну мембрану, і результати не показали значущої

статистичної відмінності (при 5% рівні ймовірності) між адсорбцією з LOX-F4 і LOX+F4 (таблиця 7А).

Однорідність оцінювали на основі тривалості адсорбції на ліпідну мембрану (з більш високою тривалістю адсорбції, що показує гіршу однорідність), і LOX-F4 виявляв залишок приблизно $\frac{1}{4}$ у порівнянні з LOX+F4 зі значущою відмінністю при рівні ймовірності 1% (таблиця 7В).

Таблиця 7А

Тіло	Адсорбція	Ст. відхилення
LOX+F4	189	4
LOX-F4	187	3

(Одиниці: Гц)

(Немає значущої відмінності при рівні ймовірності 5%)

Таблиця 7В

Однорідність	Залишок	Ст. відхилення
LOX+F4	12	3
LOX-F4	3	3

(Одиниці: Гц)

(Значуща відмінність при рівні ймовірності 1%)

Досі не була виявлена кореляція між активністю LOX-1 і рівнями утворення THOD ячменю в стадіях затирання [Kobayashi, N. et al., (2000), J. Biosci. Bioeng. 90:69-73], і було неясно, до якої міри утворення THOD зменшується інгібуванням LOX-1 ячменю. Крім того, у попередньому рівні техніки було неможливо передбачити, чи може однорідність посилюватися внаслідок такого інгібування LOX-1 ячменю. Однак результати сенсорного аналізу та аналіз «тіла» й однорідності продукту з використанням ліпідної мембрани як датчика в прикладах, наведених у даному описі, показали вперше, що ячмінь, який містить заявлений тут ген, може бути використаний для збільшення однорідності продукту без впливу на «тіло» продукту.

Приклад 7

(Випробування варіння солодових алкогольних напоїв з використанням обробленого ячменю)

1. Отримання та аналіз сусла

З використанням обробленого ячменю LOX-F5 і LOX+F5, наступних поколінь ліній, отриманих у прикладі 3 вище, додаткове затирання проводили з використанням заторного апарату в масштабі 50л відповідно до стандартних способів затирання для Happoshu, солодового алкогольного напою з низьким вмістом солоду (вміст солоду: 24%, вміст обробленого ячменю: 76%). Умови затирання були наступними.

1,2кг комерційно доступного солоду для варіння і 3,8кг кожного обробленого ячменю затирали з 20л заторної води відповідно до схеми: 50°C протягом 30хв., 65°C протягом 60хв. і 75°C протягом 3хв. (додавали ферменти, такі як α -амілаза та β -глюканазу, внаслідок високого вмісту обробленого ячменю). Після затирання проводили фільтрування сусла з використанням фільтрувального чана. Отримували 40л відфільтрованих сусел.

В отримані відфільтровані сусла додавали 53г гранул хмелю (одиниці гіркоти: 25,6 BU (ЕВС)). Після кип'ятіння протягом 80 хвилин переварене сусло охолоджували до 10°C. Вміст екстракту охолоджених сусел доводили додаванням води до 7,5-7,6%.

Отримані сусла аналізували відповідно до стандартних способів ЕВС. Величини аналізу показані в таблиці 8. Як видно в таблиці 8, не було виявлено чіткої відмінності між LOX-F5 і LOX+F5 відносно цих показників.

Таблиця 8

Сорт	LOX+F5	LOX-F5
Питома вага (відносна щільність)	1,0303	1,0296
Екстракт (%)	7,63	7,46
Дійсний неферментований екстракт (%)	2,00	2,06
Дійсне зброджування (%)	73,8	72,4
Уявний неферментований екстракт (%)	0,67	0,71
Межа уявного зброджування (%)	91,2	90,5
РН	5,69	5,71
Колір (°ЕВС)	5,7	6,5
BU (одиниці гіркоти)	31,7	30,9
Загальний азот (мг/100мл)	45	47
Поліфенол (мг/л)	159	137
FAN (мг/л)	72	72

2. Отримання солодового алкогольного напою (Happoshu, алкогольного напою з низьким вмістом солоду)

Сусло, отримане вище в 1, переносили в стерилізований парою циліндрично-конічний чан на 30л і потім додавали дріжджі до початкової концентрації 30 мільйонів клітин на мл для головного (власне) бродіння при 15°C. Коли вміст екстракту в зброджуваній рідині падав до 1,3%, її переносили в новий подібний чан для стадії витримування. Стадію витримування проводили при 13°C протягом перших 5 днів і потім при 0°C протягом 2 тижнів після цього.

Після завершення стадії витримування зброджувану рідину подавали в апарат фільтрування та розливу пива. Солодовий алкогольний напій фільтрували і розливали в пляшки.

3. Аналіз солодового алкогольного напою

Солодовий алкогольний напій, отриманий вище в 2, аналізували таким чином.

Аналіз відповідно до стандартного способу ЕВС показує, що не було виявлено значущої відмінності між LOX-F5 і LOX+F5 відносно параметрів загального аналізу, інших, ніж параметри окислення ліпідів (таблиця 9).

Таблиця 9

Сорт	LOX+F5	LOX-F5
Питома вага (відносна щільність)	1,00307	1,00338
Початковий екстракт сусла	7,77	7,60
Дійсний екстракт (%)	2,11	2,14
Дійсне зброджування (%)	73,7	72,7
Уявний екстракт (%)	0,79	0,87
Уявне зброджування (%)	89,9	88,6
Спирт (об.%)	3,62	3,49
Спирт (мас.%)	2,86	2,75
pH	4,58	4,59
Тиск газу (20°C), кг/см	2,29	2,38
Колір (°ЕВС)	4,0	4,2
Загальний азот (мг/100мл)	28	27
BU (одиниці гіркоти)	16,8	15,3
Поліфенол (мг/л)	111	91
FAN (мг/л)	16	16

Стойкість піни солодового алкогольного напою, отриманого вище в 2, аналізували наступним способом.

Аналіз стійкості піни проводили за способом NIBEM. При аналізі стійкості піни з використанням тестера піностійкості Haffmans (таблиця 10) ячмінь LOX-F5 мав явно більш високу стійкість піни, причому величина NIBEM була на 17 балів вище, ніж у випадку ячменю LOX+F5.

Також, як і результат вимірювання концентрації THOD за способом, описаним у прикладі 5 вище, виявлялося зменшення вмісту THOD солодового алкогольного напою LOX-F5 до менше, ніж половини вмісту THOD LOX+F5.

Ці результати ясно показали, що спосіб отримання солодових алкогольних напоїв даного винаходу дозволяє отримувати солодовий алкогольний напій зі зниженим вмістом THOD і поліпшеним збереженням піни.

Таблиця 10

Сорт	LOX+F5	LOX-F5
NIBEM	279	296
THOD (відношення площ піків)	728	237

Ці величини THOD показують відносні величини, де площі піків внутрішнього стандарту дорівнюють 100.

Потім солодовий алкогольний напій, отриманий вище в 2, піддавали наступному сенсорному аналізу, що виконується 13 членами комісії з оцінки якості харчових продуктів. Конкретний спосіб цього сенсорного аналізу є таким самим, як описаний у прикладі 6.

У результаті 11 з 13 членів комісії дали більш низькі бали LOX-F5 відносно нестандартного смаку, і, отже, LOX-F 5 виявляв більш низький бал (середнє), ніж LOX+F5. Було визначено, що ця відмінність відповідно до парного t-критерію є значущою при 5% ймовірності (таблиця 11A).

Відносно загальної несвіжості, 12 з 13 членів комісії дали більш низькі бали LOX-F5, і, отже, LOX-F5 виявляв більш низький бал (середнє), ніж LOX+F5. Було визначено, що ця відмінність відповідно до парного t-критерію є значущою при 5% ймовірності (таблиця 11B).

Описані вище сенсорний аналіз і статистичний аналіз показали, що LOX-F5 мав менші нестандартний смак і загальну несвіжість, ніж LOX+F5.

Таблиця 11A

Нестандартний смак	LOX+F5	LOX-F5
Член комісії 1	2	1,5
Член комісії 2	3	2
Член комісії 3	3	2
Член комісії 4	2	1,5
Член комісії 5	3	2

Член комісії 6	2	1
Член комісії 7	2,5	3
Член комісії 8	2	1
Член комісії 9	2,5	2
Член комісії 10	2	1
Член комісії 11	3	2
Член комісії 12	2,5	1,5
Член комісії 13	2	3
Середнє	2,4	1,8

Таблиця 11В

Загальна несвіжість, смак	LOX+F5	LOX-F5
Член комісії 1	2	1,5
Член комісії 2	3	1
Член комісії 3	3,5	1,5
Член комісії 4	2	1,5
Член комісії 5	3	2
Член комісії 6	2	1
Член комісії 7	2,5	3
Член комісії 8	2	1
Член комісії 9	3	2
Член комісії 10	2	1
Член комісії 11	3	2
Член комісії 12	2,5	1,5
Член комісії 13	3	1,5
Середнє	2,6	1,6

Внаслідок вимірювання вмісту транс-2-ноненалю солодового алкогольного напою, отриманого вище в 2, до і після зберігання при 37°C протягом одного тижня LOX-F5 мав схожий вміст транс-2-ноненалю в порівнянні з LOX+F5 перед зберіганням. Вміст транс-2-ноненалю LOX-F5 зменшувався до приблизно ½ у порівнянні із вмістом транс-2-ноненалю LOX+F5 після зберігання (таблиця 12).

Таблиця 12

Концентрація транс-2-ноненалю	LOX+F5	LOX-F5
Перед зберіганням	0,06	0,06
Після зберігання	0,16	0,09

Одиниця: (млд. ч.)

Приклад 8.

(Випробування варіння солодових алкогольних напоїв)

1. Отримання й аналіз суслу

Солод LOX-F4 і LOX+F4, отриманий за способом, описаним у прикладі 4, зтирали з використанням заторного апарату 50-літрового масштабу відповідно до стандартних способів затирання для пива (вміст солоду: 71%). Умови затирання були наступними.

5,0кг кожного випробуваного солоду, вказаного вище, і 2,0кг домішки (кукурудзяного крохмалю, кукурудзяної крупи та дробленого рису) зтирали з 23л заторної води відповідно до схеми: 50°C протягом 20хв., 65°C протягом 40хв. і 75°C протягом 3хв. Після затирання проводили фільтрування пивного суслу з використанням фільтрувального чана. Отримували 40л відфільтрованих сусел.

До отриманих відфільтрованих сусел додавали 40г гранул хмелю (44,9 BU (одиниць гіркоти) (ЕВС)). Після кип'ятіння протягом 90 хвилин переварене сусло охолоджували до 10°C. Вміст екстракту охолоджених сусел доводили додаванням води до 10,8-11,1%.

Отримані суслу аналізували відповідно до стандартних способів ЕВС. Результати аналізу показані в таблиці 13. Як видно з таблиці 13, не було виявлено чіткої відмінності між LOX-F4 і LOX+F4 відносно цих показників.

Таблиця 13

Сорт	LOX+F4	LOX-F4
Питома вага (відносна щільність)	1,0444	1,0433
Екстракт (%)	11,05	10,79
Дійсний неферментований екстракт (%)	3,05	3,05
Дійсне зброджування (%)	72,4	71,7
Уявний неферментований екстракт (%)	1,25	1,31
Межа уявного зброджування (%)	88,7	87,9
РН	5,71	5,68

Колір (°EBC)	6,3	6,5
BU (одиниці гіркоти)	38,0	38,2
Загальний азот (мг/100мл)	77	78
Поліфенол (мг/л)	150	147
FAN (мг/л)	153	148

2. Отримання солодового алкогольного напою (пива)

Сусло, отримане вище в 1, переносили в стерилізований парою циліндрично-конічний чан на 30л і потім додавали дріжджі до початкової концентрації 15 мільйонів клітин на мл для головного (власне) бродіння при 10,5°C. Коли вміст екстракту в зброджуваній рідині падав до 2,5%, її переносили в новий подібний чан для стадії витримування. Стадію витримування проводили при 8°C протягом перших 8 днів і потім при 0°C протягом подальших 2 тижнів.

Після завершення стадії витримування зброджувану рідину подавали в апарат фільтрування і розливу пива. Солодовий алкогольний напій фільтрували і розливали в пляшки.

3. Аналіз солодового алкогольного напою

Стійкість піни солодового алкогольного напою, отриманого вище в 2, аналізували наступним способом. Аналіз стійкості піни проводили за способом NIBEM. При аналізі стійкості піни з використанням тестера піностійкості Naffmans (таблиця 14) ячмінь LOX-F4 показав явно більш високу стійкість піни, причому величина NIBEM була на 30 балів вище, ніж у випадку ячменю LOX+F4.

Також, як і результат вимірювання концентрації THOD за способом, описаним у прикладі 5 вище, виявлялося зменшення вмісту THOD у солодовому алкогольному напої LOX-F4 до менше, ніж половини вмісту THOD LOX+F4.

Ці результати ясно показали, що спосіб отримання солодових алкогольних напоїв даного винаходу дозволяє отримувати солодовий алкогольний напій зі зниженим вмістом THOD і поліпшеним збереженням піни.

Таблиця 14

Сорт	LOX+F4	LOX-F4
NIBEM	273	303
THOD (відношення площ піків)	499	221

Величини THOD показані у вигляді відносних величин, де площі піків внутрішнього стандарту дорівнюють 100.

Потім солодовий алкогольний напій, отриманий вище в 2, піддавали наступному сенсорному аналізу, що виконується 13 членами комісії з оцінки якості харчових продуктів. Конкретний спосіб цього сенсорного аналізу є таким самим, як описаний у прикладі 6.

У результаті 11 з 13 членів комісії дали більш низькі бали LOX-F4 відносно нестандартного смаку, і, отже, LOX-F4 виявляв більш низький бал (середнє), ніж LOX+F4. Було визначено, що ця відмінність відповідно до парного t-критерію є значущою при 5% ймовірності (таблиця 15A).

Відносно загальної несвіжості, 12 з 13 членів комісії дали більш низькі бали LOX-F4, і, отже, LOX-F4 виявляв більш низький бал (середнє), ніж LOX+F4. Було визначено, що ця відмінність відповідно до парного t-критерію є значущою при 5% ймовірності (таблиця 15B).

Описані вище сенсорний аналіз і статистичний аналіз показали, що LOX-F4 мав менші нестандартний смак і загальну несвіжість, ніж LOX+F4.

Таблиця 15A

Нестандартний смак	LOX+F4	LOX-F4
Член комісії 1	2,5	2
Член комісії 2	3	3,5
Член комісії 3	3,5	2
Член комісії 4	2,5	2
Член комісії 5	1,5	1
Член комісії 6	3	1
Член комісії 7	2,5	3
Член комісії 8	3	2
Член комісії 9	2	1,5
Член комісії 10	2	1
Член комісії 11	3	1,5
Член комісії 12	1,5	1
Член комісії 13	2	1
Середнє	2,5	1,7

Таблиця 15B

Загальна несвіжість, смак	LOX+F4	LOX-F4
Член комісії 1	3	2
Член комісії 2	3	3,5
Член комісії 3	3	1,5

Член комісії 4	2,5	2
Член комісії 5	1,5	1
Член комісії 6	3	1
Член комісії 7	3	2,5
Член комісії 8	3	2
Член комісії 9	2	1
Член комісії 10	2	1
Член комісії 11	3	1
Член комісії 12	1,5	1
Член комісії 13	2	1
Середнє	2,5	1,6

Ці результати сенсорного аналізу і результати аналізу вмісту транс-2-ноненалю в солодових алкогольних напоях показали, що спосіб отримання солодових алкогольних напоїв даного винаходу дозволяє отримувати солодові алкогольні напої з поліпшеною стабільністю смаку.

Може бути забезпечене наступне: мутантний ген, який є застосовним для отримання солодових алкогольних напоїв, що виявляють поліпшені стабільність смаку і стійкість піни, без маніпулювання генами, спосіб відбору LOX-1-недостатнього ячменю, матеріали для солодових алкогольних напоїв, що походять з ячменю, отриманого цим способом відбору, і спосіб отримання солодових алкогольних напоїв з використанням цих матеріалів для солодових алкогольних напоїв.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> SAPPORO BREWERIES LTD.

<120> Ген ліпоксигенази-1 ячменю, спосіб відбору ячменю, матеріали для солодових алкогольних напоїв і спосіб отримання солодових алкогольних напоїв

<130> FP04-0052

<150> JP 2003-083924

<151> 2003-03-25

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 240

<212> ДНК

<213> Hordeum vulgare

<400> 1

```
ctcgccaagg cctacgtcgc cgtcaatgac tcggggtggc accagctcgt cagccactgg    60
tacgttctcc acggtcgatg tgattcagtc agtcgatgca caacaactga tcgaaatatg    120
attgattgaa acgcgcaggc tgaacactca cgcggtgatg gagccgttcg tgatctcgac    180
gaaccggcac cttagcgtga cgcacccggg gcacaagctg ctgagcccgcc actaccgcga    240
```

<210> 2

<211> 240

<212> ДНК

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

```
ctcgccaagg cctacgtcgc cgtcaatgac tcggggtggc accagctcgt cagccactga    60
```

tacgttctcc acggtcgatg tgattcagtc agtcgatgca caacaactga tcgaaatatg 120
attgattgaa acgcgcaggc tgaacctca cgcggtgatg gagccgttcg tgatctcgac 180
gaaccggcac cttagcgtga cgcaccgggt gcacaagctg ctgagcccg c actaccgca 240

<210> 3

<211> 24

<212> ДНК

<213> Синтетична

<220>

<223> праймер

<400> 3

ggagaggagg ccaagaaca gatg 24

<210> 4

<211> 19

<212> ДНК

<213> Синтетична

<220>

<223> праймер

<400> 4

ggttgccgat ggcttagat . 19

<210> 5

<211> 21

<212> ДНК

<213> Синтетична

<220>

<223> праймер

<400> 5

cacgtcgccg tccgatccat c 21

<210> 6

<211> 20

<212> ДНК

<213> Синтетична

<220>

<223> праймер

<400> 6

ccatcacgca gggatccctg 20

<210> 7

<211> 20

<212> ДНК

<213> Синтетична

<220>

<223> праймер

<400> 7

gcgttgatga gcgtctgccg 20

<210> 8

<211> 24

<212> ДНК

<213> Синтетична

<220>

<223> праймер для LOX-1 з сайтом BamHI

<400> 8

ggatccatgc tgctgggagg gctg 24

<210> 9

<211> 25

<212> ДНК

<213> Синтетична

<220>

<223> праймер для LOX-1 з сайтом HindIII

<400> 9

aagcttttag atggagatgc tgttg 25

<210> 10

<211> 2668

<212> ДНК

<213> Hordeum vulgare

<400> 10

atgctgctgg gagggctgat cgacacctc acggggcgca acaagagcgc ccggctcaag 60

ggcacggtgg tgctcatgcg caagaacgtg ctggacctca acgacttcgg cgccaaccatc 120

atcgacggca tcggcgagtt cctcggcaag ggcgtcacct gccagcttat cagctccacc 180

ycgcgtcgacc aagacaacgg cggtcgcggg aaggtgggcg cggagggcga gctggagcag 240

tgggtgacga gctgcccgtc gctgacgacg ggggagtcca agttcggcct caccctcgac 300

tgggaggtgg agaagctcgg ggtgccggcg gccatcgtcg tcaacaacta ccacagctcc 360

gagttcctgc ttaaaacat caccctccac gacgtccccg gccgcagcgg caacctcacc 420

ttcgtcgcca actcatggat ctaccccgc gccaaactacc gatacagcgg cgtcttcttc 480

gccaaacgaca cgtacctgcc gagccagatg ccggcggcgc tgaagccgta ccgcgacgac 540

gagctccgga acctgctgg cgacgaccag cagggccctg accaggagca cgaccgcac 600

taccgctacg acgtctacaa cgacctcggc gagggccgcc ccatcctcgg cggcaactcc 660

gaccaccttt acccgcgcgg cggccgcacg gagcgcaagc ccaacgcacg cgaccgcgac 720

ctggagagcc ggtgtcgtc gctggagcag atctacgtgc cgcgggacga gaagtccggc 780

caactcaaga cgtccgactt cctgggtac tccatcaagg ccatcacgca gggcatcctg 840

ccggcgtgc gcacctacgt ggacaccacc cccggcgagt tcgactcctt ccaggacatc 900

atcaacctct atgagggcgg catcaagctg cccaaggtgg ccgccctgga ggagctccgt 960

aagcagttcc cgtccagct catcaaggac ctctccccc tcggcgcgca ctccctgctt 1020

aagctcccc tgccccacat catccaggag aacaagcagg cgtggaggac cgacgaggag 1080

ttcgcacggg aggtgctcgc cggcgtcaac ccggtcatga tcacgcgtct caccgagttc 1140

ccgccaaaaa gtagtctgga cctagcaag ttgtgtgacc acaccagcac catcacggcg 1200

gagcacatag agaagaacct cgagggcctc acggtgcagc aggcgctgga aagcaacagg 1260

ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc atgcggttcc tgatcgacgt caacaacctg 1320

cccgcaact tcatctacgc caccgagacc ctctcttccc tgcgcggcga cggcaggctc 1380

acgcgcctcg ccatcgagct gagcgagccc atcatccagg gccgccttac caccgccaaag 1440

agcaaggttt acacgccggt gccacggcg tccgtcgaag gctgggtgtg ggaactcgcc 1500

aaggcctacg tcgcgctcaa tgactccggg tggcaccaag tcgtcagcca ctgatacgtt 1560

ctccacgggc gatgtgattc agtcagtcca tgcacaacaa ctgacgaaa tatgattgat 1620

tgaacgcgc aggtgaaca ctacgcggt gatggagccg ttctgtatct cgacgaaccg 1680

gcaacttagc gtgacgcacc cggtcacaaa gctgtgagc ccgcaactacc gcgacaccat 1740

gaccatcaac cgcgtggcgc gccagacgct catcaacgcc ggccgcatct tcgagatgac 1800

ggtgttcccc ggcaagttcg cgttggggat gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt 1860

caccgagcag ggaactccgg acgatctcat caagaggggc atggcggtgg aggaaccgtc 1920

gagcccgtag aaggtgcggt tgctgggtgc ggaactaccg tacgcggcgg acgggctggc 1980

gatctggcac gccattgagc agtacgtgag cgaatacctg gccatctact accgaacga 2040

cggcgtgctg cagggcgata cggaggtgca ggcgtggtgg aaggagacgc gcgaggtcgg 2100

gcacgcgcac ctcaaggacg ccccatggtg gcccaagatg caaagtgtgc cggagctggc 2160

caaggcgtgc accaccatca tctggatcgg gtcggcgcgt catgcggcag tcaacttcgg 2220

gcagtacccc tacgcggggt tctcccgaa ccggcgcacg gtgagcggcg gccgcatgcc 2280

ggagcccgcg acggagaggt acgcggagct ggagcgcgac ccggagcggg ccttcaccca 2340

caccatcacg agccagatcc agaccatcat cggcgtgtcg ctgctggagg tgotgtcgaa 2400

gcactcctcc gacgagctgt acctcgggca gccgggacag ccggagtgga cctcggaccc 2460

aaaggccctg gaggtgttca agcgggttcag cgacgggctg gtggagatcg agagcaaggt	2520
ggtgggcatg aacctgacc cggaggtcaa gaaccgcaac ggcccgcta agtttcccta	2580
catgctgctc taccceaca cctccgacca caaggggccc gctgccgggc ttaccgcaa	2640
gggcaccccc aacagcatct ccatctaa	2668

<210> 11

<211> 4393

<212> ДНК

<213> Hordeum vulgare

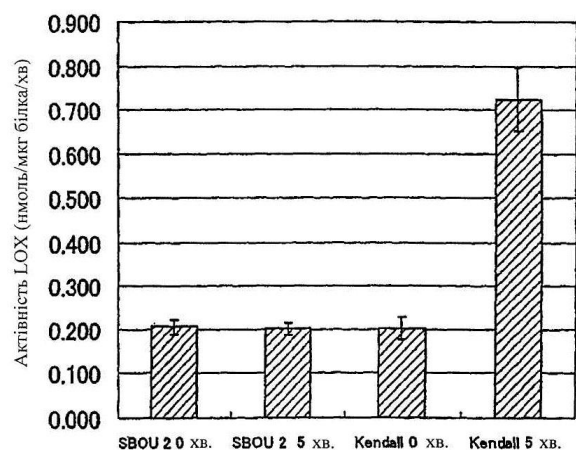
<400> 11

cacgtcgccg tccgatccat ctctccaaag ccgagcgcca caccaccggg accggaccgg	60
gaccggccta taaattgccc ggaccgagct gcaagcagct cctcacacac actcacgcaa	120
cacacatcca tcttcactga aaagtgaaaa acagtgtgct ggtgccattg gttggagcag	180
tgaagcgag gagaggaggc caagaacaa atgctgctgg gaaggctgat cgacaccctc	240
acggggcgca acaagagcgc ccggtcgaag ggcacggtgg tgcctatgct caaagaactg	300
ctggacctca acgacttcgg cgcaccatc atcgacggca tcggcgagtt cctcggaag	360
ggcgtaacct gccagcttat cagctccacc gccgtcgacc aaggtaatca ctaccctct	420
ccggccttct cctctgttta caagatatag tattctcttc gtgtggggcg gcggccatgg	480
atggatggat gtgtctggat cggctaaaga agataggata gctagccctg gccggctctc	540
tttacctgag catgggcata tgccatcgaa aaaagagaca acagcatgca tgcattgctc	600
gcgcaccaga ccacgcagag caccggatgc tcgagacaaa gcaacacaa acgcaaggac	660
gacacgtcaa aagcaacaca acaagcaagg acggcacgtc aaaagcaaca caaacctaaa	720
ctaaagcaca aagacgttaag agcaagcaca caatcagcag gctataaaca gttgtcatca	780
aaaacaacgc tgaagagag agagaaggaa ggaagttaga gccatgaaaa attaaatcac	840
cggcggttgc tctttgcccc acaattaatc aagcagggta cgtggcatgt atagtctctg	900
taagttaaac tagcatgta tatgagaagg tacgtggtgg tcgagacaa gcgggtc>g	960
ggaagtgagg cggcgaggcg gagctggagc agtgggtgac gagcctgccc tcgctgacga	1020
cgggggagtc caagttcggc ctcaccttcg actgggaggt ggagaagctc ggggtgcccg	1080
gcgccatcgt cgtcaaacac taaccagctc ccgagttcct gcttaaaacc atcacctccc	1140
acgacgtccc cggccgcagc ggcaaacctca ccttcgtcgc caactcatgg atctacccc	1200
ccgccaaacta ccgatacagc ccggtctctc tcgocaaaga cgtgcgtgga ttttctctca	1260
ctttctctct ctttcatctt caccgccttc gtcattcatg ttcgatcatt aagtcttgcc	1320
aggacaatag atgatgagct aggagtggtt accacttagc agtacgtaca ttatttatcc	1380
cgtgttggtg gaaaaggata tggtttggtg cagatcgaca caagattgaa tgaagttgc	1440
accgtggcac cgtggcagcg tggtagtgga aaataactgt tgcacggatc caccacatg	1500
attgttttca tgaataaaat ttttaaggat gtgtctagcc acatctagat gcatgtcaca	1560
taattattgc ataccaaaac gatataatta agcataaaaa gaaaaggaaa aaaatactca	1620
catatctcga cgtaatgaca atgatatagt atttagatat gcaatattta tcttacctct	1680
aaacctttct tcatctctaa atataagaca ttgttaagat ttcactatgg acaacatacg	1740
aaacaaaact agtggatctc tctatgcatt cattatgtag tctataataa aatctttaa	1800
agatcgtata ttttgcaacg gagggagtaa aacataactt ttaataagta atgttgcacg	1860
gctccacact cgcagacgta cctgocgagc cagatgccgg cggcgctgaa gccgtaccgc	1920
gacgacgagc tccggaacct cgttgccgac gaccagcagg gcccgtaacca ggagcacgac	1980
cgcacttacc gctacgacgt ctacaaagac ctccggcagg gccgccccat cctcgcggcg	2040
aaactcgacc acccttacc cgcgcgcggc cgcacggagc gcaagcccaa cgcacgagac	2100
ccgagcctgg agagccggct gtcgtctgtg gacgagatct acgtgccgag ggacgagaag	2160
ttcggccacc tcaagacgtc cgaacttcct ggctactcca tcaaggccat cagcaggggc	2220
atcctgcccg ccgtgcgca ctaactggac accacccccg gcgagttcga ctcttccag	2280
gacatcatca accctctatg gggcggcac aagctgccca aggtggccgc cctggaggag	2340
ctccgtaagc agttcccgct ccagctcatc aaggacctcc tcccgtcgg cggcgactcc	2400
ctgcttaagc tcccgtgcc ccacatcatc caggagaaca agcaggcgtg gaggaaccgac	2460
gaggagttcg caccggagggt gctgcgcggc gtcaaccggg tcatgatcac gcgtctcacg	2520
gtgagtcagc gattatttgt tcaattgtgt tgtatggtgt ccatggtgag aaagtgcaga	2580
tcttgatttg cgttggttcg catgcaacga tgotgoatgc atgcaggagt tcccgccaaa	2640
aagtagcttg gaccctagca agtttggtga ccaacaccgc accatcacgg cggagcacat	2700
agagaagaac ctcgagggcc tcacggtgca gcaggtaatg ggtccaagcc atcgacatca	2760
actatgattt acctaggagt aattggtagc tgtagataat ttggcttcgt tgcaattaat	2820
ttgatgctgg ccgatcaagt gatcgtattg ggtttgaaat ttgcaggcgc tggaaaagca	2880
caggctgtac atccttgatc accatgaacc gttcatgccc ttccgtgatc acgtcaacaa	2940
cctgcccggc aactctatct acgocacgag gacctcttc ttccgtgcgg gcgacggcag	3000
gctcacgccc ctcccatcg agctgagcga gcccatcate caggggcgcc ttaccacggc	3060
caagagcaag gtttacacgc cgggtgccag cggctccgtc gaaggctggg tgtgggagct	3120
cgcacaaggcc tacgtccggc tcaatgactc cgggtggcac cagctcgtca gccactgata	3180

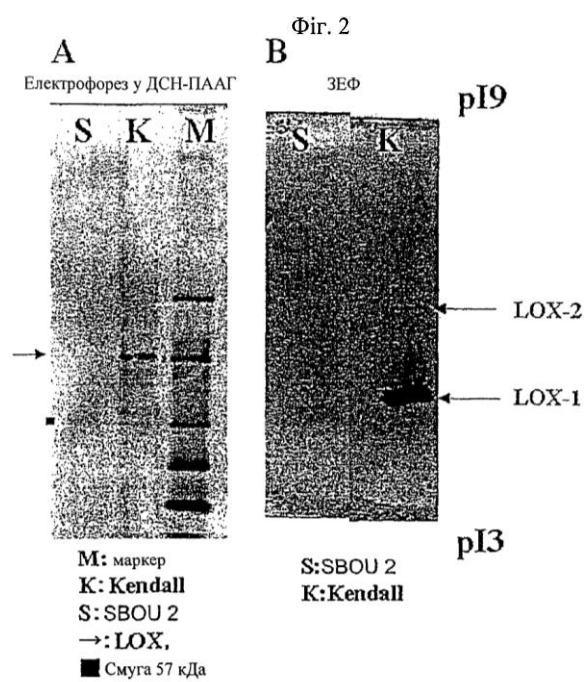
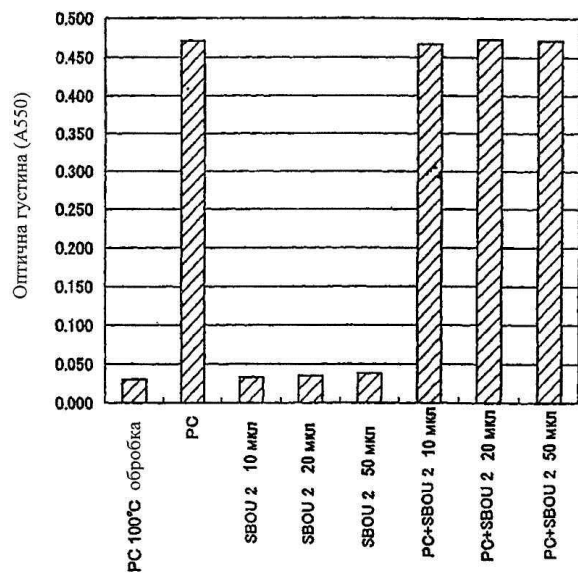
```

cgtttccac ggtcgtgtg attcagtcag tcgatgcaca acaactgac gaaatgat 3240
tgattgaac gcgcaggctg aacactcac cggtgatgga gccgttcgtg atctcgacga 3300
accggcacct tagcgtgacg caccgggtgc acaagctgct gagcccgac tacccgcaca 3360
ccatgacct caacgcgctg gcgcggcaga cgtcatcaa cgccggcggc atcttcgaga 3420
tgacggtgtt ccggggaag ttgcggttg ggatgtcggc cgtggtgtac aaggactgga 3480
agttcacga gcagggactg ccggacgac tcataaagag gtacgtacct ggtaaatgtt 3540
atgaatgtgt aaaacaatt gggcgtctcg ctcactgaca ggaacgtggt aaaaaaatg 3600
caggggcatg gcggtggagg acccgtcgag ccgtacaag gtgcggttgc tgggtgcgga 3660
ctaccgtac gcggcggaag ggctgggat ctggcacgcc attgagcagt acgtgacga 3720
gtacctggcc atctactacc cgaacgacgg cgtgctcag gccgatacgg aggtgcaggc 3780
gtggtggaag gagacgcgc aggtcgggca cggcgacctc aaggacgcc catggtggcc 3840
caagatgc-a agtgtgccg agctggccaa ggcgtgcacc accatcatct ggatcggtc 3900
ggcgtgcac gcggcagtc acttcgggca gtaccctac gcggggttcc tccgaaccg 3960
gccgacggtg agccggcgcc gcctgccgga gcccggcac gaggaagtac cggagctgga 4020
gcgcgacccg gagcgggctt tcatacacac catcacgac cagatccaga ccatcatcgg 4080
cgtgtcgtg ctggaggtgc tgtcgaagca ctctccgac gagctgtacc tcgggcagcg 4140
ggcacgcgc gagtggacct cggaccctaa ggcctggag gtgttcaagc ggttcagcga 4200
ccggtcgtg gagatcgaga gcaagggtgt ggcctgaac catgacccg agctcaagaa 4260
ccgcaacgc ccgctaagt ttccctacat gctgctctac cccaacact ccgaccacaa 4320
ggcgccgct gcgggctta ccgccaagg catcccaac agcatctcca tctaatttaa 4380
gccatcgga acc 4393

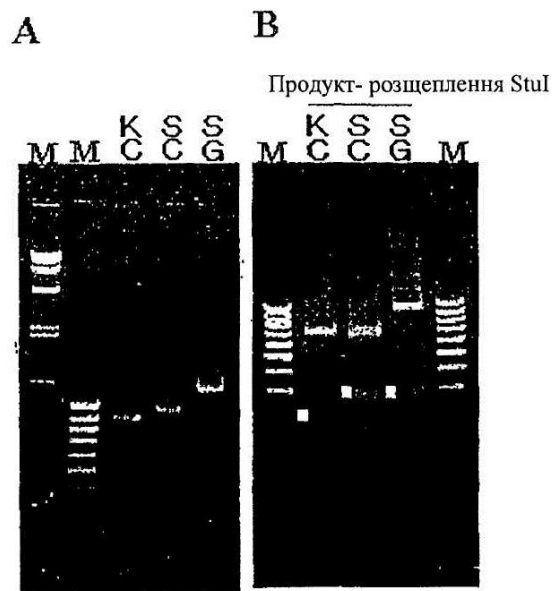
```



Фиг. 1



Фиг. 3



М: маркер
 КС: κДНК-матриця Kendall
 SC: κДНК-матриця SBOU2
 SG: геномна ДНК-матриця SBOU2

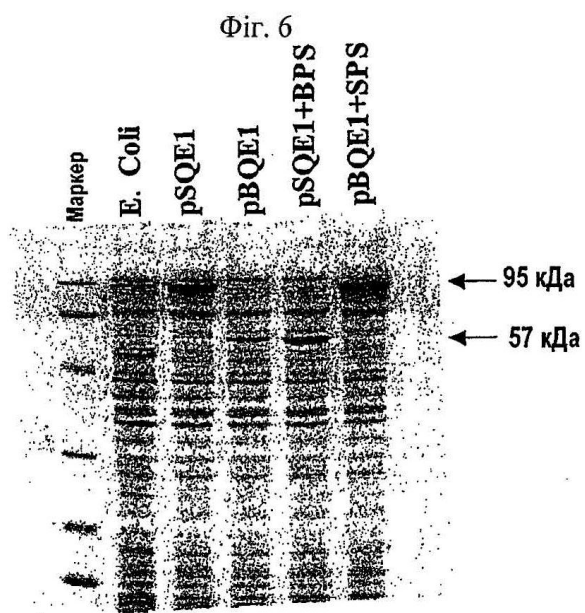
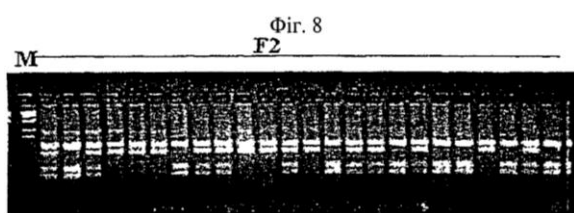
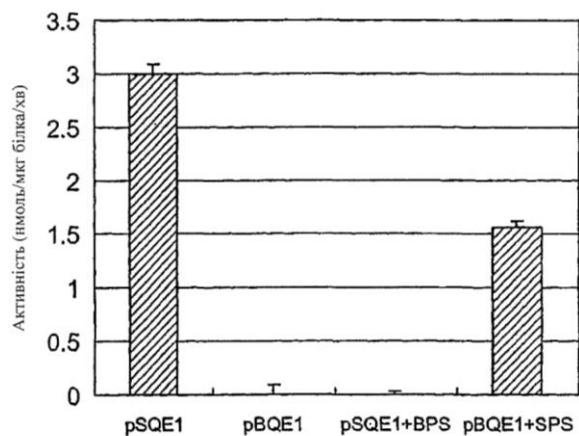


Fig. 7



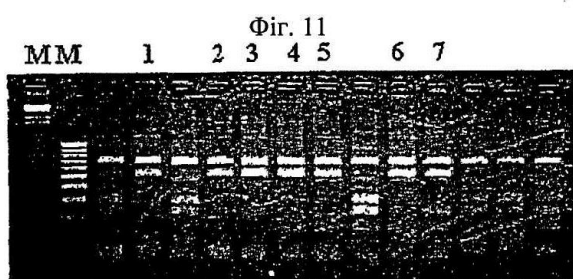
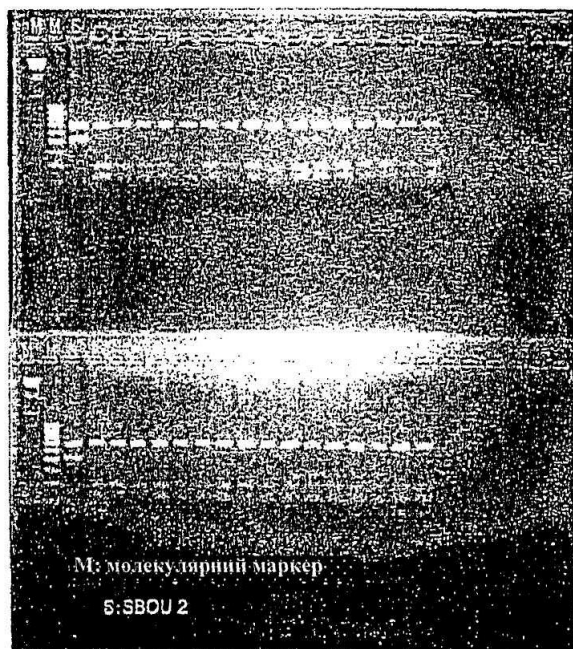
M: маркер

F2: AfaI - спосіб аналізу ДНК F2 Kendall × SBOU2

Фиг. 9

Номер індиві- дуума F2	Актив- ність LOX	AfaI- спосіб	JBC970	Номер індиві- дуума F2	Актив- ність LOX	AfaI- спосіб	JBC970
1	+	GAAB	WZ	73	+	GAAB	WZ
2	+	KK	KK	74	+	KB	KB
3	+	KB	KB	75	+	KK	KK
4	+	BB	BB	76	+	KB	KB
5	+	BB	BB	77	+	KK	KK
6	+	BB	BB	78	+	BB	BB
7	+	KK	KK	79	+	KB	KB
8	+	KB	KB	80	+	BB	BB
9	+	KB	KB	81	+	BB	BB
10	+	BB	BB	82	+	KB	KB
11	+	BB	KB	83	+	KK	KK
12	+	KB	KB	84	+	KK	KK
13	+	BB	BB	85	+	BB	BB
14	+	KB	KB	86	+	BB	BB
15	+	KB	KB	87	+	BB	BB
16	+	KB	KB	88	+	KB	KB
17	+	KB	KB	89	+	BB	BB
18	+	KB	KB	90	+	BB	BB
19	+	KB	KB	91	+	KB	KB
20	+	KB	KB	92	+	KB	KB
21	+	BB	KB	93	+	KB	KB
22	+	KB	KB	94	+	KB	KB
23	+	KB	KB	95	+	KB	KB
24	+	KB	KB	96	+	KB	KB
25	+	KB	KB	97	+	KB	KB
26	+	KB	KB	98	+	KB	KB
27	+	KB	KB	99	+	KB	KB
28	+	KB	KB	100	+	KB	KB
29	+	KB	KB	101	+	KB	KB
30	+	KB	KB	102	+	KB	KB
31	+	KB	KB	103	+	KB	KB
32	+	BB	KB	104	+	KB	KB
33	+	KB	KB	105	+	KB	KB
34	+	KB	KB	106	+	KB	KB
35	+	KB	KB	107	+	KB	KB
36	+	KB	KB	108	+	KB	KB
37	+	KB	KB	109	+	KB	KB
38	+	KB	KB	110	+	BB	BB
39	+	KB	KB	111	+	BB	BB
40	+	KB	KB	112	+	KB	KB
41	+	BB	BB	113	+	KB	KB
42	+	KB	KB	114	+	KB	KB
43	+	KB	KB	115	+	BB	BB
44	+	KB	KB	116	+	KB	KB
45	+	BB	BB	117	+	BB	BB
46	+	KB	KB	118	+	KB	KB
47	+	BB	BB	119	+	KB	KB
48	+	KB	KB	120	+	KB	KB
49	+	KB	KB	121	+	KB	KB
50	+	BB	BB	122	+	KB	KB
51	+	KB	KB	123	+	KB	KB
52	+	KB	KB	124	+	KB	KB
53	+	KB	KB	125	+	BB	BB
54	+	KB	KB	126	+	KB	KB
55	+	KB	KB	127	+	KB	KB
56	+	BB	BB	128	+	KB	KB
57	+	KB	KB	129	+	KB	KB
58	+	KB	KB	130	+	KB	KB
59	+	BB	BB	131	+	KB	KB
60	+	BB	BB	132	+	KB	KB
61	+	KB	KB	133	+	BB	BB
62	+	KB	KB	134	+	BB	BB
63	+	KB	KB	135	+	KB	KB
64	+	KB	KB	136	+	KB	KB
65	+	KB	KB	137	+	KB	KB
66	+	KB	KB	138	+	KB	KB
67	+	KB	KB	139	+	BB	BB
68	+	KB	KB	140	+	KB	KB
69	+	KB	KB	141	+	KB	KB
70	+	KB	KB	142	+	KB	KB
71	+	KB	KB	143	+	KB	KB
72	+	BB	BB	144	+	KB	KB

Фиг. 10



M: маркер,
1 и 5: SBOU2, 2: SBOU 5, 3: SBOU 6
4: SBOU 1, 6: SBOU 3, 7: SBOU 4

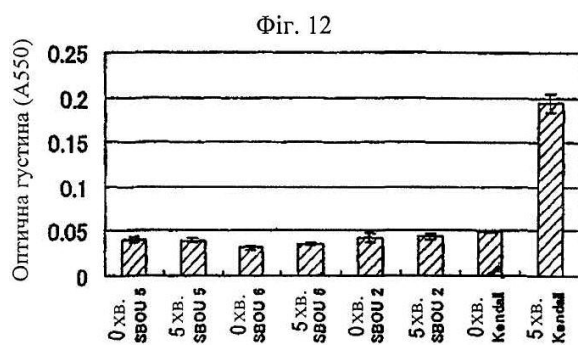


Fig. 13A

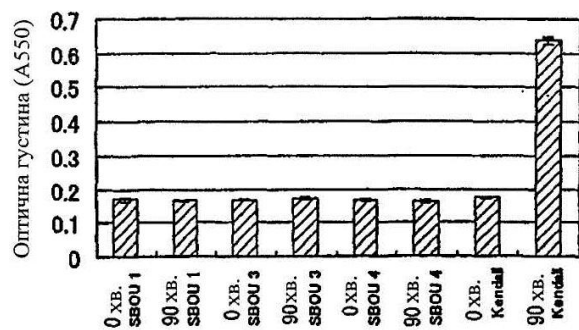


Fig. 13B

Сорт	LOX+F4	LOX-F4
Вогкість ячменю (%)	10,9	11
Маса ячменю (г)	3000	3000
Замочування (%)	44,8	44,5
Час замочування (год)	82	82
Маса виходу солоду (г)	2571,6	2572,2
Процент виходу солоду (%ad)	85,7	85,7
Процент виходу солоду (%db)	903	90,7
Вологість (%)	6,1	5,8
Час затирання (хв.)	9-15	9-15
Швидкість фільтрування (хв.)	8	17
Прозорість	2	2
Колір(ЕBC)	2,1	2,2
Колір після варіння (ЕBC)	3,2	3,3
Екстракт після повітряного сушіння (%)	67	69,3
Безводний екстракт (%)	71,4	73,5
TN (%)	2,49	2,291
SN (%)	0,648	0,645
Неочищений білок (%)	15,6	НЗ
KZ	26	28,1
EVG (%)	78,8	79
DP (°WK)	348	377
DP (WK/TN)	140	165
В'язкість (мПа·с)	1,87	1,89
β-глюкан (мг/л)	427	392
pH	5,97	6
Вихід екстракту (%)	64,5	66,7

Fig. 14

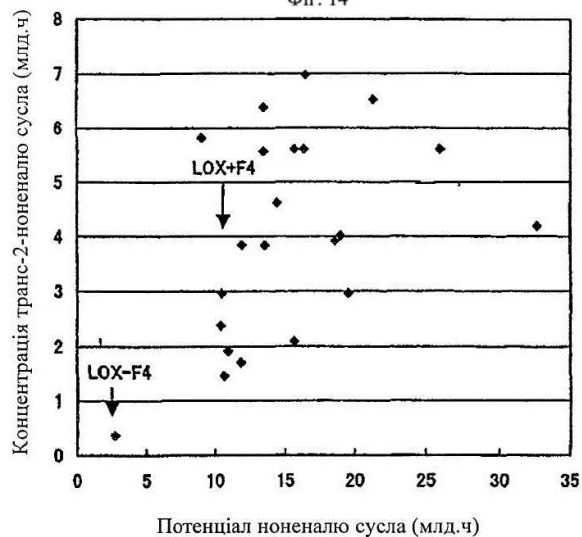


Fig. 15