



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 85183

(13) C2

(51) МПК (2006)

C12N 15/53

C12C 1/00

C12N 9/08

C12Q 1/68

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ГЕН ЛІПОКСИГЕНАЗИ-1 ЯЧМЕНЮ, СПОСІБ ВІДБОРУ ЯЧМЕНЮ, МАТЕРІАЛИ ДЛЯ СОЛОДОВИХ АЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ І СПОСІБ ОТРИМАННЯ СОЛОДОВИХ АЛКОГОЛЬНИХ НАПОЇВ

1

2

(21) a200509927

(22) 25.03.2004

(24) 12.01.2009

(86) PCT/JP2004/004217, 25.03.2004

(31) 2003-083924

(32) 25.03.2003

(33) JP

(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.

(72) ХИРОТА НАОХІКО, КАНЕКО ТАКАФУМІ, КУРОДА ХІСАО, КАНЕДА ХИРОТАКА, ТАКОЙ КІЕСІ, ТАКЕДА КАЗУЕСІ

(73) САППОРО БРЮЕРІЗ ЛІМІТЕД

(56) WO02053720, 11.07.2002

KURODA H. ET AL: 'Characterization of factors that transform linoleic acid into di- and trihydroxyoctadecenoic acids in mash' JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING vol. 93, no. 1, 2002, pages 73 - 77

SHIBATA D. ET AL: 'Plant lipoxygenases' J. LIPID MEDIAT CELL SIGNAL. vol. 12, no. 2-3, 1995, pages 213 - 228

DROST B.W. ET AL: 'Flavor Stability' J.AM.SOC.BREW.CHEM. vol. 48, no. 4, 1990, pages 124 - 131

VILARINHOS A.D. ET AL: 'Use of the random amplified polymorphic DNA technique to characterize soybean (Glycine max (L.) Merrill) genotypes' REV. BRASIL. GENET. vol. 17, no. 3, 1994, pages 287 - 290

HESSLER T.G. ET AL: 'Association of a Lipoxygenase Locus, Lpx-B1, with Variation in Lipoxygenase Activity in Durum Wheat Seeds' CROP SCIENCE vol. 42, no. 5, 2002, pages 1695 - 1700

(57) 1. Мутантний ген ліпоксигенази-1 ячменю, в якому гуанін у донорному сайті сплайсингу (5'-GT-3') 5-го інтрона гена ліпоксигенази-1 ячменю мutowаний в іншу основу.

2. Мутантний ген ліпоксигенази-1 ячменю за п. 1, в якому інша основа є аденином.

3. Спосіб відбору ячменю, позбавленого ліпогенази-1 ячменю, що включає стадію розпізнавання ячменю, позбавленого ліпоксигенази-1 ячменю, за допомогою визначення, є або не є гуанін в донор-

ному сайті сплайсингу 5-го інтрона гена ліпоксигенази ячменю мutowаним в іншу основу.

4. Спосіб відбору ячменю, позбавленого ліпогенази-1 ячменю, за п. 3, в якому інша основа є аденином.

5. Спосіб відбору ячменю, позбавленого ліпогенази-1 ячменю, за п. 3 або 4, що включає стадію екстракції геномної ДНК, в якій геномну ДНК екстрагують з проби ячменю, стадію ампліфікації ДНК, в якій ДНК-фрагмент, що містить донорний сайт сплайсингу 5-го інтрона гена ліпоксигенази-1 ячменю, ампліфікують з екстрагованої геномної ДНК, і

стадію детектування ДНК-фрагмента, в якій ДНК-фрагмент, що містить донорний сайт сплайсингу 5-го інтрона гена ліпоксигенази ячменю мutowаним в іншу основу, ампліфікований на стадії ампліфікації ДНК-фрагмента, розщеплюють рестриктазою, детектують ДНК-фрагмент, що має вказану кількість основ, і розпізнають ячмінь, позбавлений ліпоксигенази-1 ячменю, за допомогою визначення, є або не є гуанін в донорному сайті сплайсингу 5-го інтрона гена ліпоксигенази ячменю мutowаним в іншу основу.

6. Спосіб відбору ячменю, позбавленого ліпогенази-1 ячменю, за п. 5, в якому рестриктазою, що використовується на стадії детектування ДНК-фрагмента, є AfaI і/або RsaI, які упізнають нуклеотидну послідовність 5'-GTAC-3'.

7. Матеріал для солодових алкогольних напоїв, де цей матеріал вибраний з групи, що складається з насіння, солоду, екстракту солоду, продукту розщеплення ячменю або обробленого ячменю, отриманого з ячменю, який має мутантний ген ліпоксигенази-1 ячменю за п. 1 або 2.

8. Матеріал для солодових алкогольних напоїв, де цей матеріал вибраний з групи, що складається з насіння, солоду, екстракту солоду, продукту розщеплення ячменю або обробленого ячменю, отриманого з ячменю, відібраного з використанням способу відбору за будь-яким з пп. 3-6.

9. Спосіб отримання солодових алкогольних напоїв, що характеризується використанням матеріалу для солодових алкогольних напоїв за п. 7 або 8.

(13) C2

(11) 85183

(19) UA

10. Нуклеїнова кислота, що містить нуклеотидну послідовність від положення 1 до положення 1554, представлена в SEQ ID NO:10.

11. Нуклеїнова кислота, що містить нуклеотидну послідовність, представлена в SEQ ID NO:11.

12. Нуклеїнова кислота, що містить нуклеотидну послідовність з 10-60 суміжних основ, у тому числі основу 3178, в нуклеотидній послідовності, представлений в SEQ ID NO:11.

13. Спосіб детектування присутності активності LOX-1 в ячмені, що включає стадію виділення геномної ДНК з проби ячменю і стадію детектування основи 3178 нуклеотидної послідовності, представлені в SEQ ID NO:11, причому присутність цієї основи є показником присутності активності LOX-1 в ячмені.

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-гідропероксіоктадекадієнної кислоти під час затирання солоду для отримання солодових алкогольних напоїв [Kobayashi, N et al., J. Ferment. Bioeng., 76, 371-375, 1993]. Далі, 9-гідропероксіоктадекадієннова кислота перетворюється в тригідроксіоктадеценнову 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; і Kaneda, H. et al., J. Biosci. Bioeng., 92, 221-226, 2001], призводячи до більш низької якості солодових алкогольних напоїв. Крім того, 9-гідропероксіоктадекадієннова 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 стій-

кість 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 вищеписаної 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 AfaI 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, представлені 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 інгібуєчості 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 доного 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-ий - 5-ий 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 парою 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 ноненалю для суслу 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 мутуванням 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 середині 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 мутуванням 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 СТАВ [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 про-

дукту 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, мutowаний 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 патерну 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 дроблений 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 су-сла, 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 зброженого 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-гідропероксіоктадекадієнної кислоти з лінолевої кислоти і, отже, інгібується утворення THOD і транс-2-ноненаля 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 пос-

лідовність, 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-кодоном, і, отже, у цій точці трансляції 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 Mediators and Cell Signaling 12:213-218].

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-гідропероксіоктадекадієнної 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-ноненаля з метою отримання солодових алкогольних напоїв з поліпшеними стабільністю смаку і стійкістю піни. Таким чином, нуклеїнова кислота, що містить нуклеотидну послідовність, представлену 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 аутен-

тичний 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 СТАВ або спосіб з використанням бромиду 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, представлена 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 А у мутантному гені LOX-1, вона не утворює сайту розщеплення для рестриктаз AfaI/RsaI (Фіг.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 суміж-

них 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 А, 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, представлена 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 кодуєчу 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 ліолева 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. Частину 200мкл утворюючого колір розчину (4мМ 2,6-дигалл-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 реакцію 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-HCl (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 $\times$ 2 і потім AP9,5 (10мМ Трис-HCl (pH 9,5), 0,1М хлорид натрію, 5мМ хлорид магнію) протягом 5 хвилин $\times$ 1, проводили реакцію з розчином субстрату лужної фосфатази (1мг/мл нітросинього тетразолію, 0,5мг/мл BCIP, розчин 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.3А).

Потім пробу цього екстракту піддавали ізоелектричному фокусуванню (IEF, pl 3-9) з використанням PhastSystem (Amersham Pharmacia) і піддавали Вестерн-аналізу, як описано вище. Внаслідок аналізу з використанням SBOU2 детектували смугу в положенні pl LOX-2, але ясна смуга не була присутньою в положенні pl LOX-1 (Фіг.3В). 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'-GGAGAGGAGGCAAGAACAAGATG-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 аденіном 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 (Фіг.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'-CCATCACGCAGGGCATCCTG-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 (Фіг.6А). 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 (Фіг.6В). Тобто, очевидно, що стоп-кодон, новоутворений, як показано на Фіг.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 сайті *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 (Фіг.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 (Фіг.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-Stul-фрагмент, що містить мутацію в донорному сайті сплайсинга 5-го інтрона pBQE1 (сайт Stul 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-Stul-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-Stul, що містить мутацію в донорному сайті сплайсинга 5-го інтрона, вбудований в pSQE1, була індукована 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-Stul, вбудований в pBQE1, була індукована експресія білка приблизно 95кДа (Фіг.7) і була відновлена активність LOX (Фіг.8), що схоже з pSQE1/JM109. Нуклеотидна послідовність PstI-Stul-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 Afal (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 Afal і/або RsaI (Фіг.5). Екстрагували ДНК з листя 144 індивідуумів 2-го дочірнього покоління гібридів (F2) схрещування між Kendall і лінією SBOU2 і проводили ПЛР з використанням двох різних праймерів (5'-CCATCACGCAGGGCATCTG-3' (SEQ ID NO:6), 5'-GCGTTGATGAGCGTCTGCCG-3' (SEQ ID NO:7)), сконструйованих таким чином, що ампліфікований фрагмент повинен містити сайт Afal. 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 Afal і аналізували електрофорезом в 2,5% агарозному гелі (далі ця процедура буде називатися "способом Afal"). У результаті можна було легко виконувати розрізнення між SBOU2, Kendall і гетеротипами (Фіг.9). Крім випробування поліморфізму за способом Afal, поліморфізм у кожному сорті випробували також з використанням маркера ДНК (JBC970) поблизу генного локусу LOXA хромосоми 4Н ячменю, що несе ген LOX-1 (Фіг.10).

Зріле насіння кожного з індивідуумів F2 використали 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 Afal і вимірювання активності LOX насіння F3 розщеплення ознаки дефектного LOX-1 SBOU2 точно співпадало з розщепленням поліморфізму за способом Afal. 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 Afal 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 Afal інших сортів ячменю)

Звичайні сорти/лінії ячменю використовували для дослідження поліморфізму Afal 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 Afal було визначено, що перевірені сорти не були сортами типу SBOU2, але, замість цього, розщеплювалися в сайті рестриктази Afal, 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 Afal (нуклеотиди 60-63 SEQ ID NO:1: 5'GTAC-3'), і, отже, спосіб Afal 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 Afal. У результаті були виявлені п'ять нових ліній (SBOU1, SBOU3, SBOU4, SBOU5 і SBOU6, що зберігаються в Okayama University), які не розщеплювалися в сайті рестриктази Afal, 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 Afal, 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 Taishomugi схрещували з SBOU2 і отримане перше дочірнє покоління (F1) самозапильовали 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 Afal, 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 індивідуумів 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 (Охв.) - 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 5мкл суслу 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 суслу до ½ або до більш низької концентрації при отриманні суслу 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 прикладах, 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, затирали з використанням затирного апарату 50-літрового масштабу відповідно до стандартних способів затирання для Happoshu, алкогольного напою з низьким вмістом солоду (вміст солоду: 24%). Умови затирання були наступними.

Затирали 1,5кг кожного солоду окремо з 15л затирної 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) (ЕВС)). 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 сусла аналізували відповідно до стандартних способів ЕВС [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 (°ЕВС)	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 (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 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 ЕВС 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 зниженням 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-ноненалу 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 7A).

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 7B).

Таблиця 7A

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

(Одиниці: Гц)

(Немає значущої відмінності при рівні ймовірності 5%)

Таблиця 7B

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 суслу

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 Harposhi, 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 -глюканаза, внаслідок високого вмісту обробленого ячменю). Після затирання проводили фільтрування суслу з використанням фільтрувального чана. Отримували 40л відфільтрованих сусел.

В отримані відфільтровані суслу додавали 53г гранул хмелю (одиниці гіркоти: 25,6 BU (EBC)). 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 суслу аналізували відповідно до стандартних способів EBC. 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 (°EBC)	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 (Harporshi, 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 EBC 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 суслу	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
рН	4,58	4,59
Тиск газу (20°C), кг/см	2,29	2,38
Колір (°EBC)	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

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 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 зниженням 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% імовірності (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 11B

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, затирали 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) затирали 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 (°ЕВС)	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 витримання. Стадію витримання проводили при 8°C протягом перших 8 днів і потім при 0°C протягом подальших 2 тижнів.

Після завершення стадії витримання 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 Haffmans (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-ноненаля 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 tccgggtggc accagctcgt cagccactgg      60
tacgttctcc acggtcgatg tgattcagtc agtcgatgca caacaactga tcgaaatatg      120
attgattgaa acgcgcaggc tgaacactca cgcgggtgatg gagccgttcg tgatctcgac      180
gaaccggcac cttagcgtga cgcacccggt gcacaagctg ctgagcccgc actaccgcca      240
```

<210> 2

<211> 240

<212> ДНК

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

```
ctcgccaagg cctacgtcgc cgtcaatgac tccgggtggc accagctcgt cagccactga      60
```

37	85183	38	
tacgttctcc	acggtc gatg tgattcagtc agtcgatgca caacaactga	tcgaaat atg	120
attgattgaa	acgcgcaggc tgaacactca cgcggtgatg gagccgttcg	tgatctcgac	180
gaaccggcac	cttagcgtga cgcacccggg gcacaagctg ctgagcccg	actaccgcga	240

<210> 3

<211> 24

<212> ДНК

<213> Синтетична

<220>

<223> праймер

<400> 3

ggagaggagg	ссаагаасаа	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>

	39	85183	40
<223>	праймер		
<400>	5		
	cacgtcgccg tccgatccat c		21
<210>	6		
<211>	20		
<212>	днк		
<213>	Синтетична		
<220>			
<223>	праймер		
<400>	6		
	ccatcacgca gggcatcctg		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		

41	85183	42
<220>		
<223>	праймер для LOX-1 3 сайтом BamHI	
<400>	8	
	ggatccatgc tgctgggagg gctg	24
<210>	9	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Синтетична	
<220>		
<223>	праймер для LOX-1 3 сайтом HindIII	
<400>	9	
	aagcttttag atggagatgc tgttg	25
<210>	10	
<211>	2668	
<212>	ДНК	
<213>	<i>Hordeum vulgare</i>	
<400>	10	
	atgctgctgg gagggctgat cgacaccctc acggggggcga acaagagcgc ccggctcaag	60
	ggcacgggtgg tgctcatgcg caagaacgtg ctggacctca acgacttcgg cgccaccatc	120
	atcgacggca tcggcgagtt cctcggcaag ggcgtcacct gccagcttat cagctccacc	180
	gccgtcgacc aagacaacgg cggtcgcggg aaggtggggc cggaggcgga gctggagcag	240
	tgggtgacga gcctgccgtc gctgacgacg ggggagtcca agttcggcct caccttcgac	300
	tgggaggtgg agaagctcgg ggtgccgggc gccatcgtcg tcaacaacta ccacagctcc	360
	gagttcctgc ttaaaaccat caccctccac gacgtccccg gccgcagcgg caacctcacc	420
	ttcgtcgcca actcatggat ctaccccgcc gccaaactacc gatacagccg cgtcttcttc	480
	gccaaacgaca cgtacctgcc gagccagatg ccggcggcgc tgaagccgta ccgcgacgac	540

43	85183	44	
gagctccgga acctgcgtgg cgacgaccag cagggcccgt accaggagca cgaccgcac			600
taccgctacg acgtctacaa cgacctcggc gagggccgcc ccacctctcg cggaactcc			660
gaccaccctt acccgcgccg cggccgcacg gagcgcaagc ccaacgccag cgacccgagc			720
ctggagagcc ggctgtcgct gctggagcag atctacgtgc cgcgggacga gaagtctggc			780
cacctcaaga cgtccgactt cctgggctac tccatcaagg ccatcacgca gggcatcctg			840
ccggccgtgc gcacctacgt ggacaccacc cccggcgagt tgcactcctt ccaggacatc			900
atcaacctct atgagggcgg catcaagctg cccaagggtg ccgccctgga ggagctccgt			960
aagcagttcc cgctccagct catcaaggac ctctctcccc tggcgggcga ctccctgctt			1020
aagctccccg tgccccacat catccaggag aacaagcagg cgtggaggac cgacgaggag			1080
ttcgcacggg aggtgctcgc cggcgtcaac ccggtcatga tcacgcgtct cacggagttc			1140
ccgccaaaaa gtagttctgga ccctagcaag tttggtgacc acaccagcac catcacggcg			1200
gagcacatag agaagaacct cgagggcctc acggtgcagc aggcgctgga aagcaacagg			1260
ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg			1320
cccggcaact tcatctacgc cagcaggacc ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc			1380
acgcgcgtcg ccacgcagct gagcgagccc atcatccagg gcggccttac cacggccaag			1440
agcaaggttt acacgccggt gccagcggc tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgcc			1500
aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg tggcaccage tcgtcagcca ctgatacgtt			1560
ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcga tgcacaacaa ctgatcgaaa tatgattgat			1620
tgaaacgcgc aggtgaaca ctacgcggt gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg			1680
gcaccttagc gtgacgcacc cgggtgcacaa gctgctgagc ccgcactacc gcgacaccat			1740
gaccatcaac gcgtggcgc ggcagaogct catcaacgcc ggcgccatct tcgagatgac			1800
ggtgttcccg ggcaagttcg cgttggggat gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt			1860
caccgagcag ggaactgccg acgatctcat caagaggggc atggcgggtg aggaccgctc			1920
gagcccgtag aaggtgcggt tgctggtgtc ggactacccg tacgcggcgg acgggctggc			1980
gatctggcac gccattgagc agtacgtgag cgagtacctg gccatctact acccgaacga			2040
cggcgtgctg cagggcgata cggaggtgca ggcgtggtgg aaggagacgc gcgaggtcgg			2100
gcacggcgac ctcaaggacg ccccatggtg gcccaagatg caaagtgtgc cggagctggc			2160
caaggcgtgc accaccatca tctggatcgg gtcggcgctg catgcggcag tcaacttcgg			2220
gcagtacccc tacgcggggt tcctcccgaa ccggccgacg gtgagccggc gccgcattgcc			2280
ggagcccggc acggaggagt acgcggagct ggagcgcgac ccggagcggg ccttcattcca			2340
caccatcacg agccagatcc agaccatcat cggcgtgtcg ctgctggagg tgctgtcgaa			2400
gcactcctcc gacgagctgt acctcgggca gcgggacacg ccggagtgga cctcggaccc			2460

45	85183	46	
aaagggcctg	gaggtgttca	agcggttcag	cgaccggctg gtggagatcg agagcaaggt 2520
ggtgggcatg	aaccatgacc	cggagctcaa	gaaccgcaac ggcccggcta agtttccta 2580
catgctgctc	tacccaaca	cctccgacca	caagggcgcc gctgccgggc ttaccgcaa 2640
gggcatcccc	aacagcatct	ccatctaa	2668

<210> 11

<211> 4393

<212> ДНК

<213> Hordeum vulgare

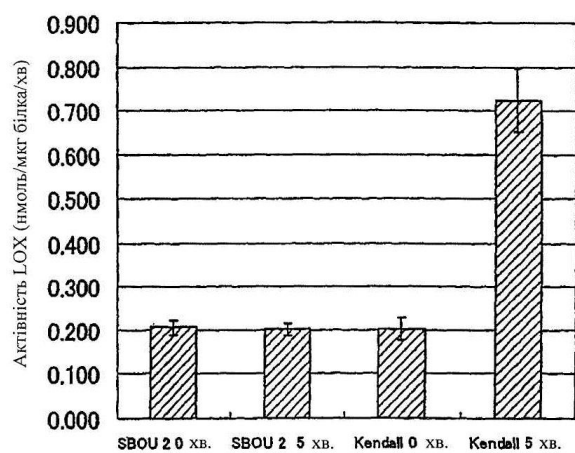
<400> 11

cacgtcgccg	tccgatccat	ctctccaaag	ccgagcgcca caccaccggg accggacccg	60
gaccggccta	taaattgccc	ggaccgagct	gcaagcagct cctcacacac actcacgcaa	120
cacacatcca	tcttactga	aaagtgaaaa	acagtgtgct ggtgccattg gttggagcag	180
tgaagcgag	gagaggaggc	caagaacaag	atgctgctgg gagggctgat cgacaccctc	240
acggggggcg	acaagagcgc	ccggctcaag	ggcacggctg tgctcatgcg caagaacgtg	300
ctggacctca	acgacttcgg	cgccaccatc	atcgacggca tcggcgagtt cctcggcaag	360
ggcgtcacct	gccagcttat	cagctccacc	gccgtcgacc aaggtaatca ctaccctcct	420
ccggccttct	cctctgttta	caagatatag	tatttcttct gtgtggggcg gcggccatgg	480
atggatggat	gtgtctggat	cggctaaaga	agataggata gctagccctg gccggctcgtc	540
tttacctgag	catgggcata	tgccatcgaa	aaaagagaca acagcatgca tgcattgtgc	600
gcgcaccaga	ccacgcagag	caccggatgc	tcgagacaaa gcaacacaac aagcaaggac	660
gacacgtcaa	aagcaacaca	acaagcaagg	acggcacgtc aaaagcaaca caaacctaaa	720
ctaaagcaca	aagacgtaag	agcaagcaca	caatcagcag gctataaaca gttgtcatca	780
aaaacaacgc	tggaagagag	agagaaggaa	ggaagtagta gccatgaaaa attaaatcac	840
cgggcgttgc	tctttgccca	acaattaatc	aagcagggta cgtggcatgt atagtctctg	900
taagtaaaact	aagcatgtga	tatgagaagg	tacgtgggtg tgacagacaac ggcggtcctg	960
ggaagggtgg	cgcgaggcgc	gagctggagc	agtgggtgac gagcctgccg tcgctgacga	1020
cgggggagtc	caagttcggc	ctcaccttcg	actgggaggt ggagaagctc ggggtgccgg	1080
gcgccatcgt	cgtcaacaac	taccacagct	ccgagttcct gcttaaaacc atcacctcc	1140
acgacgtccc	cggccgcagc	ggcaacctca	ccttcgtcgc caactcatgg atctaccccg	1200
ccgccaacta	ccgatacagc	cgcgtcttct	tcgccaacga cgtgcgtgga ttttctctta	1260

47	85183	48	
ctttcctctc	ctttcatctt	caccgccttc	gtcattcatg gtcgatcatt aagtcttgcc 1320
aggacaatag	atgatgagct	aggagtgggt	accacttagc agtacgtaca ttattttatc 1380
cgtgttggtg	gaaaaggata	tggtttgggt	cagatcgaca caagattgaa tgaaagttgc 1440
accgtggcac	cgtggcagcg	tggtaggtga	aaataactgt tgcacggatc caccacatg 1500
attgttttca	tgaataaaact	ttttaaggat	gtgtctagcc acatctagat gcatgtcaca 1560
taattattgc	atacaaaaac	gattaaatta	agcataaaaa gaaaaggaaa aaaataactca 1620
catatctcga	cgtaagatca	atgatatagt	atttagatat gcaatattta tcttacatct 1680
aaacctttct	tcattcctaa	atataagaca	tttgtaagat ttcactatgg acaacatacg 1740
aaacaaaatc	agtggatctc	tctatgcatt	cattatgtag tctataataa aatctttaaa 1800
agatcgtata	ttttgcaacg	gaggagtaga	aacataactt tttaatagta atgttgacg 1860
gctccacact	cgagacgta	cctgccgagc	cagatgccgg cggcgctgaa gccgtaccgc 1920
gacgacgagc	tccggaacct	gcgtggcgac	gaccagcagg gcccgtagca ggagcacgac 1980
cgcatctacc	gctacgacgt	ctacaacgac	ctcggcgagg gccgccccat cctcggcggc 2040
aactccgacc	acccttacc	gcgcgcgggc	cgacagcagg gcaagcccaa cgccagcgac 2100
ccgagcctgg	agagccggct	gtcgctgctg	gagcagatct acgtgccgg ggacgagaag 2160
ttcggccacc	tcaagacgtc	cgacttctct	ggctactcca tcaaggccat cacgcagggc 2220
atcctgccgg	ccgtgcgcac	ctacgtggac	accacccccg gcgagttcga ctcttccag 2280
gacatcatca	acctctatga	ggggggcatc	aagctgcca aggtggccgc cctggaggag 2340
ctcgtgaagc	agttcccgct	ccagctcatc	aaggacctcc tccccgtcgg cggcgactcc 2400
ctgcttaagc	tccccgtgcc	ccacatcatc	caggagaaca agcaggcgtg gaggaccgac 2460
gaggagtctg	cacgggaggt	gctcgccggc	gtcaaccggg tcatgatcac gcgtctcacg 2520
gtgagtcagc	gattatttgt	tcattgtgtg	tgtatgggtg ccatgggtgag aaagtgcaga 2580
tcttgatttg	cgttgggtcg	catgcacgca	tgctgcatgc atgcaggagt tcccgccaaa 2640
aagtagtctg	gaccctagca	agtttggtga	ccacaccagc accatcacgg cggagcacat 2700
agagaagaac	ctcgaggggc	tcacggtgca	gcaggtaatt ggtccaagcc atcgacatca 2760
actatgattt	acctaggagt	aattggtagc	tgtagataat ttggcttcgt tgcaattaat 2820
ttgatgctgg	ccgatcaagt	gatcgtattg	ggtttgaaat ttgcaggcgc tggaaagcaa 2880
caggctgtac	atccttgatc	accatgaccg	gttcattgccg ttctgatcg acgtcaacaa 2940
cctgcccggc	aacttcattc	acgccacgag	gacctcttc ttctgcccgc gcgacggcag 3000
gctcacgccg	ctcgccatcg	agctgagcga	gcccatcatc caggggcgcc ttaccacggc 3060
caagagcaag	gtttacacgc	cgggtcccag	cggctccgtc gaaggctggg tgtgggagct 3120
cgccaaggcc	tacgtcgccg	tcaatgactc	cgggtggcac cagctcgtca gccactgata 3180

49	85183	50	
cgttctccac	ggtcgatgtg attcagtcag	tcgatgcaca acaactgac	gaaatatgat 3240
tgattgaaac	gcgagggctg aacactcacg	cggtgatgga gccgttcgtg	atctcgacga 3300
accggcacct	tagcgtgacg caccgggtgc	acaagctgct gagcccgac	taccgcgaca 3360
ccatgaccat	caacgcgctg gcgcggcaga	cgctcatcaa cgccggcggc	atcttcgaga 3420
tgacgggtgtt	cccgggcaag ttcgcgttg	ggatgtcggc cgtgggtgtac	aaggactgga 3480
agttcaccga	gcagggactg ccggacgac	tcacgaagag gtacgtacct	ggtaaatgtt 3540
atgaatgtgt	aaaacaaatt gggcgtctcg	ctcactgaca ggaacgtgg	aaaaaaatg 3600
caggggcatg	gcggtggagg acccgtcgag	cccgtacaag gtgcggttgc	tggtgtcgga 3660
ctacccgtag	gcggcgagcg ggctggcgat	ctggcacgcc attgagcagt	acgtgagcga 3720
gtacctggcc	atctactacc cgaacgacgg	cgtgctgcag ggogatacgg	aggtgcaggg 3780
gtggtggaag	gagacgcgcg aggtcgggca	cggcgacctc aaggacgccc	catggtggcc 3840
caagatgcna	agtgtgccgg agctggccaa	ggcgtgcacc accatcatct	ggatcgggtc 3900
ggcgtgcat	gcggcagtca acttcgggca	gtacccttac gcggggttcc	tccgaaccg 3960
gccgacgggtg	agccggcgcc gcatgccgga	gcccggcacg gaggagtacg	cggagctgga 4020
gcgcgacccg	gagcgggcct tcatccacac	catcacgagc cagatccaga	ccatcatcgg 4080
cgtgtcgtg	ctggaggtgc tgcgaagca	ctctccgac gagctgtacc	tgggcagcg 4140
ggacacgccg	gagtggacct cggacccaaa	ggccctggag gtgttcaagc	ggttcagcga 4200
ccggctgggtg	gagatcgaga gcaagggtgt	gggcatgaac catgaccggg	agctcaagaa 4260
ccgcaacggc	ccggctaagt ttccctacat	gctgctctac cccaacacct	ccgaccacaa 4320
gggcgcgct	gccgggctta ccgccaagg	catcccaac agcatctcca	tctaatttaa 4380
gccatcgga	acc		4393

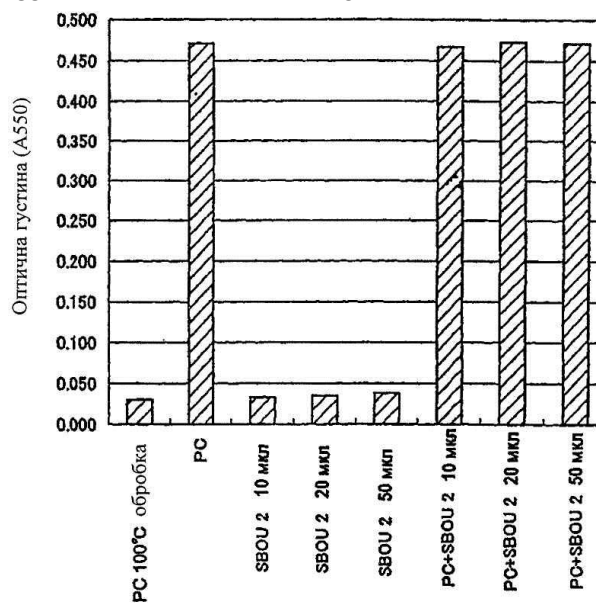
51



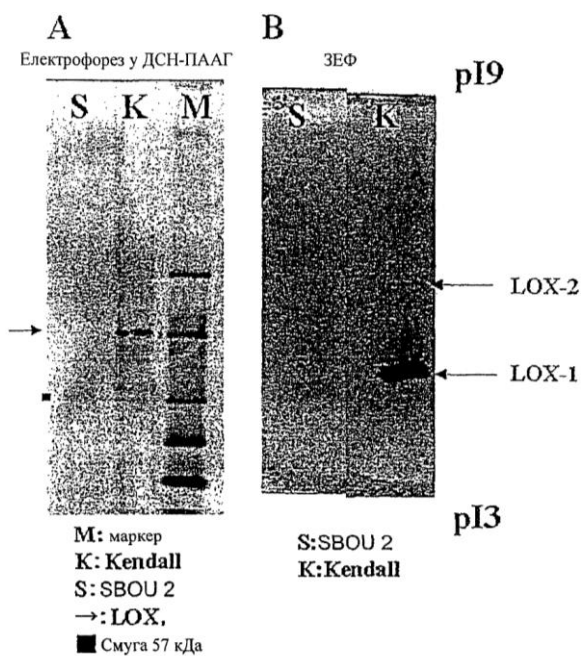
Фіг. 1

85183

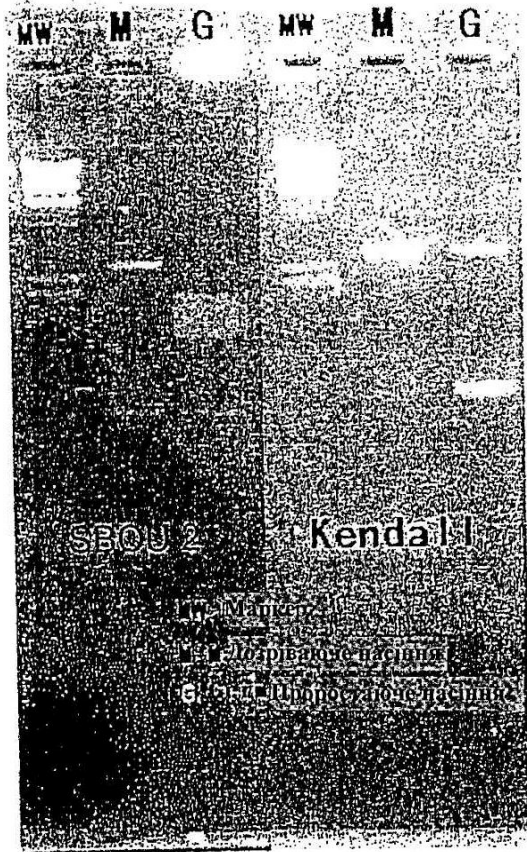
52



Фіг. 2

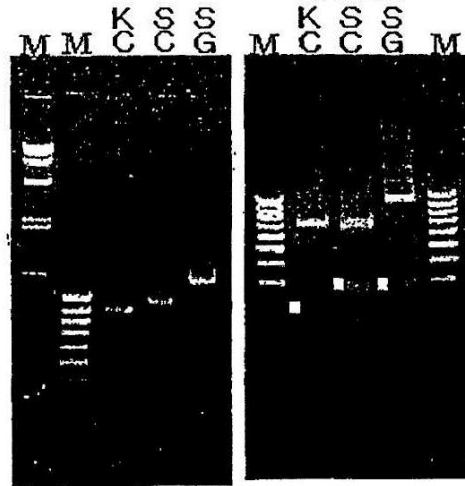


Фіг. 3



A

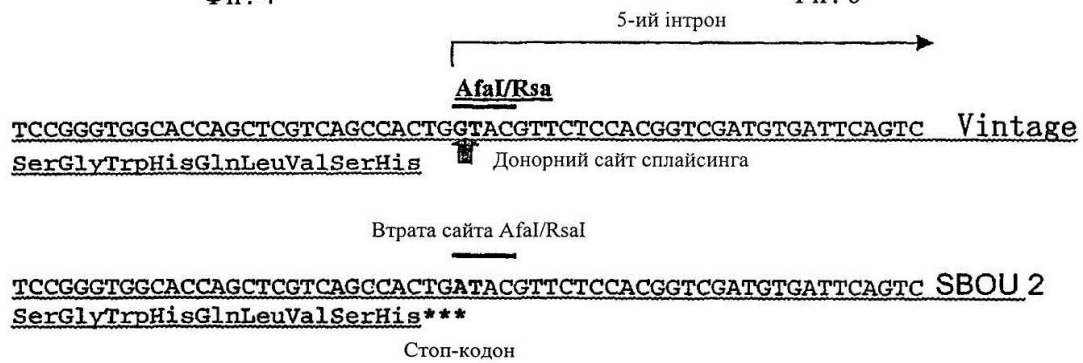
B

Продукт- розщеплення *StuI*

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

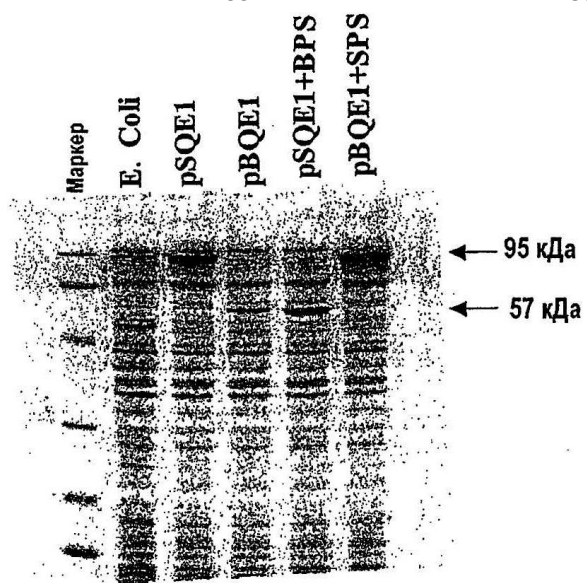
Fig. 4

Fig. 6

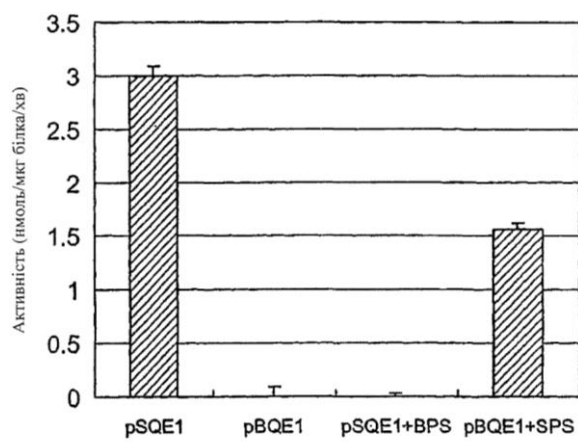


Нуклеотидні послідовності гена LOX-1, ділянки донорного сайту сплайсинга 5-го інтрона

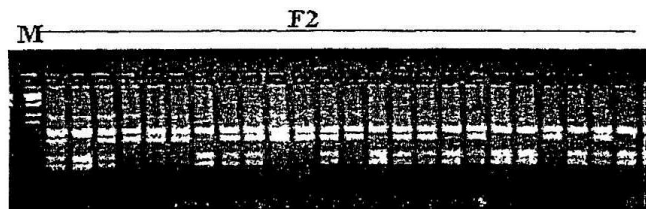
Fig. 5



Фиг. 7



Фиг. 8



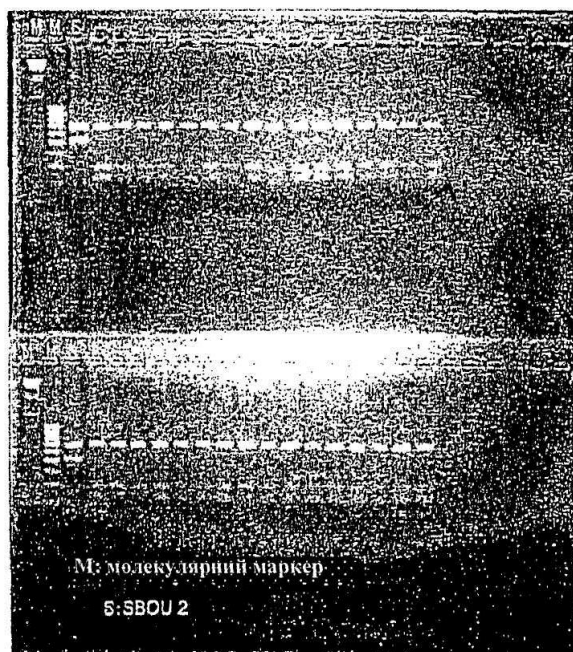
M: маркер

F2: Afal - спосіб аналізу ДНК F2 Kendall × SBOU2

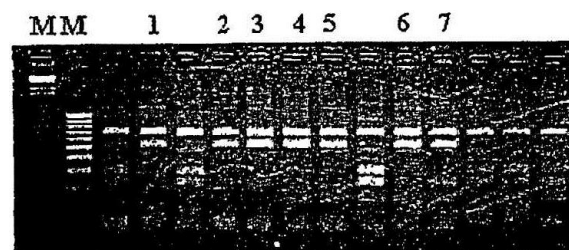
Фиг. 9

Номер індиві- дуума F2	Актив- ність LOX	AfaI- спосіб	JBC970	Номер індиві- дуума F2	Актив- ність LOX	AfaI- спосіб	JBC970
		CAPS	フザン			CAPS	フザン
1	+	KB	KB	73	+	KB	KB
2	+	KK	KK	74	+	KB	KB
3	+	KB	KB	75	+	KK	KK
4	-	BB	KB	76	+	KB	KB
5	-	BB	BB	77	+	KK	KK
6	-	BB	BB	78	-	BB	BB
7	+	KK	KB	79	+	KB	KB
8	+	KB	KB	80	-	BB	BB
9	+	KB	KB	81	-	BB	BB
10	-	BB	BB	82	+	KB	KB
11	-	BB	KB	83	+	KK	KK
12	+	KB	KB	84	+	KK	KK
13	-	BB	BB	85	-	BB	BB
14	+	KK	KB	86	-	BB	BB
15	+	KB	KB	87	-	BB	BB
16	+	KB	KB	88	+	KB	KB
17	+	KK	KB	89	-	BB	BB
18	+	KB	KB	90	-	BB	BB
19	+	KK	KB	91	+	KB	KB
20	+	KK	KB	92	+	KB	KB
21	-	BB	KB	93	+	KB	KB
22	+	KK	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	-	BB	BB
30	+	KB	KB	102	+	KB	KB
31	+	KB	KB	103	+	KB	KB
32	-	BB	KB	104	+	KB	KB
33	+	KB	KB	105	+	KB	KB
34	+	KB	KB	106	+	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	-	111	-	BB	BB
40	+	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	-	BB	BB	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	-	BB	BB	142	+	KB	KB
71	+	KB	KB	143	+	KB	KB
72	-	BB	BB	144	+	KB	KB

Fig. 10

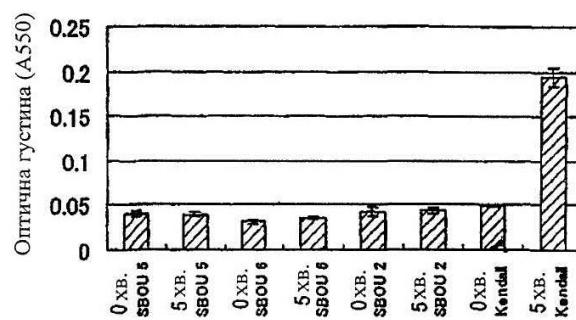


Фиг. 11

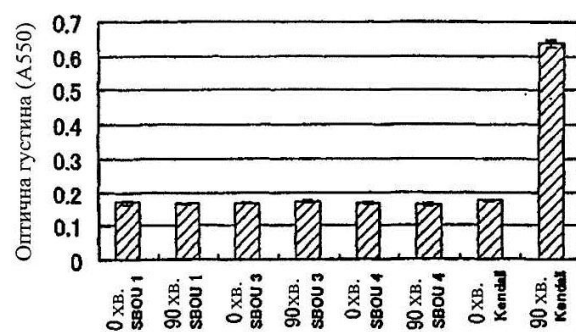


M: маркер,
1 и 5: SBOU 2, 2: SBOU 5, 3: SBOU 6
4: SBOU 1, 6: SBOU 3, 7: SBOU 4

Фиг. 12

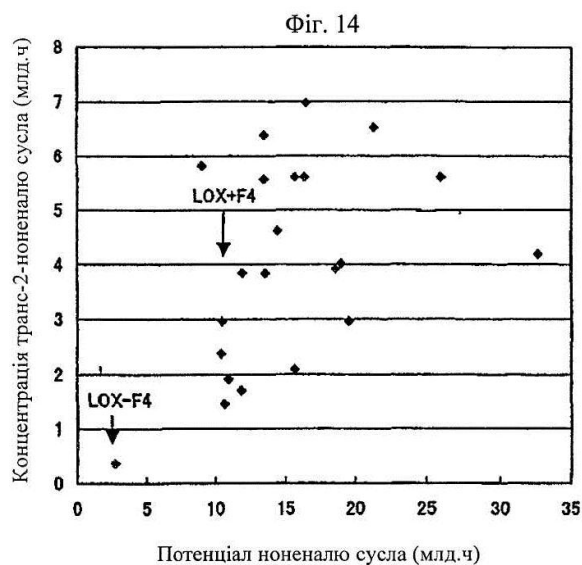


Фиг. 13A



Фиг. 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(ЕВС)	2,1	2,2
Колір після варіння (ЕВС)	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



Фіг. 15