

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292415** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.02

(22) Дата подачи заявки
2021.03.01

(51) Int. Cl. *A01H 5/10* (2018.01)
A01H 6/46 (2018.01)
C07K 14/415 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) РАСТЕНИЯ ЯЧМЕНЯ С ВЫСОКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРЕДЕЛЬНОЙ ДЕКСТРИНАЗЫ

(31) **20160355.2**

(32) **2020.03.02**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/055053**

(87) **WO 2021/175786 2021.09.10**

(71) Заявитель:
КАРЛСБЕРГ А/С (DK)

(72) Изобретатель:

**Олсен Оле, Лок Финн, Кнудсен Сорен,
Марри Лусна, Стрибек Александр,
Педас Пай Росагер, Куеста-Селио
Хосе Антонио, Томсен Ханне, Брауне
Катаржина Бирч (DK)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)**

(57) В изобретении предлагаются растения ячменя или их части, обладающие высокой активностью предельной декстриназы. В частности, предлагаются растения ячменя, несущие мутацию в гене HvLDI. Кроме того, описаны растительные продукты, изготовленные из указанных растений ячменя или их частей, а также способы их изготовления.

202292415

A1

A1

202292415

РАСТЕНИЯ ЯЧМЕНЯ С ВЫСОКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРЕДЕЛЬНОЙ ДЕКСТРИНАЗЫ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области обеспечения растений ячменя с высокой активностью свободной предельной декстриназы. В частности, изобретение относится к растениям ячменя, дающим зерно с высокой активностью свободной предельной декстриназы. Зерно таких растений являются выгодными для производства жидких экстрактов на основе ячменя, т.е. сусла, с увеличенным количеством сбраживаемых сахаров. Изобретение также относится к способам производства напитков на основе ячменя, например, пива, виски, водки или мальтины, а также к продуктам, приготовленным из растений ячменя по изобретению.

Предпосылки создания изобретения

Прорастание является начальным этапом процесса, посредством которого растение вырастает из семени. Для этого зерно должно контролировать множество ферментов. Некоторые ферменты участвуют в расщеплении крахмала в эндосперме на мальтозу и глюкозу, которые, в свою очередь, служат источником энергии для зародыша растения. В этом же процессе продуцируются сбраживаемые сахара, которые могут быть извлечены из пророщенного зерна или солода и использованы дрожжами для выработки спирта во время пивоварения.

Крахмал представляет собой углевод, состоящий из двух форм цепей глюкозы: в основном линейной амилозы и разветвленного амилопектина. Линейные части амилозы и амилопектина могут деградировать на сбраживаемые сахара под действием различных классов амилаз. Однако амилазы обычно не способны расщеплять амилопектин вокруг его точек ветвления. Таким образом, активности амилаз являются недостаточными для достижения эффективного высвобождения ферментируемых сахаров из крахмала.

Предельная декстриназа (LD), гликозидгидролаза, катализирует гидролиз точек ветвления крахмала, в результате чего образуются линейные фрагменты крахмала, тем самым увеличивая доступность субстрата для амилаз. LD специфически катализирует гидролиз альфа-1,6-связей, например, в амилопектине или разветвленных декстринах. Гидролитическое действие этого фермента приводит к образованию линейных альфа-

1,4-связанных цепей глюкозы, которые могут интенсивно деполимеризоваться до глюкозы и мальтозы под влиянием комбинированного действия альфа- и бета-амилаз.

Считается, что активность LD контролируется по меньшей мере частично ее ингибитором, ингибитором предельной декстриназы (LDI). Считается, что LDI связывает и инактивирует LD.

Низкий уровень активности LD обычно приводит к низкой деградации крахмала, что является благоприятным во время налива зерна и позволяет накапливать достаточные уровни крахмала в зерне. В процессах пивоварения экстракты проросшего зерна ячменя или солода используют в качестве субстрата для дрожжевого брожения, и обычно желательны экстракты, содержащие высокие уровни сбраживаемых сахаров. Без действия LD разветвленные декстрины и амилопектин не могут эффективно ферментироваться дрожжами.

В литературе было показано, что понижающее регулирование LDI антисмысловыми препаратами в растениях ячменя оказывает сильное влияние на здоровье зерна ячменя, о чем свидетельствует более низкая масса зерна, уменьшение количества гранул крахмала на зерно ячменя и изменение синтеза крахмала, в том числе повышение соотношений амилозы к амилопектину, изменения в архитектуре амилопектина, проявляющиеся изменением длины разветвленной цепи амилопектина (больше цепей из 9-15 остатков, но меньше длинных цепей из 30-60 остатков) и снижение уровня мелких гранул крахмала В-типа (см. Y. Stahl et al. 2004).

Взаимодействие между LD и LDI изучали с использованием кристаллической структуры комплекса LD-LDI ячменя. Были проведены исследования связывания *in vitro* мутантов LDI и LD, 4 различных положения в LDI были мутированы и показали увеличение K_D от умеренного до значительного (см. M Moller et al. 2015), однако ни один из этих мутантов не был тестирован *in vivo* и поэтому невозможно оценить, будут ли влиять мутации на здоровье зерна, или будут ли результаты *in vitro* транслироваться в *in vivo* эффекты на уровни сбраживаемых сахаров в зерне.

Краткое описание изобретения

Целью настоящего изобретения является обеспечение растения ячменя с зерном, обладающими высокой активностью LD, особенно во время прорастания и при подвергании соложению, при этом указанные растения ячменя в то же время являются здоровыми и, например, имеют урожайность и массу зерна, сравнимые с растениями

ячменя дикого типа. Такие растения ячменя были бы очень полезны в производстве напитков на основе ячменя/солода, таких как пиво.

Растения ячменя с зерном, обладающим высокой активностью LD, применимы в производстве напитков на основе ячменя/солода, таких как пиво, виски, водка или мальтина. Одним из преимуществ является то, что водные экстракты, такие как сусло, приготовленные из зерна и/или солода растений ячменя, обладающих высокой активностью LD, имеют высокое содержание сбраживаемых сахаров. Таким образом, путем использования зерна и/или солода по изобретению, необходимость в добавлении экзогенной предельной декстриназы или пуллулазы во время затирания может быть снижена или даже полностью отменена. Кроме того, сбраживание водного экстракта, имеющего высокое содержание сбраживаемых сахаров, является преимуществом во время пивоварения, поскольку это увеличивает количество пива, производимого на количество используемого зерна, и увеличивает ABV% (объемное содержание алкоголя), приведенное к гектолитру на массу зерна. Кроме того, зерно и/или солод из растений ячменя по изобретению, имеющих повышенную активность свободной предельной декстриназы *Hordeum vulgare* (HvLD), можно использовать в процессах соложения, при этом время прорастания сокращается, как описано, например, в WO 2018/001882.

Удивительным образом настоящее изобретение обеспечивает растения ячменя, несущие мутацию в гене *LDI*, при этом растение является здоровым и имеет урожай зерна, размер зерна и длину разветвленной цепи амилопектина зерна, сравнимые с растениями ячменя дикого типа, но которые в то же время обладают высокой активностью LD. Такие растения ячменя можно применять в качестве сырья для приготовления экстрактов с высоким содержанием сбраживаемых сахаров.

В частности, в изобретении показано, что определенные мутации в гене ингибитора предельной декстриназы *Hordeum vulgare* (HvLDI) кодируют мутированные полипептиды HvLDI, которые имеют пониженное связывание с HvLD *in vitro*. Пониженная способность связывать HvLD приводит к увеличению свободной LD и, следовательно, более высокой активности LD *in vivo*, что, в свою очередь, приводит к более высокому содержанию сбраживаемых сахаров в водных экстрактах, приготовленных с использованием зерна растения ячменя, несущего мутацию по настоящему изобретению в полипептиде HvLDI. Важно отметить, что в то же время у растений ячменя, несущих мутацию по изобретению в гене *HvLDI*, не наблюдалось

различия в размере зерна, длине разветвленной цепи амилопектина зерна и урожайности зерна.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает растение ячменя или его часть, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене *HvLDI*, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где мутация представляет собой одну из следующих мутаций:

а. миссенс-мутация, приводящая к замене пролина на другую аминокислоту в одном или нескольких петлевых участках HvLDI, где петлевые участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 25-44, и аминокислот, соответствующих положениям 56-62, и аминокислот, соответствующих положениям 77-78, и аминокислот, соответствующих положениям 91-111, и аминокислот, соответствующих положениям 124-147 в SEQ ID NO:1; или

б. миссенс-мутация, приводящая к замене отрицательно заряженной аминокислоты на неотрицательно заряженную аминокислоту в одном или нескольких альфа-спиральных участках wt HvLDI, где альфа-спиральные участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 45-55, и аминокислот, соответствующие положениям 63-76, и аминокислот, соответствующих положениям 79-90, и аминокислот, соответствующих положениям 112-123 в SEQ ID NO:1.

Изобретение дополнительно обеспечивает растительные продукты, такие как зерна, солод, сусло или напитки, приготовленные из растений ячменя по изобретению.

Кроме того, раскрыты способы приготовления солода, при этом указанные способы могут включать следующие стадии:

- а. обеспечение зерна растения ячменя по изобретению;
- б. замачивание и проращивание указанного зерна в предварительно определенных условиях;
- с. необязательно сушку указанного проросшего зерна.

Также, раскрыты способы получения водного экстракта, при этом указанные способы могут включать следующие стадии:

- а. обеспечение зерна растения ячменя по изобретению и/или солода, приготовленного из такого растения ячменя;
- б. приготовление водного экстракта указанного зерна и/или указанного солода, например, сусла.

Кроме того, раскрыты способы получения напитка, при этом указанные способы могут включать следующие стадии:

- а. обеспечение зерна растения ячменя по изобретению и/или солода, приготовленного из такого растения ячменя, и/или водного экстракта, приготовленного соответственно из такого растения ячменя и/или солода;
- б. переработку указанного водного экстракта в напиток, т.е. путем сбраживания или смешивания с другими компонентами напитка.

Кроме того, раскрыты способы получения растений ячменя в соответствии с изобретением, при этом указанный способ включает следующие стадии:

- а. обеспечение зерна ячменя; и
- б. подвергание указанного зерна ячменя случайному мутагенезу;
- с. отбор зерна ячменя или его частей, несущих мутированный ген *HvLDI*, кодирующий мутантный полипептид *HvLDI*, несущий одну из следующих мутаций:
 - i. миссенс-мутация, приводящая к замене пролина на другую аминокислоту в одном или нескольких петлевых участках *HvLDI*, где петлевые участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положению 25-44, и аминокислот, соответствующих положению 56-62, и аминокислот, соответствующих положению 77-78, и аминокислот, соответствующих положению 91-111, и аминокислот, соответствующих положению 124-147 в SEQ ID NO: 1; или
 - ii. миссенс-мутация, приводящая к замене отрицательно заряженной аминокислоты на неотрицательно заряженную аминокислоту в одном или нескольких альфа-спиральных участках *wt HvLDI*, где альфа-спиральные участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положению 45-55, и аминокислот, соответствующих положению 63-76, и аминокислот, соответствующих положению 79-90, и аминокислот, соответствующих положению 112-123 в SEQ ID NO: 1.

Описание чертежей

Фигура 1: показана способность *HvLDI* дикого типа (*wt*) или мутантного *HvLDI* ингибировать активность *wt HvLDI* в анализе *in vitro*. А) *wt LDI* (без мутации), В) мутантный *HvLDI* (P60L), С) мутантный *HvLDI* (P60S), D) мутантный *HvLDI* (V66M) и Е) мутантный *HvLDI* (E68K). По Y-оси показана % активность *HvLD*. По X-оси показано количество (мкМ) *wt HvLDI* или мутантного *HvLDI*, используемого в анализе *in vitro*. Способность *wt HvLDI* и мутантного *HvLDI* ингибировать рекомбинантную экспрессируемую *HvLD* оценивали по количеству хромофора, высвобождаемого во

время анализа. Количество высвобождаемого во время анализа хромофора сравнивали с количеством, высвобождаемым полностью активной HvLD и использовали для расчета сохраняющейся активности. Строили график зависимости активности от используемой в анализе концентрации HvLDI, и данные аппроксимировали к сигмоидальной кривой отклика.

Фигура 2: показана активность гидролитических ферментов в зерне, пророщенном в течение 72 ч из мутантных растений ячменя HENZ-16a (P60S) и HENZ-18 (V66M), а также их контроля Paustian, и для мутантного растения ячменя HENZ-31 (E68K), а также его контроля Planet. Зерно проращивали в соответствии с протоколом проращивания, описанным в примере 3. В качестве дополнительного контроля в эксперимент включали EBC19. А) показывает общее количество альфа-амилазы. В) показывает общее количество бета-амилазы. С) показывает общее количество предельной декстриназы и свободной предельной декстриназы, а также соотношение между свободной предельной декстриназой и общей предельной декстриназой в %.

Фигура 3: показывает активность гидролитических ферментов в соложенном зерне Flex-Malt из мутантного растения ячменя HENZ-16a (P60S) и его контроля Paustian, и для мутантного растения ячменя HENZ-31 (E68K) и его контроля Planet. Зерно солодили в соответствии со способом, описанным в примере 5. А) показывает общее количество альфа-амилазы. В) показывает общее количество бета-амилазы. С) показывает общее количество предельной декстриназы и свободной предельной декстриназы, а также соотношение между свободной предельной декстриназой и общей предельной декстриназой в %.

Фигура 4: показывает активность гидролитических ферментов в соложенном зерне VLB из мутантного растения ячменя HENZ-16a (P60S) и его контроля Paustian. Зерно VLB солодили в соответствии с примером 6. Солод Pilsner был включен в эксперимент в качестве дополнительного контроля. А) показывает общее количество альфа-амилазы. В) показывает общее количество бета-амилазы. С) показывает общее количество предельной декстриназы и предельной свободной декстриназы, а также соотношение между предельной свободной декстриназой и общей предельной декстриназой в %.

Фигура 5: показывает кинетические измерения в Flex-соложенном зерне. Закрашенные кружки и треугольники показывают количество свободной предельной декстриназы и общее количество предельной декстриназы, соответственно, в HENZ-16a (P60S). Пустые кружки и треугольники показывают количество свободной

предельной декстриназы и общее количество предельной декстриназы, соответственно, в Paustian.

Фигура 6: показывает анализ на сахар в сусле из Flex-соложенного HENZ-16a (P60S), Paustian и EBC19. А) показывает количество (PPM, частей на миллион) общих сбраживаемых сахаров (TFS), то есть фруктозы, сахарозы, глюкозы, мальтозы и мальтотриозы. Цифры над столбцами представляют общее количество TFS. В) показывает количество индивидуальных сахаров, присутствующих в различных суслях. Цифры над столбцами представляют % различие между HENZ-16a (P60S) и Paustian.

Фигура 7: показывает анализ на сахара в сусле из VLB-соложенного HENZ-16a (P60S), Paustian и EBC19, а также солода Pilsner. А) показывает количество (PPM) общих сахаров (TFS), то есть фруктозы, сахарозы, глюкозы, мальтозы и мальтотриозы. Цифры над столбцами представляют общее количество TFS. Сусло из VLB-соложенного зерна HENZ-16a (P60S) содержит на 7,2% больше TFS по сравнению с суслом из VLB-соложенного зерна из Paustian. В) показывает количество индивидуальных сахаров, присутствующих в сусле из VLB-соложенного HENZ-16a (P60S) и Paustian. Цифры над столбцами представляют % различие между HENZ-16a (P60S) и Paustian.

Фигура 8: А) и С) показывают анализ распределения амилопектина по длине цепи в зерне из растений ячменя HENZ-16a (P60S) и HENZ-31, Planet и Paustian. В) и D) показывают различие в площади пика между мутантным растением ячменя и его контролем (Denmark, 2017). HvLDI-мутантные растения ячменя и контрольные растения выращивали на соседних участках в Дании в сезоне 2017 г. Можно сделать вывод, что нет существенного различия в DP между HvLDI-мутантными растениями ячменя (HENZ-16a и HENZ-31) по сравнению с их соответствующими контролями. DP: степень полимеризации.

На фигуре 9 А) и С) показан анализ распределения амилопектина по длине цепи в зерне из растений ячменя HENZ-16a и HENZ-31. В) и D) показывают различие в площади пика между мутантным растением ячменя и его контролем (Новая Зеландия, 2017-18 гг.). HvLDI-мутантные растения ячменя и контрольные растения выращивали на соседних участках в Новой Зеландии в сезоне 2017/2018 гг. Можно сделать вывод, что нет существенного различия в DP между HvLDI-мутантными растениями ячменя (HENZ-16a и HENZ-31) и их соответствующими контролями. DP: степень полимеризации.

Подробное описание изобретения

Определения

Используемый в настоящем документе термин «а» может означать один или несколько в зависимости от контекста, в котором он используется.

Используемый в настоящем документе термин «аэрация» относится к подаче к конкретному материалу газа, содержащего кислород, например, чистый кислород или воздух. Аэрацию водного раствора (например, воды) предпочтительно проводят путем пропускания указанного газа через воду, например, путем введения газа в донную часть и/или в нижнюю часть емкости, содержащей водный раствор. Как правило, газ диффундирует через водный раствор и покидает водный раствор через верхнюю часть водного раствора. Аэрация зерна ячменя во время выдержки на воздухе может быть осуществлена, например, путем пропускания газа через слой зерна ячменя и/или пропускания потока указанного газа над поверхностью слоя зерна ячменя.

Используемый в настоящем документе термин «аминокислота» относится к протеиногенной аминокислоте. Предпочтительно протеиногенная аминокислота представляет собой одну из 20 аминокислот, кодируемых стандартным генетическим кодом. Для обозначения аминокислот используются однобуквенные и трехбуквенные коды IUPAC.

Термин «приблизительно» при его использовании в настоящем документе по отношению к числовым значениям, предпочтительно означает $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 1\%$.

Термин «амилоза» относится к гомополимерам α -D-глюкозы. Амилоза имеет линейную молекулярную структуру, так как ее глюкозные звенья почти исключительно связаны альфа-1,4-гликозидными связями.

Термин «амилопектин» относится к гомополимерам α -D-глюкозы. Молекулы амилопектина часто содержат альфа-1,6-гликозидные связи. Они вводят точки ветвления в иные альфа-1,4-связанные цепи глюкозы, что приводит к образованию кластеров параллельных цепей, появляющихся с регулярными интервалами вдоль оси молекулы.

Термин «выдержка на воздухе» относится к фазе в процессе прорастания, следующей за фазой, когда зерно замачивают в воде (водном растворе). В фазе выдержки на воздухе из зерна вытекает вода, и зерну дают отдохнуть. Во время этой стадии предпочтительно поддерживать влажность зерна выше 20%, более предпочтительно выше 30%, еще более предпочтительно выше 40%. В некоторых вариантах осуществления во время выдержки на воздухе зерно подвергают аэрации. Предпочтительно во время выдержки на воздухе через зерно пропускают влажный

воздух или влажный кислород. Температура может представлять собой любую подходящую температуру, предпочтительно температуру поддерживают в интервале 20-28°C.

Термин «ячмень» в отношении процесса изготовления напитков на основе ячменя, таких как пиво, особенно при использовании для описания процесса соложения, означает зерно ячменя. Во всех других случаях, если не указано иное, «ячмень» означает растение ячменя (*Hordeum vulgare*), включая любую селекционную линию, сорт или разновидность, тогда как частью растения ячменя может быть любая часть растения ячменя, например, любая ткань или клетки.

Термин «другая аминокислота» охватывает протеиногенные аминокислоты, такие как одна или несколько из 20 аминокислот, кодируемых стандартным генетическим кодом.

Используемый в настоящем документе термин «DP» или «степень полимеризации» указывает количество альфа-1,4-связанных единиц глюкозы в боковых цепях амилопектина.

Используемый в настоящем документе термин «сбраживаемые сахара» относится к любому сахару, который микроорганизм может использовать или сбраживать. В частности, сбраживаемые сахара представляют собой моносахариды, дисахариды и короткие олигосахариды, включая, но без ограничения, глюкозу, фруктозу, мальтозу, мальтотриозу и сахарозу, которые могут сбраживаться под действием микроорганизмов, в частности, дрожжей или лактобактерий, с образованием этанола или молочной кислоты.

Используемый в настоящем документе термин «общие сбраживаемые сахара» или «TFS» относится к фруктозе, сахарозе, глюкозе, мальтозе и мальтотриозе. Таким образом, количество TFS равно общему количеству фруктозы, сахарозы, глюкозы, мальтозы и мальтотриозы.

Используемый в настоящем документе термин «предельная декстриназа» описывает гидролазу сахара, относящуюся к классу ферментов EC 3.2.1.142. Фермент представляет собой крахмал-разветвляющий фермент, который катализирует гидролиз 1,6-альфа-D-глюкозидных связей в альфа- и бета-предельных декстринах амилопектина и гликогена, в амилопектине и пуллулане. Ожидается, что в процессах затираания наличие свободной предельной декстриназы будет влиять на высвобождение сбраживаемых сахаров из крахмала, особенно если крахмал имеет высокую степень ветвления (см., например, Calum et al. 2004 J Inst Brewing 110(4): 284-296). В частности,

предельная декстриназа может представлять собой полипептид с последовательностью, доступной под номером доступа UniProt Q9FYY0, или его функциональный гомолог, обладающий по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95% идентичностью последовательности.

Используемый в настоящем документе термин «ингибитор предельной декстриназы» или «LDI» описывает полипептид, который связывается и предотвращает ферментативное действие предельной декстриназы крахмал-разветвляющего фермента, см., например, Y Stahl et al. 2007 Plant Science 172(3): 452-561.

Используемый в настоящем документе термин «активность свободной предельной декстриназы» или «активность свободной LD» означает активность предельной декстриназы, которая не связана ингибитором предельной декстриназы. Когда предельная декстриназа и ингибиторы предельной декстриназы связаны вместе в комплексе, предельная декстриназа не может проявлять свой ферментативный эффект. Тогда как предельная декстриназа, не связанная с ингибитором предельной декстриназы, является свободной и может проявлять свою ферментативную активность. Если не указано иное, термин «активность предельной декстриназы» относится к «активности свободной предельной декстриназы».

Используемый в настоящем документе термин «общая предельная декстриназа» представляет как свободные предельные декстриназы, которые не связаны ингибиторами предельных декстриназ, так и инактивированные предельные декстриназы, которые связаны ингибиторами предельных декстриназ. Таким образом, общая предельная декстриназа относится как к связанным, так и к несвязанным формам предельных декстриназ.

Используемый в настоящем документе термин «температура клейстеризации» относится к максимальной температуре температурного диапазона, в котором крахмал теряет свою полукристаллическую структуру в воде под воздействием тепла и образует гель. Предпочтительно температуру клейстеризации определяют, как описано в примере 4 ниже. Ссылка на знак, имеющий конкретную температуру клейстеризации, относится к злаку, содержащему крахмал, с указанной температурой клейстеризации.

Используемый в настоящем документе термин «проросшее зерно» относится к зерну, имеющему видимый росток.

Используемый в настоящем документе термин «иницирование прорастания» относится к моменту времени, когда зерно ячменя с содержанием воды менее 15% контактируют с достаточным количеством воды для иницирования прорастания.

Термин «зерно» определяется как зерновка злаков, также называемая как внутреннее семя. Кроме того, ядро может содержать нижнюю цветковую чешую и верхнюю цветковую чешую. У большинства сортов ячменя нижняя цветковая чешуя и верхняя цветковая чешуя прирастают к зерновке и являются частью ядра после обмолота. Однако встречаются и голозерные сорта ячменя. У них зерновка не имеет нижней цветковой чешуи и верхней цветковой чешуи, и обмолачивается свободно, как у пшеницы. Термины «зерно» и «ядро» используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

Используемый в настоящем документе термин «соложение» относится к контролируемому проращению зерна злаков (в частности, зерна ячменя), происходящему в контролируемых условиях окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления «соложение» может дополнительно включать стадию сушки указанного проросшего зерна злаков, т.е. сушку в печи. Процесс соложения индуцирует активность гидролитических ферментов, например, альфа-амилаз и предельной декстриназы.

Используемый в настоящем документе термин «солод» относится к зерну злаков, которые были соложены.

«Затирание» представляет собой инкубацию молотого солода (например, зеленого солода или высушенного в печи солода) и/или непроросшего зерна злаков в воде. Затирание предпочтительно проводят при определенной температуре (температурах) и в определенном объеме воды. Этот процесс позволяет экстрагировать сахара, олиго- и полисахариды, белки и другие соединения солода и/или зерен, и обеспечивает возможность ферментативного гидролиза олиго- и полисахаридов (особенно крахмала) в экстракте до сбраживаемых сахаров.

Используемый в настоящем документе термин «миссенс-мутация» относится к мутации/мутациям в нуклеотидной последовательности, приводящей к замене одной аминокислоты на другую в полипептиде, кодируемом указанной нуклеотидной последовательностью.

«Мутации» включают делеции, вставки, замены, трансверсии и точечные мутации в кодирующих и/или некодирующих областях гена. Делеции могут быть всего гена или только части гена. Точечные мутации могут касаться изменений одной пары оснований и могут приводить к преждевременным стоп-кодонам, мутациям сдвига рамки считывания, мутации сайта сплайсинга или аминокислотным заменам. Ген, содержащий мутацию, при сравнении с геном дикого типа может называться

«мутантным геном». В настоящем изобретении мутантный ген обычно кодирует полипептид с последовательностью, отличной от гена дикого типа, при этом указанный полипептид может называться «мутантным полипептидом». Мутантный полипептид может содержать аминокислотную замену, при этом такая замена может, например, быть описана как «аминокислота XXX в положении n была заменена на аминокислоту YYY», где XXX описывает аминокислоту в определенном положении (n) полипептида дикого типа, и YYY описывает аминокислоту, присутствующую в мутантном полипептиде в том же положении при выравнивании двух генов.

Используемый в настоящем документе термин «неполярная аминокислота» относится к аминокислотам с гидрофобными боковыми цепями. Предпочтительно неполярную аминокислоту выбирают из группы, состоящей из аланина, валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, тирозина и триптофана.

Используемый в настоящем документе термин «заряженная аминокислота» относится к аминокислотам с электрически заряженными боковыми цепями. Предпочтительно заряженную аминокислоту выбирают из группы, состоящей из аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Отрицательно заряженные аминокислоты предпочитают выбирать из группы, состоящей из аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Положительно заряженные аминокислоты предпочитают выбирать из группы, состоящей из аргинина, гистидина и лизина.

Используемый в настоящем документе термин «неотрицательно заряженная аминокислота» относится к аминокислотам с боковыми цепями, которые не заряжены отрицательно. Предпочтительно неотрицательно заряженную аминокислоту выбирают из группы, состоящей из аланина, валина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, тирозина, триптофана, аргинина, гистидина, лизина, серина, треонина, аспарагина, глутамин, цистеина, селеноцистеина, глицина и пролина.

Используемый в настоящем документе термин «полярная аминокислота» относится к аминокислотам с полярными, незаряженными боковыми цепями. Предпочтительно полярную аминокислоту выбирают из группы, состоящей из серина, треонина, аспарагина и глутамин.

Под термином «растительный продукт» подразумевается продукт, полученный в результате переработки растения или растительного материала. Таким образом, указанный растительный продукт может представлять собой, например, зеленый солод,

высушенный в печи солод, сусло, ферментированный или неферментированный напиток, пищевой продукт или кормовой продукт.

Используемый в настоящем документе термин «потомство» относится к любому растению, одним из предков которого является данное растение. Потомство включает не только прямое потомство конкретного растения, но также потомство через множество поколений, например, потомство через период до 100 поколений. Можно установить, является ли растение потомством данного родительского растения путем определения, несет ли указанное растение такую же мутацию(и) в гене *HvLDI*, что и указанное родительское растение. В дополнение к мутации(ям) в гене *HvLDI*, наличие дополнительного полиморфизма в генах, расположенных вблизи гена *HvLDI*, можно использовать для определения того, является ли растение потомством конкретного родительского растения. Наличие таких же полиморфизмов свидетельствует о том, что растение является потомком указанного родительского растения.

Используемый в настоящем документе термин «петлевые участки» относится к одной или нескольким последовательным группам аминокислот, соответствующим аминокислотам от положения 25 по 44 в SEQ ID NO:1, соответствующим аминокислотам от положения 56 по 62 в SEQ ID NO:1, соответствующие аминокислотам от положения 77 по 78 в SEQ ID NO:1, соответствующие аминокислотам от положения 91 по 111 в SEQ ID NO:1 и/или соответствующие аминокислотам от положения 124 по 147 в SEQ ID NO:1. Петлевые участки могут образовывать петлевую структуру, которая соединяет альфа-спиральные участки, описанные ниже.

Используемый в настоящем документе термин «альфа-спиральные участки» относится к одной или нескольким последовательным группам аминокислот, соответствующим аминокислотам от положения 45 по 55 в SEQ ID NO:1 и соответствующим аминокислотам от положения 63 по 76 в SEQ ID NO:1 и соответствующим аминокислотам от положения 79 по 90 в SEQ ID NO:1 и/или соответствующим аминокислотам от положения 112 по 123 в SEQ ID NO:1. Эти альфа-спиральные участки могут образовывать спиральную структуру.

Используемый в настоящем документе термин «идентичность последовательностей» описывает родство между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями, то есть последовательностью-кандидатом (например, мутантной последовательностью) и эталонной последовательностью (такой как последовательность дикого типа) на основе

их попарного выравнивания. Для целей настоящего изобретения степень идентичности между двумя аминокислотными последовательностями определяют с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), внедренного в программу Needle пакета программ EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), предпочтительно версии 5.0.0 или более поздней (доступна по адресу https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Используемые параметры представляют собой следующие: штраф за внесение пропуска 10, штраф за продление пропуска 0,5 и матрица замен EBLOSUM62 (EMBOSS версия 30 BLOSUM62). Выходные данные Needle, помеченные как «наиболее длительная идентичность» (полученные с использованием команды nobrief), применяют в качестве идентичности в процентах и рассчитывают следующим образом:

$$(\text{Идентичные остатки} \times 100) / (\text{Длина выравниваемого участка} - \text{Общее число пропусков в выравниваемом участке}).$$

Алгоритм Нидлмана-Вунша также используют для определения соответствия конкретной аминокислоты в последовательности, отличной от эталонной последовательности (например, природный вариант или галотип SEQ ID NO: 1), конкретному положению в SEQ ID NO: 1 (эталонная последовательность). Например, если природный вариант имеет две дополнительные аминокислоты на N-конце, положение 70 в природном варианте будет соответствовать положению 68 в SEQ ID NO:1.

Для целей настоящего изобретения идентичность последовательностей между двумя нуклеотидными последовательностями определяют с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, см. выше), внедренного в программу Needle пакета программ EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), предпочтительно версии 5.0.0 или более поздней. Использовали следующие параметры: штраф за внесение пропуска 10, штраф за продление пропуска 0,5 и матрица замен DNAFULL (версия EMBOSS NCBI NUC4.4). Выходные данные Needle, помеченные как «наиболее длительная идентичность» (полученные с использованием команды nobrief), применяют в качестве идентичности в процентах и рассчитывают следующим образом:

$$(\text{Идентичные дезоксирибонуклеотиды} \times 100) / (\text{Длина выравниваемого участка} - \text{Общее число пропусков в выравниваемом участке}).$$

Используемый в настоящем документе термин «крахмал» относится к композиции, состоящей из одной или обеих отдельных макромолекул: амилозы и амилопектина.

Используемый в настоящем документе термин «стоп-кодон» относится к триплету нуклеотидов в генетическом коде, который в мРНК приводит к терминации трансляции. Используемый в настоящем документе термин «стоп-кодон» также относится к триплету нуклеотидов в гене, кодирующем стоп-кодон в мРНК. Стоп-кодон в ДНК обычно имеет одну из следующих последовательностей: TAG, TAA или TGA.

Используемый в настоящем документе термин «HvLDI дикого типа» или «wt HvLDI» относится к гену ингибитора предельной декстриназы ячменя дикого типа или к полипептиду, кодируемому указанным геном. В природе существует несколько гаплотипов HvLDI, которые можно считать LDI дикого типа. Они также могут быть описаны как природные варианты эталонной последовательности HvLDI SEQ ID NO:1. Таким образом, термин «HvLDI дикого типа» охватывает группу wt HvLDI, включая описанные Fluang et al. 2014.

Под термином «сусло» подразумевают жидкий экстракт солода и/или зерна злаков, например, молотый солод и/или молотое зерно злаков, и необязательно дополнительное несоложеное сырье. Сусло обычно получают путем затирания, необязательно с последующим «промыванием» в процессе извлечения остаточных сахаров и других соединений из дробины после затирания с горячей водой. Промывку обычно проводят в фильтрационном чане, заторном фильтре или другом устройстве, позволяющем отделить экстрагированную воду от дробины. Сусло, полученное после затирания, обычно называется «первым суслом», тогда как сусло, полученное после промывания, обычно называется «вторым суслом». Если не указано иное, термин «сусло» может означать первое сусло, второе сусло или их комбинацию. При традиционном производстве пива сусло варят вместе с хмелем. Сусло без хмеля также может называться «сладким суслом», тогда как сусло, вареное с хмелем, может называться «вареным суслом» или просто суслом.

Используемый в настоящем документе термин «масса тысячи зерен» относится к общей массе тысячи (1000) зерен.

Ингибитор предельной декстриназы (LDI)

Настоящее изобретение обеспечивает растение ячменя или его части, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене *HvLDI* по изобретению, где указанный мутантный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид *HvLDI*.

Кодирующая нуклеотидная последовательность ингибитора предельной декстриназы *Hordeum vulgare* дикого типа (*HvLDI*) доступна под номером доступа DQ285564.1. Кодирующая нуклеотидная последовательность *HvLDI* также представлена в настоящем документе как SEQ ID NO:2. Специалисту в данной области будет понятно, что другие растения ячменя дикого типа содержат ген *HvLDI* с последовательностью, отличной от SEQ ID NO:2. Они также могут быть описаны как природные варианты эталонной последовательности *HvLDI* SEQ ID NO: 2.

Полипептид *HvLDI* доступен под номером доступа UniProt Q2V8X0. Полипептид wt *HvLDI* в контексте настоящего изобретения представляет собой полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO:1 или последовательность, которая по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 93%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 98% идентична последовательности SEQ ID NO:1, и где указанная последовательность содержит по меньшей мере аминокислоты, соответствующие положениям 60 и 68 в SEQ ID NO:1, а именно, пролин и глутаминовую кислоту, соответственно. Другими словами, аминокислоты, соответствующие аминокислотам 60 и 68 в SEQ ID NO:1, сохраняются в wt *HvLDI*.

Определение положения аминокислоты по отношению к полипептиду по изобретению сделано для SEQ ID NO:1 в качестве эталонной последовательности, но следует понимать, что последовательность полипептида по изобретению может в некоторой степени отличаться от последовательности полипептида SEQ ID NO: 1 (см., например, определение wt *HvLDI*). Таким образом, следует ли понимать, что после выравнивания между указанным полипептидом и эталонным полипептидом SEQ ID NO:1 аминокислота соответствует положению X в SEQ ID NO:1, если она совпадает с тем же положением.

В таблице 1A/1B представлены природные варианты дикого типа в конкретных положениях в SEQ ID NO:1. Например, положение 108 в SEQ ID NO:1 представляет собой Arg, и Wt галотип 2 имеет Thr в положении, соответствующем положению 108.

Таблица 1A. Полипептиды SEQ ID:1 (аминокислоты с 1 по 137 в SEQ ID NO:1)

Положение в SEQ ID NO:1	5	9	25	48	55	70	108	118	129
Аминокислота в SEQ ID NO:1	His	Val	Thr	His	Val	Cys	Arg	Ala	Cys
Wt гаплотип 1	Arg	Leu	Ala	-	-	-	-	Thr	-
Wt гаплотип 2	Arg	Leu	Ala	-	-	-	Thr	Thr	-
Wt гаплотип 3	Arg	Leu	Ala	Arg	-	-	-	Thr	-
Wt гаплотип 4	Arg	Leu	Ala	-	-	-	-	Thr	Phe
Wt гаплотип 5	Arg	Leu	Ala	-	-	-	-	Thr	-
Wt гаплотип 6	Arg	Leu	Ala	-	-	-	Thr	Thr	-
Wt гаплотип 7	Arg	Leu	-	-	-	-	-	-	-
Wt гаплотип 8	Arg	Leu	Ala	Arg	-	-	-	Thr	-
Wt гаплотип 9	Arg	Leu	Ala	-	-	Arg	-	-	-
Wt гаплотип 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wt гаплотип 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wt гаплотип 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wt гаплотип 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wt гаплотип 14	Arg	Leu	Ala	-	Phe	-	-	Thr	-
Wt гаплотип 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: соответствует той же аминокислоте, указанной в положении для SEQ ID NO:1

Таблица 1В. Полипептиды SEQ ID:1 (аминокислоты 138-147 SEQ ID NO:1)

[illegible]

Wt гаплотип 11	-	-	-	-	-	%	%	%	%	%
Wt гаплотип 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wt гаплотип 13	-	-	-	Val	Ala	-	-	-	Met	Val
Wt гаплотип 14	Val	Leu	Leu	-	-	-	Val	-	-	-
Wt гаплотип 15	Val	Leu	Leu	-	-	-	Val	-	Met	Val

-: соответствует той же аминокислоте, указанной в положении для SEQ ID NO:1

/: отсутствие аминокислоты

Полипептиды SEQ ID NO:1 с заменами, указанными в таблице 1A и 1B в настоящем документе выше, в контексте настоящего изобретения считаются полипептидами wt HvLDI.

В одном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид HvLDI по изобретению по меньшей мере на 90% идентичен, например, на 95% идентичен, например, на 98%, например, на 100% идентичен SEQ ID NO:1, за исключением аминокислот в положении 60 и/или 68.

Предлагаемая структура LDI описана в Stahl et al. 2004 и Moller et al. 2015. Считается, что LDI состоит из сигнального пептида и четырех альфа-спиральных участков, при этом альфа-спиральные участки соединены петлевыми участками. Петлевые участки могут быть выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 25-44, и аминокислот, соответствующих положениям 56-62, и аминокислот, соответствующих положениям 77-78, и аминокислот, соответствующих положениям 91-111, и аминокислот, соответствующих положениям 124-147 в SEQ ID NO:1. Альфа-спиральные участки могут быть выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 45-55, и аминокислот, соответствующих положениям 63-76, и аминокислот, соответствующих положениям 79-90, и аминокислот, соответствующих положениям 112-123 в SEQ ID NO:1. Сигнальный пептид соответствует аминокислотам с 1 по 24 в SEQ ID NO:1.

Кроме того, зрелые полипептиды HvLDI без сигнального пептида также считаются wt HvLDI, включая все полипептиды в таблице 1A и 1B без аминокислот, соответствующих положениям 1-24 в SEQ ID NO:1. В частности, зрелый полипептид SEQ ID NO:1 без аминокислот в положениях 1-24 в SEQ ID NO:1 считается wt HvLDI. Другими словами, полипептид, состоящий из аминокислот с 25 по 147 в SEQ ID NO:1, считается wt HvLDI.

Аминокислоты зрелого полипептида HvLDI без сигнального пептида могут быть описаны по отношению к аминокислотам HvLDI в SEQ ID NO:1. Таким образом,

положения аминокислот в зрелом полипептиде HvLDI можно рассчитать на основе положения аминокислот в SEQ ID NO:1 путем вычитания 24 аминокислот из положения аминокислот в SEQ ID NO:1. В частности, например, это относится к положениям аминокислот, используемым в работе Moller et al. 2015.

Одним из примеров в настоящем документе является то, что аминокислота в положении 60 полипептида HvLDI в SEQ ID NO:1 соответствует аминокислоте в положении 36 зрелого полипептида HvLDI. Другим примером в настоящем документе является то, что аминокислота в положении 66 полипептида HvLDI в SEQ ID NO:1 соответствует аминокислоте в положении 42 зрелого полипептида HvLDI. Другим примером в настоящем документе является то, что аминокислота в положении 68 полипептида HvLDI в SEQ ID NO:1 соответствует аминокислоте в положении 44 зрелого полипептида HvLDI.

Ген wt *HvLDI* представляет собой ген, кодирующий полипептид wt HvLDI. В частности, ген wt *HvLDI* может представлять собой нуклеотидную последовательность SEQ ID:2 или ее функциональный гомолог, имеющий по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 93%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 98% идентичную последовательность.

Предпочтительно ген wt *HvLDI* представляет собой ген, кодирующий полипептид wt HvLDI, который имеет по меньшей мере на 90%, например, по меньшей мере на 93%, например, по меньшей мере на 95%, например, по меньшей мере на 98% идентичную с SEQ ID NO:2 последовательность, при этом указанная последовательность содержит по меньшей мере нуклеиновую кислоту в положениях 966 и 990 в SEQ ID NO:2, а именно, С и G, соответственно. Более конкретно, полипептид, кодируемый геном wt *HvLDI*, предпочтительно содержит пролин в положении аминокислоты 60 в SEQ ID NO:1 и глутаминовую кислоту в положении аминокислоты 68 в SEQ ID NO:1.

Настоящее изобретение обеспечивает растение ячменя или его часть, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене *HvLDI*, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где мутация представляет собой одну из следующих мутаций:

а. миссенс-мутация, приводящая к замене пролина на другую аминокислоту в одном или нескольких петлевых участках HvLDI, где петлевые участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 25-44, и аминокислот, соответствующих положениям 56-62, и аминокислот, соответствующих

положениям 77-78, и аминокислот, соответствующих положениям 91-111, и аминокислот, соответствующих положениям 124-147 в SEQ ID NO:1; или

b. миссенс-мутацию, приводящую к замене отрицательно заряженной аминокислоты на неотрицательно заряженную аминокислоту в одном или нескольких альфа-спиральных участках wt HvLDI, где альфа-спиральные участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 45-55, и аминокислот, соответствующих положениям 63-76, и аминокислот, соответствующих положениям 79-90, и аминокислот, соответствующих положениям 112-123 SEQ ID NO:1.

В одном варианте осуществления указанный мутантный полипептид HvLDI является идентичным зрелому полипептиду wt HvLDI или его природным вариантам, за исключением мутации в указанном положении(ях).

Настоящее изобретение также обеспечивает растение ячменя или его части, где указанное растение ячменя несет одну или несколько мутаций в гене *HvLDI*, выбранных из группы, состоящей из:

a. мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 966 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2); и

b. мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 967 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2); и

c. мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 968 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2); и

d. мутации G на A в положении, соответствующем нуклеотиду 990 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2).

Миссенс-мутация, приводящая к замене пролина на другую аминокислоту

В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина на другую аминокислоту в одном или нескольких петлевых участках HvLDI. Замена пролина может быть на полярную аминокислоту или неполярную аминокислоту. В частности, это может быть замена пролина на серин или лейцин. Предпочтительно, чтобы замена пролина происходила в аминокислоте, соответствующей положению 60 SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина на другую аминокислоту в

одном или нескольких петлевых участках HvLDI, при этом петлевые участки выбирают из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 25-44, и аминокислот, соответствующих положениям 56-62, и аминокислот, соответствующих положениям 77-78, и аминокислот, соответствующих положениям 91-111, и аминокислот, соответствующих положениям 124-147 в SEQ ID NO:1.

В одном варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, при этом указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где петлевые участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 56-62, и аминокислот, соответствующих положениям 77-78, и аминокислот, соответствующих положениям 91-111 в SEQ ID NO:1.

В одном варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина в одном или нескольких петлевых участках wt HvLDI на полярную аминокислоту.

В одном варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина в аминокислоте, соответствующей положению 60 в SEQ ID NO:1, на другую аминокислоту.

В другом варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где указанный полипептид HvLDI содержит замену пролина на серин в одном или нескольких петлевых участках HvLDI.

В одном варианте осуществления предпочтительно, чтобы указанный мутированный ген *HvLDI* кодировал мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина в аминокислоте, соответствующей положению 60 в SEQ ID NO:1, на серин.

В одном варианте осуществления мутантный полипептид HvLDI по настоящему изобретению содержит или состоит из аминокислотной последовательности от положения 25 до 142 в SEQ ID NO: 3 или от положения 25 до 147 в SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина в одном или нескольких петлевых участках wt HvLDI на неполярную аминокислоту.

В одном варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина в одном или нескольких петлевых участках HvLDI на лейцин.

В другом варианте осуществления предпочтительно, чтобы указанный мутированный ген *HvLDI* кодировал мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина в аминокислоте, соответствующей положению 60 в SEQ ID NO:1, на лейцин.

В одном варианте осуществления мутантный полипептид HvLDI по настоящему изобретению содержит или состоит из аминокислотной последовательности от положения 25 до 142 в SEQ ID NO: 4 или от положения 25 до 147 в SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* содержит мутацию нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 966 эталонного гена *HvLDI* в SEQ ID NO:2.

В другом варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* содержит мутацию нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 967 эталонного гена *HvLDI* в SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* содержит мутацию нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотидам 966 и 967 эталонного гена *HvLDI* в SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* содержит мутацию нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 966 и/или 968 эталонного гена *HvLDI* в SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления растение ячменя по изобретению содержит мутантный ген *HvLDI*, кодирующий мутантный белок HvLDI, имеющий мутацию Pro60Ser в SEQ ID NO:1. Например, растение ячменя может содержать мутантный ген *HvLDI*, несущий мутацию С на Т нуклеотида 966 кодирующей *HvLDI* последовательности SEQ ID NO:2. Указанное растение ячменя может, например, представлять собой HENZ-16a или его потомство. HENZ-16a также может называться в настоящем документе как «HENZ-16». Например, растение ячменя может представлять собой растение ячменя HENZ-16a, идентифицированное, как описано в примере 1, или его потомство.

Для целей настоящей заявки на патент семена растения ячменя (*Hordeum vulgare*), обозначенного как «HENZ-16» (также называемого в настоящем документе «HENZ-16a»), были депонированы в NCIMB Ltd. Ferguson Building, Craibstone Estate,

Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA Scotland в соответствии с положениями Будапештского договора. Растение ячменя HENZ-16 было депонировано 12 февраля 2020 г. и получило номер доступа NCIMB 43581.

В одном варианте осуществления растение ячменя по изобретению представляет собой растение ячменя (*Hordeum vulgare*), депонированное 12 февраля 2020 г. в NCIMB под номером доступа NCIMB 43581 и обозначаемое как «HENZ-16», или его потомство. Таким образом, растение ячменя по изобретению может представлять собой растение ячменя HENZ-16, депонированное в NCIMB 12 февраля 2020 г. и имеющее номер доступа NCIMB 43581, или любое потомство растения ячменя, где потомство растения ячменя несет мутацию С на Т нуклеотида 966 *HvLDI*-кодирующей последовательности SEQ ID NO:2 и/или где ген *HvLDI* указанного растения ячменя кодирует мутантный белок HvLDI, содержащий мутацию Pro60Ser в SEQ ID NO:1.

Миссенс-мутация, приводящая к замене отрицательно заряженной аминокислоты на неотрицательно заряженную аминокислоту

В некоторых вариантах осуществления изобретения мутантный полипептид HvLDI содержит замену отрицательно заряженной аминокислоты на неотрицательно заряженную аминокислоту в одном или нескольких альфа-спиральных участках HvLDI. Замена отрицательно заряженной аминокислоты может быть произведена на положительно заряженную аминокислоту. В частности, это может быть замена отрицательно заряженной аминокислоты на лизин. Предпочтительно, чтобы замена отрицательно заряженной аминокислоты представляла собой аминокислоту, соответствующую положению 68 в SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену отрицательно заряженной аминокислоты в одном или нескольких альфа-спиральных участках HvLDI на неотрицательно заряженную аминокислоту. В одном варианте осуществления указанная отрицательно заряженная аминокислота представляет собой глутаминовую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену отрицательно заряженной аминокислоты в одном или нескольких альфа-спиральных участках HvLDI на

положительно заряженную аминокислоту. В одном варианте осуществления указанная отрицательно заряженная аминокислота представляет собой глутаминовую кислоту.

В одном варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену отрицательно заряженной аминокислоты в одном или нескольких альфа-спиральных участках HvLDI на лизин. В одном варианте осуществления указанная отрицательно заряженная аминокислота представляет собой глутаминовую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления альфа-спиральные участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 45-55, и аминокислот, соответствующих положениям 63-76, и аминокислот, соответствующих положениям 79-90, и аминокислот, соответствующих положениям 112-123 в SEQ ID NO:1.

В другом варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену глутаминовой кислоты, соответствующей аминокислоте в положении 68 в SEQ ID NO:1, на неотрицательно заряженную аминокислоту.

В еще одном варианте осуществления указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену глутаминовой кислоты, соответствующей аминокислотному положению 68 в SEQ ID NO:1, на лизин.

В одном варианте осуществления мутантный полипептид HvLDI по настоящему изобретению содержит или состоит из аминокислотной последовательности от положения 25 до 142 в SEQ ID NO: 6 или от положения 25 до 147 в SEQ ID NO: 6.

В одном варианте осуществления указанный мутированный ген HvLDI содержит мутацию нуклеотида G на A в положении, соответствующем нуклеотиду 990 эталонного гена *HvLDI* в SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления указанный мутированный ген HvLDI содержит мутацию нуклеотида C на T в положении, соответствующем нуклеотиду 966, и нуклеотида G на A в положении, соответствующем нуклеотиду 990 эталонного гена *HvLDI* в SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления указанный мутированный ген HvLDI содержит мутацию нуклеотида C на T в положении, соответствующем нуклеотиду 967, и нуклеотида G на A в положении, соответствующем нуклеотиду 990 эталонного гена *HvLDI* в SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления растение ячменя по изобретению содержит мутантный ген *HvLDI*, кодирующий мутантный белок HvLDI, имеющий мутацию Glu68Lys в SEQ ID NO:1. Например, растение ячменя может содержать мутантный ген *HvLDI*, несущий мутацию G на A нуклеотида 990 кодирующей *HvLDI* последовательности SEQ ID NO:2. Указанное растение ячменя может, например, представлять собой HENZ-31 или его потомство. Например, растение ячменя может представлять собой растение ячменя HENZ-31, идентифицированное, как описано в примере 1, или его потомство.

Для целей настоящей заявки на патент семена растения ячменя (*Hordeum vulgare*), обозначенного как «HENZ-31», были депонированы в NCIMB Ltd. Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA Scotland в соответствии с положениями Будапештского договора. Растение ячменя HENZ-31 было депонировано 12 февраля 2020 г. и получило номер доступа NCIMB 43582.

В одном варианте осуществления растение ячменя по изобретению представляет собой растение ячменя (*Hordeum vulgare*), депонированное 12 февраля 2020 г. в NCIMB под номером доступа NCIMB 43582 и обозначенное как «HENZ-31»; или его потомство. Таким образом, растение ячменя по изобретению может представлять собой растение ячменя HENZ-31, депонированное в NCIMB 12 февраля 2020 г. и имеющее номер доступа NCIMB 43582, или любое потомство растения ячменя, где потомство растения ячменя несет мутацию G на A нуклеотида 990 кодирующей *HvLDI* последовательности SEQ ID NO:2, и/или где ген *HvLDI* указанного растения ячменя кодирует мутантный белок HvLDI, содержащий мутацию Glu68Lys в SEQ ID NO:1.

Активность HvLDI

Как упоминалось выше, HvLDI способен связываться с HvLD и тем самым ингибировать активность HvLD. Активная HvLD способна расщеплять альфа-1-6 связи в разветвленных молекулах декстринов.

Способность HvLDI ингибировать HvLD *in vitro* можно измерить с помощью любого подходящего способа, известного специалисту в данной области. Для таких способов рекомбинантные HvLD и HvLDI могут быть изготовлены в соответствии с известными способами или приобретены у стандартных поставщиков. Коммерчески доступными анализами для оценки аффинности связывания между HvLD и HvLDI является, например, набор Pullulanase/Limit-Dextrinase Assay Kit от фирмы Megazyme, Ирландия.

Предпочтительный способ *in vitro* определения аффинности связывания между HvLDI и HvLD описан в примере 2.

Мутантный полипептид HvLDI, несущий мутацию по настоящему изобретению, обладает пониженной способностью ингибировать HvLD по данным оценки в соответствии с анализом в примере 2.

Мутантный полипептид HvLDI, несущий мутацию по настоящему изобретению, предпочтительно обладает по меньшей мере двукратно сниженной способностью ингибировать HvLD, например, по меньшей мере трехкратно сниженной способностью ингибировать HvLD по сравнению со способностью wt HvLDI ингибировать HvLD по данным измерения *in vitro*. В одном варианте осуществления настоящего изобретения мутированный HvLDI не способен полностью ингибировать активность HvLD по данным измерения *in vitro*.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения мутация в гене *HvLDI* по настоящему изобретению приводит к повышенной активности свободной HvLD по сравнению с геном *HvLDI* дикого типа.

Растение ячменя

Настоящее изобретение относится к растению ячменя или его частям, а также к продуктам из ячменя и способу их получения. Растение ячменя может представлять собой любое растение из видов *Hordeum vulgare*, включая любую селекционную линию, сорт или разновидность.

«Дикий ячмень», *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*, считается прародителем современных культурных форм ячменя. Одомашненные, но гетерогенные смеси ячменя называются местными сортами ячменя. Сегодня большинство местных сортов вытеснено в передовых технологиях в сельском хозяйстве чистопородными сортами. По сравнению с местными сортами современные сорта ячменя обладают многочисленными улучшенными свойствами (Nevo, 1992; Pelger et al., 1992).

В рамках настоящего изобретения термин «растение ячменя» включает любое растение ячменя, такое как местные сорта ячменя или современные сорта ячменя. Таким образом, изобретение относится к любому растению ячменя, содержащему мутацию в гене *HvLDI* по изобретению.

Однако предпочтительными растениями ячменя для использования в настоящем изобретении являются современные сорта ячменя или чистые линии. Неограничивающие примеры сортов ячменя, которые можно использовать в

настоящем изобретении, включают Planet, Paustian, Sebastian, Quench, Celeste, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Harrington, Klages, Manley, Schooner, Stirling, Clipper, Franklin, Alexis, Blenheim, Ariel, Lenka, Maresi, Steffi, Gimpel, Cheri, Krona, Camargue, Chariot, Derkado, Prisma, Union, Beka, Kym, Asahi 5, KOU A, Swan Hals, Kanto Nakate Gold, Hakata No. 2, Kirin - choku No. 1, Kanto late Variety Gold, Fuji Nijo, New Golden, Satukio Nijo, Seijo No. 17, Akagi Nijo, Azuma Golden, Amagi Nijpo, Nishino Gold, Misato golden, Haruna Nijo, Scarlett, Rosalina и Jersey, предпочтительно из группы, состоящей из Haruna Nijo, Sebastian, Quench, Celeste, Lux, Prestige, Saloon, Neruda и Power, предпочтительно из группы, состоящей из Paustian, Harrington, Klages, Manley, Schooner, Stirling, Clipper, Franklin, Alexis, Blenheim, Ariel, Lenka, Maresi, Steffi, Gimpel, Cheri, Krona, Camargue, Chariot, Derkado, Prisma, Union, Beka, Kym, Asahi 5, KOU A, Swan Hals, Kanto Nakate Gold, Hakata No. 2, Kirin - choku No. 1, Kanto late Variety Gold, Fuji Nijo, New Golden, Satukio Nijo, Seijo No. 17, Akagi Nijo, Azuma Golden, Amagi Nijpo, Nishino Gold, Misato golden, Haruna Nijo, Scarlett и Jersey, предпочтительно из группы, состоящей из Planet, Paustian, Haruna Nijo, Sebastian, Tangent, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Power, Quench, NFC Tipple, Barke, Class, Vintage, Applaus, Bowie, Broadway, Champ, Chanson, Charles, Chimbon, Cosmopolitan, Crossway, Dragoon, Ellinor, Embrace, Etoile, Evergreen, Flair, Highway, KWS Beckie, KWS Cantton, KWS Coralie, KWS Fantex, KWS Irina, KWS Josie, KWS Kellie, LG Diablo, LG Figaro, LG Nabuco, LG Tomahawk, Laureate, Laurikka, Lauxana, Luther, Odyssey, Ovation, Prospect, RGT Elysium, RGT Observer, RGT Planet, Rotator, Sarbi, Scholar, Subway или Golden Promise.

Растение ячменя может быть представлено в любой подходящей форме. Например, растение ячменя по изобретению может представлять собой жизнеспособное растение ячменя, высушенное растение, гомогенизированное растение или молотое ядро ячменя. Растение может представлять собой зрелое растение, зародыш, ядро, проросшее ядро, сложенное ядро, молотое сложенное ядро, молотое ядро или т.п.

Частями растений ячменя могут быть любые подходящие части растения, такие как зерна, зародыши, листья, стебли, корни, цветки или их фракции. Фракция может, например, быть частью ядра, зародыша, листа, стебля, корня или цветка. Части растений ячменя также могут представлять собой фракцию гомогената или фракцию молотого растения или ядра ячменя.

В одном варианте осуществления изобретения части растений ячменя могут представлять собой клетки указанного растения ячменя, такие как жизнеспособные

клетки, которые могут быть размножены *in vitro* в тканевых культурах. Однако в других вариантах осуществления части растений ячменя могут представлять собой жизнеспособные клетки, которые не способны созреть в целое растение ячменя, то есть клетки, которые не являются репродуктивным материалом.

Предпочтительно, чтобы растение ячменя не было получено исключительно с помощью преимущественно биологического процесса или являлось его потомством. Например, растение ячменя может содержать мутацию в гене *HvLDI*, где указанная мутация была индуцирована химическими и/или физическими агентами, такими как азид натрия.

Таким образом, растение ячменя может быть получено с помощью способа, включающего стадию индуцированного мутагенеза, или указанное растение ячменя может являться потомством растения, полученного с помощью способа, включающего стадию индуцированного мутагенеза. Указанный индуцированный мутагенез может представлять собой, например, обработку мутагенизирующим химическим соединением, таким как азид натрия.

Растение ячменя также может представлять собой растение ячменя, полученное методами генной инженерии, например, путем вставки мутированного гена *HvLDI* в геном хозяина с использованием плазмид, генетической рекомбинации или технологии Crisper/CAS-9. Предпочтительно, чтобы в таких растениях был нокаутирован ген *wt HvLDI*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения растение ячменя или его часть несет мутацию в гене *HvLDI* согласно изобретению.

В дополнение к мутации в гене *HvLDI* растение ячменя может содержать другие мутации.

Характеристики растений ячменя, несущих мутацию в гене *HvLDI*

Настоящее изобретение обеспечивает растения ячменя или их части, несущие мутацию в гене *HvLDI* по изобретению, при этом указанный мутантный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI. Одним из основных преимуществ таких растений ячменя является то, что зерно указанных растений ячменя по изобретению обладают повышенной активностью свободной HvLD по сравнению с растениями ячменя с геном *wt HvLDI*. Кроме того, солод, приготовленный из такого зерна ячменя, также имеет более высокий уровень активности свободной HvLD. Удивительно, что повышенная активность свободной HvLD хорошо коррелирует с концентрацией

сбраживаемых сахаров в сусле, приготовленном из зерна указанных растений ячменя, тогда как сусло, приготовленное из зерна ячменя с низким или нормальным уровнем активности свободной HvLD, в целом имеет низкую или нормальную концентрацию сбраживаемых сахаров. Таким образом, повышенная активность свободной HvLD является полезным признаком для производства ячменного сусла и пива.

Величину активности свободной HvLD в ячмене можно измерить любым подходящим способом, известным специалисту в данной области. Как правило, первой стадией является дробление одного или нескольких зерен ячменя, например, механическим способом для получения ячменной муки. Это может быть сделано с помощью любых полезных средств, например, с помощью гидравлического пресса и/или с помощью дробилки и/или мельницы, но конкретный способ механического измельчения имеет меньшее значение.

Одним неограничивающим примером полезного способа измерения активности свободной HvLD может быть экстракция полученной муки в кислом водном растворе, таком как малеиновая кислота, при pH 4,7 в течение 1 ч при 40°C. Активность свободной HvLD может быть проанализирована методом PullG6 от Megazyme.

Предпочтительный способ определения активности свободной HvLD в ячмене описан в примере 7.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанное растение ячменя или его части, несущие мутацию в гене *HvLDI* по изобретению, обладают более высокой активностью свободной HvLD по сравнению с растением ячменя или его частью, несущими ген *HvLDI*, кодирующий wt HvLDI, но в остальном того же генотипа, при культивировании в тех же условиях.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения растение ячменя или его части, или проросшее зерно, или солод, приготовленный из зерна растения ячменя по изобретению, несущие мутацию в гене *HvLDI* по изобретению, обладают активностью свободной HvLD, которая по меньшей мере на 20% выше по сравнению с активностью свободной HvLD, измеренной в солоде растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий wt HvLDI, но в остальном того же генотипа, при получении в тех же условиях. В некоторых вариантах осуществления указанная активность свободной HvLD по меньшей мере на 50% выше, например, по меньшей мере на 100% выше, например, по меньшей мере на 140% выше по сравнению с активностью свободной HvLD, измеренной в солоде растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий wt HvLDI, но в остальном того же генотипа, при получении в тех же условиях. В одном

варианте осуществления указанное зерно проращивали в течение 72 часов перед измерением.

Активность общей HvLD может быть определена с помощью любого применимого способа. Обычно такие способы включают инкубацию в условиях, при которых нарушается связывание между LDI и LD, с последующим определением активности LD. Одним неограничивающим примером измерения общей HvLD может являться экстракция полученной муки в окислительно-восстановительном реагенте, таком как дитиотреитол, при pH 4,7 в течение 1 ч при 40°C. Затем величину активности HvLD анализируют, как описано выше. Активность HvLD, определенная после инкубации с окислительно-восстановительным реагентом, будет отражать активность общей HvLD.

Предпочтительный способ определения активности общей HvLD описан в примере 7.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанное растение ячменя или его часть, несущие мутацию в гене *HvLDI* по изобретению, имеют более высокое отношение активности свободной к общей HvLD по сравнению с растением ячменя или его частью, несущими ген *HvLDI*, кодирующий wt HvLDI, но в остальном того же генотипа, при культивировании в тех же условиях. Отношение свободной к общей HvLD может быть представлено в виде отношения свободная/общая (%).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения растение ячменя или его части, или проросшее зерно, или его солод, несущие мутацию в гене *HvLDI* по изобретению, обладают % активностью свободной/общей HvLD, которая по меньшей мере на 20% выше по сравнению с % активностью свободной/общей HvLD, измеренной в солоде растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий HvLDI SEQ ID NO:1, но в остальном того же генотипа, при получении в тех же условиях. В некоторых вариантах осуществления указанная % активность свободной/общей HvLD по меньшей мере на 30% выше, например, по меньшей мере на 40% выше, например, по меньшей мере на 50% выше по сравнению с % активностью свободной/общей HvLD, измеренной в солоде растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий wt HvLDI, но в остальном того же генотипа, при получении в тех же условиях.

В одном варианте осуществления изобретения соотношение между свободной предельной декстриназой и общей предельной декстриназой составляет по меньшей

мере 35% в соложенном зерне Flex-Malt и по меньшей мере 60% в зерне, соложенном традиционным способом (например, солод, высушенный в печи).

Растения ячменя по настоящему изобретению обычно имеют внешний вид и урожайность зерна, сравнимые с растениями ячменя, которые не несут мутацию в гене *HvLDI*. Таким образом, зерно растения ячменя по изобретению также обычно имеет температуру клейстеризации, активность альфа-амилазы, активность бета-амилазы, распределение амилопектина по длине цепи, массу, размер, содержание белка, содержание воды и содержание крахмала, сравнимые с зерном растения ячменя дикого типа того же генотипа, выращенного в тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по настоящему изобретению обладает по существу такой же способностью к прорастанию по сравнению с зерном растения ячменя, которое не несет мутацию в гене *HvLDI* по изобретению. Например, в одном варианте осуществления зерно растения ячменя в соответствии с изобретением имеет по существу такой же показатель всхожести, рассчитанный через 3 дня с использованием уравнения $10 \cdot (x+y+z)/(x+2 \cdot y+3 \cdot z)$, где x обозначает количество прорастающего зерна, подсчитанное через 24 ч, y обозначает количество прорастающего зерна, подсчитанное через 48 ч, и z обозначает количество прорастающего зерна, подсчитанное через 72 ч, по сравнению с зерном от растения ячменя дикого типа того же генотипа, и полученного в сходных или тех же условиях. В другом варианте осуществления зерно растения ячменя по изобретению имеет по существу такую же всхожесть в процентах через 24 ч, 48 ч и 72 ч, рассчитанную с использованием количества проросшего зерна, подсчитанного через 24 ч, по отношению к общему количеству зерна через 24 ч, с использованием количества проросшего зерна, подсчитанного через 48 ч, по отношению к общему количеству зерна через 48 ч, и используя количество проросшего зерна, подсчитанного через 72 ч, по отношению к общему количеству зерна через 72 ч, по сравнению с зерном от растения ячменя дикого типа того же генотипа и полученного в сходных или тех же условиях. Например, в еще одном варианте осуществления зерно растения ячменя в соответствии с изобретением имеет по существу такую же чувствительность к воде, измеренную путем подсчета проросшего зерна после инкубации в течение 72 часов с 8 мл жидкости, по сравнению с проросшим зерном после инкубации в течение 72 часов с 4 мл жидкости, по сравнению с чувствительностью к воде зерна растения ячменя дикого типа того же генотипа, полученного в сходных или тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по настоящему изобретению имеет по существу такую же температуру клейстеризации (°C) по сравнению с зерном растения ячменя, не несущего мутацию в гене *HvLDI* по изобретению. Например, в одном варианте осуществления изобретение обеспечивает зерно растения ячменя, где крахмал указанного зерна имеет среднюю температуру клейстеризации, которая аналогична средней температуре клейстеризации крахмала зерна растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного в сходных или тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по настоящему изобретению обладает по существу такой же активностью альфа-амилазы, что и зерно растения ячменя, не несущего мутации в гене *HvLDI* по изобретению. В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает зерно растения ячменя, где активность альфа-амилазы указанного зерна является сходной с активностью альфа-амилазы в зерне растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного в сходных или тех же условиях. В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает солод, приготовленный из зерна растения ячменя, где активность альфа-амилазы в указанном солоде является сходной с активностью альфа-амилазы в солоде, приготовленном из зерна растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного и полученного в сходных или тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по настоящему изобретению обладает по существу такой же активностью бета-амилазы, что и зерно растения ячменя, не несущего мутацию в гене *HvLDI* по изобретению. В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает зерно растения ячменя, где активность бета-амилазы в указанном зерне является сходной с активностью бета-амилазы в зерне растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного в сходных или тех же условиях. В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает солод, приготовленный из зерна растения ячменя, где активность бета-амилазы в указанном зерне является сходной с активностью бета-амилазы в солоде, приготовленном из зерна растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного и полученного в сходных или тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по настоящему изобретению имеет по существу такое же распределение амилопектина по длине цепи,

что и зерно растения ячменя, не несущего мутацию в гене *HvLDI* по изобретению. Например, в одном варианте осуществления зерно растений ячменя по изобретению могут содержать амилопектин, имеющий такое же распределение амилопектина по длине цепи, что и амилопектин зерна растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного в сходных или тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по настоящему изобретению имеет по существу такую же массу, что и зерно растения ячменя, не несущего мутацию в гене *HvLDI* по изобретению. В частности, зерно растения ячменя по изобретению может иметь такую же среднюю массу зерна по сравнению со средней массой зерна растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного в сходных или тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по изобретению имеет массу тысячи зерен, составляющую по меньшей мере 40 грамм, такую как по меньшей мере 45, такую как по меньшей мере 50 грамм, такую как по меньшей мере 55 грамм.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя в соответствии с изобретением имеет массу тысячи зерен, составляющую по меньшей мере 80%, такую как по меньшей мере 85%, такую как по меньшей мере 90%, такую как по меньшей мере 95% по сравнению с массой тысячи зерен растения ячменя, несущего ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt HvLDI, но в остальном того же генотипа при выращивании в тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по изобретению имеет массу, составляющую по меньшей мере 40 грамм, такую как по меньшей мере 45 грамм, такую как по меньшей мере 50 грамм, такую как по меньшей мере 55 грамм.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя в соответствии с изобретением имеет массу зерна, составляющую по меньшей мере 80%, такую как по меньшей мере 85%, такую как по меньшей мере 90%, такую как по меньшей мере 95% по сравнению с зерном растения ячменя, несущего ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt HvLDI, но в остальном того же генотипа, при выращивании в тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по настоящему изобретению имеет по существу такой же размер по сравнению с зерном растения ячменя, не несущего мутацию в гене *HvLDI* по изобретению. Предпочтительно зерно растения ячменя по изобретению может иметь такой же диаметр зерна по сравнению с

диаметром зерна растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного в сходных или тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя в соответствии с настоящим изобретением имеет по существу такое же содержание белка, что и зерно растения ячменя, не несущего мутацию в гене *HvLDI* по настоящему изобретению. Предпочтительно зерно растения ячменя по изобретению может иметь такое же содержание белка по сравнению с содержанием белка в зерне растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного в сходных или тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по настоящему изобретению имеет по существу такое же содержание воды, что и зерно растения ячменя, не несущего мутацию в гене *HvLDI* по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по изобретению может иметь такое же содержание воды по сравнению с содержанием воды в зерне растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного в сходных или тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя по настоящему изобретению имеет по существу такое же содержание крахмала, что и зерно растения ячменя, не несущего мутацию в гене *HvLDI* по изобретению. Например, в одном варианте осуществления зерно растений ячменя по изобретению может иметь содержание крахмала, сравнимое с содержанием крахмала в зерне растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного в сходных или тех же условиях.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя в соответствии с изобретением имеет содержание крахмала (% от сухой массы), составляющее по меньшей мере 50%, такое как по меньшей мере 55%, такое как по меньшей мере 60%.

В одном варианте осуществления зерно растения ячменя в соответствии с изобретением имеет содержание крахмала по меньшей мере 80%, такое как по меньшей мере 85%, такое как по меньшей мере 90%, такое как по меньшей мере 95% по сравнению с зерном растения ячменя, несущего ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при выращивании в тех же условиях.

В одном варианте осуществления растения ячменя по настоящему изобретению имеют урожай зерна, сравнимый с урожаем зерна растений ячменя, не несущих мутацию в гене *HvLDI* по изобретению. Например, растения ячменя по изобретению

могут в одном варианте осуществления иметь урожай зерна, аналогичный урожаю зерна растения ячменя, не несущего указанную мутацию, но в остальном идентичного; и выращенного в сходных или тех же условиях.

В одном варианте осуществления растения ячменя по изобретению имеют урожай зерна по меньшей мере 80%, такой как 90%, такой как 95%, по сравнению с урожаем зерна растения ячменя, несущего ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при выращивании в тех же условиях.

Растения ячменя, содержащие более одной мутации

Настоящее изобретение относится к растению ячменя или его части, а также продуктам из указанного растения ячменя и способу их получения, при этом растение ячменя несет мутацию в гене *HvLDI*, например, любую из мутаций в гене *HvLDI*, описанных в настоящем документе.

В дополнение к указанной мутации в гене *HvLDI*, другие растения ячменя по изобретению могут содержать одну или несколько дополнительных мутаций в одном или нескольких дополнительных генах.

В дополнение к мутации в гене *HvLDI*, описанной в настоящем документе, растения ячменя по изобретению могут также содержать мутацию в гене, кодирующем липоксигеназу-1 (LOX-1) (SEQ ID NO: 1 в WO 2005/087934 или номер доступа в GenBank LC099006.1), что приводит к полной потере функциональной LOX-1. Указанная мутация может, например, представлять собой любую из мутаций, описанных в международной патентной заявке WO 2005/087934. Например, растение ячменя может содержать ген, кодирующий LOX-1, содержащий кодон преждевременной остановки, причем указанный кодон соответствует номерам оснований 3572-3574 в SEQ ID NO:2 из WO 2005/087934, или мутацию сайта сплайсинга, причем указанная мутация соответствует основанию под номером 2311 в SEQ ID NO: 6 из SEQ ID NO: 2 из WO 2005/087934. Потеря функции LOX-1 приводит к уменьшению количества свободного *транс-2-ноненаля* (T2N) в напитке, полученном с использованием такого растения ячменя. Предпочтительно T2N составляет не более 0,05 ppb (частей на миллиард) после инкубации при 37°C в течение 4 недель в присутствии сульфита в диапазоне от 4 до 6 ppm.

В дополнение к мутации в гене *HvLDI*, описанной в настоящем документе, растения ячменя по изобретению могут также содержать мутацию в гене, кодирующем липоксигеназу-2 (LOX-2), что приводит к полной потере функциональной LOX-2.

Указанная мутация может, например, представлять собой любую из мутаций, описанных в международной патентной заявке WO 2010/075860. Например, растение ячменя может содержать ген, кодирующий LOX-2, содержащий мутацию в положении нуклеотида 2689 в SEQ ID NO:1 из WO 2010/075860, приводящую к образованию преждевременного стоп-кодона. Потеря функции LOX-2 приводит к уменьшению количества свободного *транс-2-ноненаля* (T2N) и, в частности, уменьшению количества T2N, вероятном в напитке, полученном с использованием такого растения ячменя.

В дополнение к мутации в гене *HvLDI*, описанной в настоящем документе, растения ячменя по изобретению могут также содержать мутацию в гене, кодирующем метионин-S-метилтрансферазу (MMT) (SEQ ID NO: 1 в WO 2010/063288 или номер доступа в GenBank AB028870), что приводит к полной потере функциональной MMT. Указанная мутация может, например, представлять собой любую из мутаций, описанных в международной патентной заявке WO 2010/063288. Например, растение ячменя может содержать ген, кодирующий MMT, содержащий мутацию G на A основания под номером 3076 в SEQ ID NO:3 из WO 2010/063288, или ген, кодирующий MMT, содержащий мутацию G на A основания под номером 1462 в SEQ ID NO:16 из WO 2010/063288. Потеря функции MMT приводит к уменьшению количества диметилсульфида (DMS) как в зеленом солоде, так и в солоде, подвергнутом сушке, а также в напитках, изготовленных из такого солода. Предпочтительно напиток, изготовленный из растения ячменя с утратой функции MMT, содержит менее 30 ppm DMS. Потеря функции MMT также приводит к уменьшению количества S-метил-L-метионина (SMM) как в зеленом солоде, так и в солоде, подвергнутом сушке, а также в напитках, изготовленных из такого солода. Предпочтительно напиток, изготовленный из растения ячменя с утратой функции MMT, содержит менее 30 ppm SMM.

В дополнение к мутации в гене *HvLDI*, описанной в настоящем документе, растения ячменя по изобретению могут также содержать мутацию в гене, кодирующем целлюлозосинтазоподобный F6 (CslF6) (SEQ ID NO: 1 в WO 2019/129736 или номер доступа в Genbank EU267181.1), где указанный мутантный ген кодирует мутантный белок CslF6 со сниженной активностью CslF6. Указанная мутация может, например, представлять собой любую из мутаций, описанных в международной патентной заявке WO 2019/129736. Например, растение ячменя может содержать ген, кодирующий CslF6, кодирующий мутантный CslF6, содержащий мутацию G847E, или мутацию G748D, или мутацию T709I SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:3 в WO 2019/129736. Ядра

ячменя со сниженной активностью CslF6 имеют пониженное содержание (1,3; 1,4)-бета-глюкана. Высокое содержание (1,3; 1,4)-бета-глюкана в солоде может вызывать образование высоковязких водных растворов, которые замедляют процессы фильтрации на пивоваренных заводах и способствуют нежелательному помутнению конечного напитка.

В дополнение к мутации в гене *HvLDI*, описанной в настоящем документе, растения ячменя по изобретению могут также содержать любую из мутаций, приводящих к повышенной активности альфа-амилазы, описанной в международной патентной заявке WO 2019/129739. В частности, растения ячменя по изобретению могут содержать мутацию в гене репрессора транскрипции *Hordeum* (*HvHRT*) (SEQ ID NO: 1 в WO 2019/129739 или номер доступа NCBI AK362734.1), приводящую к потере функции HRT. Указанная мутация в гене *HvHRT* может, например, представлять собой любую из мутаций в гене *HvHRT*, описанных в международной патентной заявке WO 2019/129739. Например, растение ячменя может содержать ген, кодирующий HRT, содержащий преждевременный стоп-кодон. Указанная мутация гена *HvHRT* может, например, представлять собой мутацию G на A нуклеотида 1293 кодирующей *HvHRT* последовательности SEQ ID NO:1 в WO 2019/129739 и/или может представлять собой мутацию, при которой мутантный ген *HvHRT* указанного растения ячменя кодирует мутантный белок HvHRT, содержащий стоп-мутацию W431 в SEQ ID NO: 2 в WO 2019/129739. Указанная мутация гена *HvHRT* может, например, также представлять собой мутацию G на A нуклеотида 510 кодирующей *HvHRT* последовательности SEQ ID NO:1 в WO 2019/129739 и/или мутацию, при которой мутантный ген *HvHRT* кодирует мутантный белок HvHRT, имеющий стоп-мутацию W170 в SEQ ID NO: 2 в WO 2019/129739. Указанная мутация гена *HvHRT* может также представлять собой, например, мутацию G на A нуклеотида 1113 кодирующей *HvHRT* последовательности SEQ ID NO:1 в WO 2019/129739, и/или может представлять собой мутацию, при которой мутантный ген *HvHRT* указанного растения ячменя кодирует мутантный белок HvHRT, содержащий стоп-мутацию W371 в SEQ ID NO: 2 в WO 2019/129739. Мутация HvHRT может повышать уровень альфа-амилазы в ядре ячменя. Повышенная активность альфа-амилазы в процессе соложения увеличивает расщепление крахмала и доступность сбраживаемых сахаров в ядре.

В дополнение к мутации в гене *HvLDI*, описанной в настоящем документе, растения ячменя по изобретению могут также содержать любую из мутаций, приводящих к повышенной активности альфа-амилазы, описанной в международной

патентной заявке WO 2019/129739. В частности, растения ячменя по изобретению могут содержать мутацию в гене *HvHBL12* (SEQ ID NO: 5 в WO 2019/129739 и номера доступа NCBI AK376953.1 и AK361212.1), приводящую к потере функции HBL12. Указанная мутация в гене *HvHBL12* может, например, представлять собой любую из мутаций в гене *HvHBL12*, описанных в международной патентной заявке WO 2019/129739. Например, растение ячменя может содержать ген, кодирующий мутантный ген *HvHBL 12*, кодирующий мутантный белок HvHBL 12, в котором отсутствуют по меньшей мере i) аминокислоты 26-79 в SEQ ID NO: 6 в WO 2019/129739; или ii) аминокислоты 81-122 в SEQ ID NO:6, или iii) аминокислоты 228-250 в SEQ ID NO:6 в WO 2019/129739. Такие же мутации могут встречаться в одном из полиморфизмов в SEQ ID NO:6 в WO 2019/129739, а именно, полиморфизмы N141D, M142V или E184D. Альтернативно, растение ячменя может содержать преждевременный стоп-кодон в гене *HvHDL12*. В частности, указанное растение ячменя может содержать мутацию G на A нуклеотида 684 кодирующей HvHBL12 последовательности SEQ ID NO: 5 в WO 2019/129739 или любой из его вышеупомянутых полиморфов, это кодирует мутантный белок HvHBL 12, содержащий стоп-мутацию W228 в SEQ ID NO: 6 в WO 2019/129739. Было показано, что ядра ячменя с отсутствием функции *HvHBL* обладают более высокой активностью альфа-амилазы.

В дополнение к мутации в гене *HvLDI*, описанной в настоящем документе, растения ячменя по изобретению могут также содержать любую из мутаций, приводящих к повышенной активности альфа-амилазы, описанных в международной заявке на патент WO 2019/129739. В частности, растения ячменя по изобретению могут содержать мутацию в гене *WKRY38* (SEQ ID NO: 10 из WO 2019/129739 или номер доступа NCBI AJ536667.1 или AK360269.1, или AY541586.1), приводящую к потере функции WKRY38. Указанная мутация в гене *WKRY38* может представлять собой, например, любую из мутаций в гене *WKRY38*, описанных в международной патентной заявке WO 2019/129739. В частности, указанное растение ячменя может содержать мутацию G на A нуклеотида 600 кодирующей HvWRKY38 последовательности SEQ ID NO:10 из WO 2019/129739. Было показано, что ядра ячменя с отсутствием функции WKRY38 обладают более высокой активностью альфа-амилазы.

В дополнение к мутации в гене *HvLDI*, описанной в настоящем документе, растения ячменя по изобретению могут также содержать мутант, не содержащий антоцианов и проантоцианидина (мутация *ant*), такой как любая из мутаций *ant*,

описанных Himi et al., 2012 или Jende-Strid, 1993. В частности, мутация *ant* может представлять собой мутацию гена *Hvmyb10* (номер доступа в GenBank AB645844), например, несинонимичную мутацию *Hvmyb10*, предпочтительно любую из мутаций в гене *Hvmyb10*, обнаруженных в мутантах *ant28*. Таким образом, мутация *ant* может представлять собой мутацию G на A нуклеотида 51 кодирующей области *Hvmyb10* дикого типа или мутацию G на A нуклеотида 558 кодирующей области *Hvmyb10* дикого типа, как описано в Himi et al., 2012. В частности, мутанты *ant28* имеют пониженный уровень покоя зерна.

Растения ячменя по изобретению могут также содержать комбинацию дополнительных мутаций, упомянутых выше. Возможные комбинации генных мутаций проиллюстрированы в таблице ниже, в которой показаны 8 примеров различных растений ячменя, где «Mut» означает, что растение содержит любую из описанных в настоящем документе мутаций в указанном гене.

	LDI	LOX-1	MMT	CsIF6	HRT	HBL12	WRKY38	Myb10
Пр. 1	Mut	Mut	Mut					Mut
Пр. 2	Mut	Mut	Mut	Mut				Mut
Пр. 3	Mut	Mut	Mut	Mut		Mut		Mut
Пр. 4	Mut	Mut	Mut	Mut			Mut	Mut
Пр. 5	Mut	Mut	Mut	Mut	Mut			Mut
Пр. 6	Mut	Mut	Mut			Mut		Mut
Пр. 7	Mut	Mut	Mut				Mut	Mut
Пр. 8	Mut	Mut	Mut		Mut			Mut

В частности, описано растение ячменя с мутацией LDI по настоящему изобретению и мутацией с потерей функции в LOX-1, MMT и Myb10 (проиллюстрировано как Пр. 1 в первой строке в приведенной выше таблице), а также растение ячменя с мутацией LDI по настоящему изобретению и мутациями с потерей функции в LOX-1 и MMT, CsF6 и Myb10 (проиллюстрировано как Пр. 2 во второй строке в приведенной выше таблице).

Растения ячменя, содержащие более одной мутации, могут быть получены любым подходящим способом. Например, указанная одна или несколько дополнительных мутаций могут быть введены в растение ячменя, несущее мутацию в гене *HvLDI*, или, альтернативно, мутация в гене *HvLDI*, как описано в настоящем

документе, может быть введена в растение ячменя, уже несущее дополнительную мутацию. Растения ячменя, несущие конкретную желаемую мутацию, могут быть получены и идентифицированы по существу так, как описано в международной патентной заявке WO 2018/001884, с использованием праймеров и зондов, разработанных для идентификации конкретной мутации.

Альтернативно, указанные растения ячменя могут быть получены путем скрещивания растений ячменя, несущих мутацию в гене *HvLDI*, с растением ячменя, несущим одну или несколько дополнительных мутаций, например, любым из растений ячменя, описанным или депонированным в связи с международными патентными заявками WO 2005/087934, WO 2010/075860, WO 2010/063288, WO 2019/129736 или WO 2019/129739, или описанным в Himi et al., 2012.

Растительные продукты

Изобретение также относится к растительным продуктам, полученным из растения ячменя, несущего мутацию в гене *HvLDI* по изобретению, например, любому из растений ячменя или их частям, описанным в настоящем документе.

Растительный продукт может представлять собой любой продукт, приготовленный из растения ячменя, например, пищевой продукт, корм или напиток. Таким образом, растительный продукт может представлять собой любой из напитков, описанных в настоящем документе ниже в разделе «Напиток и способ его изготовления». Растительный продукт может также представлять собой водный экстракт растения ячменя и/или солода указанного растения ячменя, например, растительный продукт может представлять собой сусло. Указанный водный экстракт может быть изготовлен, например, как описано в настоящем документе ниже в разделе «Водный экстракт и способы его получения».

В одном варианте осуществления растительный продукт может представлять собой солод, например, любой из солодов, описанных в настоящем документе ниже в разделе «Солод и способы его получения», или продукт на основе солода, такой как напитки на основе солода. Хотя в основном солод используется для производства напитков, его также можно использовать в других промышленных процессах, например, в качестве источника ферментов в хлебопекарной промышленности или в пищевой промышленности в качестве ароматизатора и красителя, например, в виде солода или солодовой муки, или косвенно в виде солодового сиропа и т.д. Таким

образом, растительный продукт по изобретению может представлять собой любой из вышеупомянутых продуктов.

В другом аспекте растительные продукты в соответствии с изобретением содержат или даже состоят из сиропа, такого как ячменный сироп или сироп из ячменного солода. Растительный продукт может также представлять собой экстракт ячменя или солода. Так, например, растительный продукт может представлять собой сусло.

Солод и способы его получения

Изобретение также обеспечивает солод, приготовленный из растения ячменя, несущего мутацию в гене *HvLDI* по изобретению, например, из любого из описанных в настоящем документе растений ячменя.

Солод может быть приготовлен путем соложения, то есть путем проращивания замоченных зерен ячменя в процессе, происходящем в контролируемых условиях окружающей среды. За проращиванием необязательно может следовать стадия сушки. Указанная стадия сушки предпочтительно может представлять собой сушку проросших зерен в печи при повышенных температурах.

Таким образом, способ соложения по настоящему изобретению предпочтительно включает следующие стадии:

- a) обеспечение зерна растения ячменя или его частей по изобретению;
- b) замачивание и проращивание указанного зерна ячменя в заданных условиях;
- c) необязательно сушку указанного проросшего зерна ячменя.

Ячмень по настоящему изобретению является особенно подходящим для процессов с использованием зеленого солода, т.е. процесса соложения, при котором солод не подвергается сушке в печи перед затиранием. Ячмень по настоящему изобретению также является особенно подходящим для коротких процессов соложения, т.е. процесса, описанного ниже, благодаря высоким уровням предельной декстриназы.

- a) В одном варианте осуществления солод готовят в соответствии со следующим процессом: зерно ячменя, которое необязательно было очищено, замачивают (инкубируют) в водном растворе, предпочтительно в воде, в течение периода времени в диапазоне от 4 до 24 ч, предпочтительно в диапазоне от 5 до 15 ч, более предпочтительно в пределах 5-1 ч. В течение этого времени водный раствор,

содержащий зерна, аэрируют. Аэрация может повысить содержание кислорода в водном растворе и/или разрыхлить зерно ячменя, и/или помочь избежать образования сухих карманов среди зерна ячменя. Замачивание можно проводить при любой подходящей температуре, предпочтительно при температуре в диапазоне от 20 до 28°C, более предпочтительно примерно при 25°C;

b) водный раствор сливают и зерно подвергают воздушной выдержке в течение от 5 до 30 ч, предпочтительно от 8 до 24 ч, более предпочтительно от 8 до 16 ч. Предпочтительно зерно аэрируют во время воздушной выдержки. Предпочтительно в прорастающем зерне поддерживают постоянную температуру в диапазоне 20-28°C, например, путем контроля температуры газа, используемого для аэрации;

c) зерно ячменя инкубируют в водном растворе в течение от 2 до 24 ч, предпочтительно в течение от 2 до 15 ч, более предпочтительно в течение от 2 до 10 ч с аэрацией, например, для смешивания зерна. Предпочтительно температуру воды поддерживают в диапазоне 20-28°C, например, около 25°C; и

d) водный раствор сливают и зерно подвергают фазе воздушной выдержки в течение 5-30 ч, предпочтительно в течение 8-20 ч. Предпочтительно температуру поддерживают в диапазоне 20-28°C, например, путем контроля температуры газа, используемого для аэрации;

e) процесс прорастания предпочтительно завершается в пределах 48-72 ч, предпочтительно в пределах 48-60 ч, еще более предпочтительно в течение 48-56 ч. Предпочтительно проросшее зерно имеет содержание воды по меньшей мере 20% на протяжении всего процесса, следующего за стадией а. Проросшее зерно можно непосредственно использовать в последующих процессах в качестве зеленого солода.

В одном варианте осуществления указанный солод может быть приготовлен с помощью способа, включающего инкубацию зерна в воде в условиях аэрации и без суши в печи. Такой солод также может называться в настоящем документе как «Flex-Malt». В частности, Flex-Malt может быть приготовлен, как описано в WO 2018/001882 и WO 2019/129724. В частности, как описано в разделе «Проращивание» на страницах с 14 по 22, «Термическая обработка» на страницах с 22 по 24 и «Пример 1» на страницах с 56 по 57 в WO 2018/001882, а также «Проращивание» на страницах с 14 по 22, «Термическая обработка» на страницах с 22 по 24 и «Пример 1» на страницах с 56 по 57 в WO 2019/129724, включенных в настоящий документ посредством ссылки.

Способ приготовления «Flex-Malt» описан ниже в примере 5.

Прорастание обычно начинается в тот момент времени, когда зерно находится в контакте с водой, например, в момент времени, когда зерно ячменя с содержанием воды менее 15% контактирует с достаточным количеством воды для инициирования прорастания.

В одном варианте осуществления прорастание начинается, когда зерно аэрируется снизу различными уровнями атмосферного воздуха в течение различных периодов времени, в течение которых содержание влаги в зерне повышается.

Было показано, что зерно растения ячменя по изобретению является особенно полезным, когда процесс прорастания укорачивается. Таким образом, зерно растений ячменя по изобретению действительно является полезным в способах соложения, где время прорастания укорачивается. В одном варианте осуществления стадию замачивания и проращивания зерна по изобретению проводят в течение не более 4 дней, например, не более 3 дней.

В другом варианте осуществления солод может быть приготовлен путем традиционного соложения, при котором процесс замачивания и процесс проращивания осуществляются в две отдельных стадии. Таким образом, замачивание может быть выполнено любым обычным способом, известным специалисту в данной области. Один неограничивающий пример включает замачивание при температуре в диапазоне 10-25°C с чередованием сухих и влажных условий. Во время замачивания, например, ядра злаков можно инкубировать во влажном состоянии в течение от 30 мин до 3 ч с последующей инкубацией в сухом состоянии в течение от 30 мин до 3 ч, и необязательно повторяя указанную схему инкубации 2-5 раз. Конечное содержание воды после замачивания может, например, находиться в диапазоне 40-50%. Проращивание зерна может быть выполнено любым традиционным способом, известным специалисту в данной области. Один неограничивающий пример включает проращивание при температуре в диапазоне 10-25°C, необязательно с изменением температуры, в течение 1-6 дней.

Необязательно сушку в печи можно проводить при традиционных температурах, таких как по меньшей мере 75°C, например, в диапазоне 80-90°C, например, в диапазоне 80-85°C.

Таким образом, солод может быть получен, например, с помощью любого из способов, описанных Hough et al. (1982). Однако любой другой подходящий способ получения солода может быть также использован с настоящим изобретением, такой как

способы получения специальных солодов, включая, но без ограничения, способы обжарки солода.

Солод может быть дополнительно обработан, например, путем помола. Таким образом, растительный продукт по изобретению может представлять собой любой вид солода, такой как необработанный солод или молотый солод, такой как мука. Молотый солод и мука из него содержат химические компоненты солода и мертвые клетки, которые не обладают способностью к повторному прорастанию.

Помол может выполняться в сухом состоянии, то есть солод размалывается в сухом состоянии, или помол может выполняться во влажном состоянии, то есть солод размалывается во влажном состоянии.

Преимущество солода, полученного из растений ячменя или их частей, несущих мутацию в гене *HvLDI* по изобретению, заключается в том, что указанный солод имеет высокий уровень активности свободной HvLD по сравнению с солодом из растений ячменя дикого типа без мутации HvLDI, но в остальном того же генотипа. Высокий уровень активности свободной HvLD делает солод выгодным по нескольким причинам. Повышенная активность свободной HvLD является полезной в процессах соложения, где время прорастания укорачивается. В частности, на фигуре 3 показано, что солод из ячменя по изобретению (HENZ-16a и -31) при использовании в процессе Flex-Malt, превосходит ячмень дикого типа, такой как ячмень Paustian, в традиционном процессе соложения (фиг. 4) в том, что соотношение свободной/общей предельной декстриназы при этом улучшается, демонстрируя 61,6 и 56,3% для варианта HENZ в процессе Flex-Malt, что более чем на 50% выше, чем для Paustian в традиционном процессе. Более того, повышенная активность свободной HvLD приводит к увеличению деградации крахмала в сбраживаемые сахара и, таким образом, сусло, приготовленное из зерна и/или солода из указанных растений ячменя, может характеризоваться более высоким содержанием сбраживаемых сахаров. Таким образом, путем использования солода по изобретению потребность в добавлении экзогенной предельной декстриназы или пуллулаказы во время затираания может быть снижена или даже полностью отменена. Кроме того, сбраживание водного экстракта, имеющего высокое содержание сбраживаемых сахаров, является выгодным во время пивоварения, поскольку это увеличивает количество пива, производимого на количество используемого зерна и увеличивает ABV% (объемное содержание алкоголя), приведенное к гектолитру на массу зерна.

Водный экстракт и способ его получения

Изобретение обеспечивает напитки на основе ячменя, а также способы их приготовления, при этом растение ячменя несет мутацию в гене *HvLDI* по изобретению.

Часто способы приготовления напитка на основе ячменя включают стадию приготовления водного экстракта зерна растений ячменя по изобретению и/или солода, приготовленного из растений ячменя по изобретению, и необязательно одного или нескольких видов несоложенного сырья.

В одном варианте осуществления водный экстракт готовят из зерна растения ячменя по изобретению и/или солода, приготовленного из растений ячменя по изобретению. В другом варианте осуществления водный экстракт готовят из смеси зерен растения ячменя по изобретению и/или солода, приготовленного из растений ячменя по изобретению, и зерен растения ячменя дикого типа, и/или солода, приготовленного из зерен ячменя дикого типа, и необязательно одного или нескольких видов несоложенного сырья. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, такое как по меньшей мере 20%, такое как по меньшей мере 30%, такое как по меньшей мере 40%, такое как по меньшей мере 50%, такое как по меньшей мере 60%, такое как по меньшей мере 70%, такое как по меньшей мере 80%, такое как по меньшей мере 90%, такое как 100% зерен ячменя и/или солода, используемых для приготовления водного экстракта, могут представлять собой зерна ячменя растения ячменя по изобретению или солод, приготовленный из растения ячменя по изобретению, и необязательно одного или нескольких видов несоложенного сырья.

В одном варианте осуществления солод, используемый в водном экстракте, представляет собой зеленый солод или Flex Malt, как описано в разделе «Солод и способы его получения», в частности, зеленый солод можно перемалывать во влажном состоянии. В частности, зеленый солод/Flex Malt никогда не имел содержание воды ниже 20% до помола и затирания, и не подвергался сушке в печи.

Водный экстракт, как правило, может быть приготовлен путем инкубации муки ячменя и/или солодовой муки в воде или в водном растворе. В частности, водный экстракт может быть приготовлен путем затирания.

Обычно указанный водный раствор может представлять собой воду, такую как водопроводная вода, в которую может быть добавлен один или несколько дополнительных агентов. Дополнительные агенты могут присутствовать в водном растворе с самого начала или их можно добавлять в процессе приготовления водного

экстракта. Указанные дополнительные агенты могут представлять собой ферменты. Таким образом, водный раствор может содержать один или несколько ферментов. Указанные ферменты могут быть добавлены в водный раствор с самого начала или в последующем в ходе процесса.

Указанные ферменты могут, например, представлять собой один или несколько гидролитических ферментов. Подходящие ферменты включают липазы, ферменты, расщепляющие крахмал (например, амилазы), глюканы [предпочтительно (1-4)-и/или (1,3;1,4)-бета-глюканы] и/или ксиланы (такие как арабиноксиланы), и/или протеазы, или смеси ферментов, содержащие один или несколько вышеупомянутых ферментов, например, Cereflo, Ultraflo или Ondea Pro (Novozymes). Например, водный раствор может содержать один или несколько гидролитических ферментов, выбранных из группы, состоящей из альфа-амилазы, бета-амилазы, предельной декстриназы, пуллулазы, бета-глюканы (например, эндо-(1,3;1,4)-бета-глюканы или эндо-1,4-бета-глюканы), ксиланы (например, эндо- или экзо-1,4-ксилаза, арабинофуранозидазы или эстеразы феруловой кислоты), глюкоамилазы и протеазы.

Одним из преимуществ растений ячменя по изобретению является величина высокой активности свободной HvLD в зерне указанных растений ячменя или в солоде, приготовленном из указанных растений ячменя. Иногда при затирании зерна ячменя и/или солода может быть добавлена предельная декстриназа или другие ферменты, способные катализировать гидролиз альфа-1,6-связей, такие как пуллулаза, для ускорения гидролиза крахмала за счет высвобождения декстринов с прямой цепью из разветвленных декстринов, полученных из амилопектина. Таким образом, одним из преимуществ настоящего изобретения является то, что потребность в добавлении экзогенной предельной декстриназы или пуллулазы снижается или даже отменяется, и при этом может быть получен адекватный уровень сбраживаемых сахаров в экстракте. В некоторых вариантах осуществления изобретения можно приготовить водный экстракт без добавления экзогенной предельной декстриназы или пуллулазы.

Указанные дополнительные агенты, предпочтительно пищевого качества, могут также представлять собой соль, например, CaCl_2 , или кислоту, например, H_3PO_4 .

Водный экстракт обычно готовят путем инкубации ячменной муки и/или солодовой муки в водном растворе при одной или нескольких предварительно определенных температурах. Указанная предварительно определенная температура также может называться в настоящем документе как «температура затирания». Указанные температуры затирания могут представлять собой, например, традиционные

температуры, используемые для затириания. Температуру затириания обычно либо поддерживают постоянной (изотермическое затириание), либо постепенно повышают, например, повышают последовательным ступенчатым образом. В любом случае растворимые вещества в зернах ячменя и/или солоде высвобождаются в указанный водный раствор, тем самым образуя водный экстракт.

Температура(ы) затириания обычно представляет собой температуру(ы) в диапазоне 30-90°C, такую как в диапазоне 40-85°C, например, в диапазоне 50-85°C. В частности, можно использовать относительно низкую температуру затириания, т.е. температуру в пределах 50-60°C.

После инкубации в водном растворе, например, в емкости для затириания, водный раствор можно перелить в другую емкость, например, фильтрационный чан и инкубировать в течение дополнительного времени при повышенной температуре.

Неограничивающие примеры применимых протоколов затириания можно найти в литературе по пивоварению, например, в Hough et al. (см. выше).

Затириание (т.е. инкубация ячменной муки и/или солодовой муки в водном растворе) может происходить в присутствии несоложенного сырья, которое включает любой источник углеводов, отличный от солода, такой как, но без ограничения, ячмень, ячменные сиропы, или кукуруза, или рис - либо в виде целых зерен, либо в виде продуктов переработки, таких как крупа, сиропы или крахмал. Все вышеперечисленное несоложеное сырье может быть использовано в основном в качестве дополнительного источника экстракта (сиропы обычно вносят во время нагревания сусла). Требования к обработке несоложенного сырья на пивоваренном заводе зависят от состояния и типа используемого несоложенного сырья и, в частности, от температур клейстеризации или разжижения крахмала.

После инкубации в водном растворе водный экстракт, как правило, может быть разделен, например, путем фильтрации на водный экстракт и остаточные нерастворенные твердые частицы, которые также называются «дробиной». Фильтрация может, например, осуществляться в фильтровальном чане. В качестве альтернативы фильтрация может представлять собой фильтрацию через майш-фильтр. Полученный таким образом водный экстракт также может быть называться «первым суслом». Дополнительная жидкость, такая как вода, может быть добавлена к дробине в ходе процесса, также называемого промыванием дробины. После промывания дробины и фильтрации может быть получено «второе сусло». Дополнительное сусло может быть получено при повторении процедуры. Таким образом, водный экстракт может

представлять собой сусло, т.е. первое сусло, второе сусло, дополнительное сусло или их комбинацию.

Одно из преимуществ водных экстрактов, приготовленных из растений ячменя, несущих мутацию в гене *HvLDI* по изобретению, может состоять в том, что они содержат высокий уровень сбраживаемых сахаров.

В одном варианте осуществления указанный водный экстракт, приготовленный из зерна и/или солода растений ячменя по настоящему изобретению, имеет повышенную концентрацию общих сбраживаемых сахаров по сравнению с водным экстрактом растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при приготовлении в тех же условиях.

В другом варианте осуществления указанный водный экстракт, приготовленный из солода, приготовленного из растений ячменя в соответствии с настоящим изобретением, содержит по меньшей мере на 5% больше общих сбраживаемых сахаров, например, по меньшей мере на 6% больше общих сбраживаемых сахаров, например, по меньшей мере на 7% больше общих сбраживаемых сахаров по сравнению с водным экстрактом растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при приготовлении в тех же условиях.

В другом варианте осуществления указанный водный экстракт, приготовленный из солода, полученного из растений ячменя в соответствии с настоящим изобретением, содержит по меньшей мере на 10% больше глюкозы, фруктозы и/или мальтотриозы по сравнению с водным экстрактом растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при приготовлении в тех же условиях.

Напитки и способы их изготовления

Настоящее изобретение также обеспечивает напитки на основе ячменя и способы изготовления таких напитков, где растение ячменя несет мутацию в гене *HvLDI* по изобретению.

Указанный напиток может представлять собой алкогольные напитки на основе ячменя или безалкогольные напитки на основе ячменя. Алкогольные напитки на основе ячменя могут представлять собой, например, пиво или дистиллированный спирт.

Указанное пиво может представлять собой любой вид пива, например, лагер или эль. Таким образом, пиво может быть выбрано, например, из группы, состоящей из Altbier, Amber ale, Barley wine, Berliner Weisse, Biere de Garde, Bitter, Blonde Ale, Bock, Brown ale, California Common, Cream Ale, Dortmunder Export, Doppelbock, Dunkel,

Dunkelweizen, Eisbock, Fruit lambic, Golden Ale, Gose, Gueuze, Hefeweizen, Helles, India pale ale, Kolsch, Lambic, Light ale, Maibock, Malt liquor, Mild, Marzenbier, Old ale, Oud bruin, Pale ale, Pilsener, Porter, Red ale, Roggenbier, Saison, Scotch ale, Steam beer, Stout, Schwarzbier, lager, Witbier, Weissbier и Weizenbock. Пиво также может быть слабоалкогольным или безалкогольным (также известным как «безалкогольное пиво» или afb).

Указанный дистиллированный спирт может представлять собой любой вид дистиллированного спирта. В частности, дистиллированный спирт может быть основан на злаках, например, соложенном злаке, например, ячменном солоде. Неограничивающие примеры такого дистиллированного спирта включают виски и водку.

Напиток может представлять собой безалкогольный напиток, такой как безалкогольный напиток на основе ячменя, т.е. безалкогольное пиво или безалкогольные солодовые напитки, такие как мальтина или нусси.

Напиток может быть приготовлен, например, с помощью способа, включающего следующие стадии:

- a. обеспечение зерна растения ячменя в соответствии с изобретением и/или солода, приготовленного из зерна растения ячменя в соответствии с изобретением, и/или водного экстракта, приготовленного из зерна и/или солода растения ячменя в соответствии с изобретением;
- b. переработку указанного водного экстракта в напиток.

Водный экстракт можно кипятить с хмелем или без него, после чего он может называться как прокипяченное сусло. Первое, второе и последующие сусла могут быть объединены, а затем подвергнуты кипячению. Водный экстракт можно кипятить в течение любого подходящего количества времени, т.е. в течение от 60 мин до 120 мин.

Стадия (a) может, в частности, включать сбраживание указанного водного экстракта, например, путем сбраживания сусла. Таким образом, напиток может быть приготовлен путем сбраживания водного экстракта дрожжами.

После приготовления водного экстракта его можно перерабатывать в пиво любым способом, включая традиционные способы пивоварения. Неограниченные описания примеров подходящих способов пивоварения можно найти, например, в публикациях Hough et al. (1982). Доступны многочисленные, регулярно обновляемые методы анализа ячменя и пивных продуктов, например, но без ограничения, American Association of Cereal Chemists (1995), American Society of Brewing Chemists (1992),

European Brewery Convention (1998) и Institute of Brewing (1997). Общеизвестно, что для отдельно взятого пивоваренного завода используется множество конкретных процедур, причем наиболее существенные различия связаны с предпочтениями местных потребителей. Любой такой способ производства пива может быть использован в настоящем изобретении.

Первая стадия производства пива из водного экстракта предпочтительно включает кипячение указанного водного экстракта, как описано выше, с последующей фазой охлаждения и необязательно вихревой паузы. Одно или несколько дополнительных соединений может быть добавлено к водному экстракту, например, одно или несколько дополнительных соединений, описанных ниже в разделе «Дополнительные соединения». После охлаждения водный экстракт может быть перенесен в емкости для брожения, содержащие дрожжи, т.е. пивоваренные дрожжи, такие как *S. pastorianus* или *S. cerevisiae*. Водный экстракт можно сбраживать в течение любого подходящего периода времени, обычно в течение 1-20 дней, например, 1-10 дней. Сбраживание проводят при любой подходящей температуре, например, при температуре в диапазоне 10-20°C. Способы могут также включать добавление одного или нескольких ферментов, например, один или несколько ферментов могут быть добавлены в сусло до или во время сбраживания. В частности, указанный фермент может представлять собой пролин-специфическую эндопротеазу. Неограничивающим примером пролин-специфичной эндопротеазы является «Brewer's Clagex», доступная от фирмы DSM. В других вариантах осуществления в ходе осуществления способов экзогенные ферменты не добавляют.

В процессе сбраживания, которое продолжается в течение нескольких дней, происходит превращение сахара в спирт и CO₂, при этом образуются некоторые ароматические вещества. Сбраживание может быть прекращено в любое желаемое время, например, когда больше не наблюдается дальнейшее падение %P.

Впоследствии пиво может быть подвергнуто дополнительной обработке, например, охлаждению. Его также можно фильтровать и/или превращать в лагер - процесс, при котором появляется приятный аромат и менее дрожжевой вкус. Также могут быть добавлены добавки. Кроме того, может быть добавлен CO₂. Наконец, пиво можно пастеризовать и/или фильтровать перед упаковкой (например, перелить в контейнеры или кеги, разлить по бутылкам или консервировать). Пиво также можно пастеризовать стандартными способами.

Дополнительные соединения

Способы по изобретению могут включать стадию добавления одного или нескольких дополнительных соединений. Указанные дополнительные соединения могут, например, представлять собой ароматическое соединение, консервант, функциональный ингредиент, краситель, подсластитель, регулирующий pH агент или соль. Регулирующий pH агент может, например, представлять собой буфер или кислоту, такую как фосфорная кислота.

Функциональные ингредиенты могут представлять собой любой ингредиент, добавляемый для получения конкретной функции. Предпочтительно функциональный ингредиент делает напиток более полезным для здоровья. Неограничивающие примеры функциональных ингредиентов включают витамины или минералы.

Консервант может представлять собой любой пищевой консервант, например, это может быть бензойная кислота, сорбиновая кислота, сорбаты (например, сорбат калия), сульфиты и/или их соли.

Дополнительным соединением также может быть CO₂. В частности, CO₂ может быть добавлен для получения газированного напитка.

Ароматическое соединение, используемое в настоящем изобретении, может представлять собой любое полезное ароматическое соединение. Ароматическое соединение может быть выбрано, например, из группы, состоящей из ароматизаторов, растительных экстрактов, растительных концентратов, частей растений и травяных настоев. В частности, ароматические соединения могут представлять собой хмель.

Способы получения растения ячменя, несущего мутацию в гене *HvLDI* по изобретению

Растения ячменя, несущие мутацию в гене *HvLDI* по изобретению, могут быть получены с помощью любого подходящего способа.

Например, такие растения ячменя могут быть получены с помощью способа, включающего следующие стадии:

- a. обеспечение зерна ячменя; и
- b. подвергание указанного зерна ячменя случайному мутагенезу,
- c. отбор зерна ячменя или его частей, несущих мутированный ген *HvLDI*, кодирующий мутантный полипептид *HvLDI*, несущий одну из следующих мутаций:
 - i. миссенс-мутация, приводящая к замене Pro на другую аминокислоту в одном или нескольких петлевых участках *HvLDI*, где петлевые

участки соответствуют аминокислотам, соответствующим положениям 25-44, и аминокислотам, соответствующим положениям 56-62, и аминокислотам, соответствующим положениям 77-78, и аминокислотам, соответствующим положениям 91-111, и аминокислотам, соответствующим положениям 124-147 в SEQ ID NO:1; или

ii. миссенс-мутация, приводящая к замене аминокислоты на некислотную аминокислоту в одном или нескольких альфа-спиральных участках wt HvLDI, где альфа-спиральные участки соответствуют аминокислотам 45-55 и аминокислотам 63-76, и аминокислотам 79-90, и/или аминокислотам 112-123 в SEQ ID NO:1.

Такие способы могут также включать одну или несколько стадий репродукции указанных растений ячменя/зерна ячменя с получением множества растений/зерна ячменя, каждое из которых несет указанную мутацию.

В частности, растения ячменя, несущие определенную мутацию в гене *HvLDI*, могут быть получены и идентифицированы по существу так же, как описано в международной патентной заявке WO 2018/001884, с использованием праймеров и зондов, разработанных для идентификации мутации в гене *HvLDI*. Геномная последовательность HvLDI может быть извлечена из общедоступных баз данных с помощью поисков BLAST с использованием кодирующих последовательностей SEQ ID NO:2, или ее можно найти под номером доступа в GenBank DQ285564.1.

Растения ячменя, несущие мутацию в гене *HvLDI*, также могут быть получены с использованием различных методов сайт-направленного мутагенеза, которые, например, могут быть разработаны на основе последовательности кодирующей последовательности SEQ ID NO:2. В одном варианте осуществления растение ячменя получают с использованием любого из CRISPR, TALEN, цинкового пальца, мегануклеазы и антибиотика, разрезающего ДНК, как описано в WO 2017/138986. В одном варианте осуществления растение ячменя получают с использованием технологии CRISPR/cas9, например, с помощью РНК-управляемой нуклеазы Cas9. Это можно сделать, как описано в работе Lawrenson et al., *Genome Biology* (2015) 16:258; DOI 10.1186/s13059-015-0826-7, за исключением того, что одиночная направляющая последовательность РНК разработана на основе последовательности гена *HvLDI*. В одном варианте осуществления растение ячменя получают с использованием комбинации методов TALEN и CRISPR/cas9, например, с помощью РНК-управляемой нуклеазы Cas9. Это можно сделать так, как описано в Holme et al., 2017, за

исключением того, что последовательность TALEN и одиночной направляющей РНК созданы на основе последовательностей генов, представленных в настоящем документе.

В одном варианте осуществления растение ячменя получают с использованием направляемой гомологией репарации, комбинации ДНК-разрезающей нуклеазы и донорного фрагмента ДНК. Это может быть сделано, как описано в работе Sun et al., 2016, за исключением того, что ДНК-разрезающая нуклеаза сконструирована на основе последовательностей генов, представленных в настоящем документе, и донорный фрагмент ДНК создан на основе кодирующей последовательности мутированного варианта ячменя, представленного в настоящем документе.

В одном варианте осуществления изобретения целью является обеспечение агрономически применимых растений ячменя, несущих мутацию в гене *HvLDI*. В дополнение к мутации в гене *HvLDI* существуют дополнительные факторы, которые также могут учитываться при создании коммерческого сорта ячменя, применимого для соложения и/или пивоварения, и/или в качестве основы для напитков, например, выход и размер ядер, и другие параметры, относящиеся к характеристикам соложения или пивоварения. Поскольку было показано, что многие, если не все, важные признаки находятся под генетическим контролем, настоящее изобретение также обеспечивает современные, гомозиготные, высокоурожайные солодовые сорта, которые можно получить путем скрещивания с растениями ячменя, раскрытыми в настоящей публикации. Квалифицированный селекционер ячменя сможет отобрать и вырастить растения ячменя, которые после скрещивания с другими растениями ячменя приведут к получению лучших сортов. В качестве альтернативы селекционер может использовать растения по настоящему изобретению для дальнейшего мутагенеза для создания новых сортов, несущих дополнительные мутации в дополнение к мутации гена *HvLDI*.

Изобретение также включает растения ячменя, несущие мутацию в гене *HvLDI*, полученные методом разведения растений, включая методы самоопыления, обратного скрещивания, скрещивания с популяциями и т.п. Способы обратного скрещивания можно использовать в настоящем изобретении для введения в другой сорт мутации гена *HvLDI*.

Способ ускорения процесса разведения растений включает начальное размножение созданных мутантов путем применения культуры тканей и методов регенерации. Таким образом, другим аспектом настоящего изобретения является обеспечение клеток, которые при росте и дифференцировке продуцируют растения

ячменя, несущие мутацию гена *HvLDI*. Например, разведение может включать традиционные скрещивания, получение фертильных растений, полученных из пыльников, или использование культуры микроспор.

Пункты

Изобретение может быть дополнительно определяться следующими пунктами.

1. Растение ячменя или его часть, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене *HvLDI*, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где мутация представляет собой одну из следующих мутаций:

а. миссенс-мутация, приводящая к замене пролина на другую аминокислоту в одном или нескольких петлевых участках мутантного полипептида HvLDI, где петлевые участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 25-44, и аминокислот, соответствующих положениям 56-62, и аминокислот, соответствующих положениям 77-78, и аминокислот, соответствующих положениям 91-111, и аминокислот, соответствующих положениям 124-147 в SEQ ID NO:1; или

б. миссенс-мутация, приводящая к замене отрицательно заряженной аминокислоты на неотрицательно заряженную аминокислоту в одном или нескольких альфа-спиральных участках мутантного полипептида HvLDI, где альфа-спиральные участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 45-55, и аминокислот, соответствующих положениям 63-76, и аминокислот, соответствующих положениям 79-90, и аминокислот, соответствующих положениям 112-123 в SEQ ID NO:1.

2. Растение ячменя или его часть в соответствии с пунктом 1, где указанный мутантный полипептид HvLDI по меньшей мере на 90% идентичен зрелому полипептиду wt HvLDI в SEQ ID NO: 1.

3. Растение ячменя или его часть в соответствии с любым из пунктов 1 или 2, где указанный мутантный полипептид HvLDI на 98% идентичен зрелому полипептиду wt HvLDI, указанному в таблице 1A и 1B, или его природным вариантам.

4. Растение ячменя или его часть в соответствии с любым из пунктов 1-3, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где петлевые участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 56-62, и аминокислот, соответствующих положениям 77-78, и аминокислот, соответствующих положениям 91-111 в SEQ ID NO:1.

5. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, при этом указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина в одном или нескольких петлевых участках wt HvLDI на полярную аминокислоту.

6. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, при этом указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина в одном или нескольких петлевых участках HvLDI на серин.

7. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, при этом указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина в положении, соответствующем положению 60 в SEQ ID NO:1, на другую аминокислоту.

8. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, при этом указанный мутантный полипептид HvLDI состоит из LDI SEQ ID NO:1, имеющей замену пролина в положении 60 в SEQ ID NO:1 на другую аминокислоту.

9. Растение ячменя или его часть по п. 7 или 8, где пролин заменен серином.

10. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену пролина в аминокислотном положении 60 в SEQ ID NO:1 на серин.

11. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где мутантный полипептид HvLDI содержит или состоит из аминокислотной последовательности от положения 25 до 142 в SEQ ID NO: 3 или от положения 25 до 147 в SEQ ID NO: 3.

12. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где мутантный полипептид HvLDI содержит или состоит из аминокислотной последовательности от положения 25 до 142 в SEQ ID NO: 4 или от положения 25 до 147 в SEQ ID NO: 4.

13. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, содержащий замену отрицательно заряженной аминокислоты в одном или нескольких альфа-спиральных участках HvLDI на положительно заряженную аминокислоту.

14. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, при этом указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену отрицательно заряженной аминокислоты в одном или нескольких альфа-спиральных участках HvLDI на лизин.

15. Растение ячменя или его часть по любому из пунктов 13 или 14, где указанная отрицательно заряженная аминокислота представляет собой глутаминовую кислоту (Glu).

16. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, при этом указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену глутаминовой кислоты в положении, соответствующем положению 68 в SEQ ID NO:1, на неотрицательно заряженную аминокислоту.

17. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, при этом указанный мутантный полипептид HvLDI состоит из LDI SEQ ID NO:1, имеющей замену глутаминовой кислоты в положении 68 в SEQ ID NO:1 на неотрицательно заряженную аминокислоту.

18. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, при этом указанный мутантный полипептид HvLDI содержит замену глутаминовой кислоты в аминокислотном положении 68 в SEQ ID NO: 1 на лизин.

19. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где мутантный полипептид HvLDI содержит или состоит из аминокислотной последовательности от положения 25 до 142 в SEQ ID NO: 6 или от положения 25 до 147 в SEQ ID NO: 6.

20. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где зерно указанного растения ячменя имеют активность свободной HvLD, которая по меньшей мере на 20% выше по сравнению со активностью свободной HvLD, измеренной в зерне растения ячменя, несущего ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt HvLDI, но в остальном того же генотипа, при культивировании в тех же условиях.

21. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанное проросшее зерно имеют активность свободной HvLD, которая по меньшей мере на 20% выше по сравнению со активностью свободной HvLD,

измеренной в проросшем зерне растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при получении в тех же условиях.

22. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где солод, полученный из указанного растения ячменя, имеет активность свободной *HvLD*, которая по меньшей мере на 20% выше по сравнению с активностью свободной *HvLD*, измеренной в солоде растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при получении в тех же условиях.

23. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанная активность свободной *HvLD* по меньшей мере на 50% выше, например, по меньшей мере на 100% выше, предпочтительно по меньшей мере на 140% выше по сравнению с активностью свободной *HvLD*, измеренной в солоде растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при получении в тех же условиях.

24. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где зерно или проросшее зерно, или солод из указанного растения ячменя имеют % активность свободной/общей *HvLD*, которая по меньшей мере на 20% выше по сравнению с % активностью свободной/общей *HvLD*, измеренной в зерне или проросшем зерне, или солоде, соответственно, растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при культивировании и получении в тех же условиях.

25. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанное растение ячменя несет одну или несколько мутаций в гене *HvLDI*, выбранных из группы, состоящей из:

- i. мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 966 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2); и
- ii. мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 967 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2); и
- iii. мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 968 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2); и
- iv. мутации G в A в положении, соответствующем нуклеотиду 990 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2).

26. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где указанное растение ячменя несет мутации в гене *HvLDI*, состоящие из мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 966 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2).

27. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где растение ячменя представляет собой растение ячменя, депонированное под номером доступа NCIMB 43581 в NCIMB, или его потомство.

28. Растение ячменя или его часть по любому из пунктов 1-25, где указанное растение ячменя несет мутации в гене *HvLDI*, состоящие из мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 967 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2).

29. Растение ячменя или его часть по любому из пунктов 1-25, где указанное растение ячменя несет мутации в гене *HvLDI*, состоящие из мутации нуклеотида G на А в положении, соответствующем нуклеотиду 990 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2).

30. Растение ячменя или его часть по любому из пунктов 1-24, где указанное растение ячменя несет мутации в гене *HvLDI*, состоящие из мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 966, и мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 967 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2).

31. Растение ячменя или его часть по любому из пунктов 1-25, где указанное растение ячменя несет мутации в гене *HvLDI*, состоящие из мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 966, и мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 968 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2).

32. Растение ячменя или его часть по любому из пунктов 1-24, где указанное растение ячменя несет мутации в гене *HvLDI*, состоящие из мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 967, и мутации нуклеотида G на А в положении, соответствующем нуклеотиду 990 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2).

33. Растение ячменя или его часть по любому из пунктов 1-24, где указанное растение ячменя несет мутации в гене *HvLDI*, состоящие из мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 966, и мутации нуклеотида G на А в

положении, соответствующем нуклеотиду 990 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2).

34. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где растение ячменя представляет собой растение ячменя, депонированное под номером доступа NCIMB 43582 в NCIMB, или его потомство.

35. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где зерно указанного растения ячменя имеют массу тысячи зерен по меньшей мере 45 грамм, такую как по меньшей мере 50 грамм, такую как по меньшей мере 55 грамм.

36. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где зерно указанного растения ячменя имеют массу тысячи зерен по меньшей мере 80%, такую как по меньшей мере 85%, такую как по меньшей мере 90%, такую как по меньшей мере 95% по сравнению с зерном растения ячменя, несущего ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при выращивании в тех же условиях.

37. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где зерно указанного растения ячменя имеют содержание крахмала по меньшей мере 50%, такое как по меньшей мере 55%, такое как по меньшей мере 60%.

38. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где зерно указанного растения ячменя имеют содержание крахмала по меньшей мере 80%, такое как по меньшей мере 85%, такое как по меньшей мере 90%, такое как по меньшей мере 95% по сравнению с зерном растения ячменя, несущего ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при выращивании в тех же условиях.

39. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где растение ячменя дополнительно содержит мутацию в одном или нескольких дополнительных генах, например, одну или несколько из следующих мутаций:

а. мутация в гене, кодирующем LOX-1, приводящая к полной потере функциональной LOX-1;

б. мутация в гене, кодирующем LOX-2, приводящая к полной потере функциональной LOX-2;

с. мутация в гене, кодирующем MMT, приводящая к полной потере функциональной MMT;

д. мутация в гене, кодирующем CslF6, где указанный мутантный ген кодирует мутантный белок CslF6 со сниженной активностью CslF6;

е. мутация в гене, кодирующем ген HRT, приводящая к потере функции HRT;

ф. мутация в гене, кодирующем ген HBL12, приводящая к потере функции HBL;

г. мутация в гене, кодирующем ген WRKY38, приводящая к потере функции WRKY38;

h. мутация *ant*, например, мутация в гене *Hvmyb10*.

40. Растительный продукт, содержащий растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов.

41. Растительный продукт по пункту 40, где растительный продукт выбран из группы, состоящей из:

а. солода, приготовленного из зерна указанного растения ячменя;

б. водного экстракта, например, сусла, приготовленного из зерна указанного растения ячменя и/или из солода, содержащего переработанное зерно(а) указанного растения ячменя; и

с. напитка, например, пива, приготовленного из указанного растения ячменя или его частей.

42. Способ приготовления солода, включающий следующие стадии:

а. обеспечение зерна растения ячменя по любому из пунктов 1-38;

б. замачивание и проращивание указанного зерна в предварительно определенных условиях;

с. необязательно сушку указанного проросшего зерна.

43. Способ по п. 42, в котором замачивание и проращивание включают следующие стадии:

а. инкубацию зерна растения ячменя по любому из пунктов 1-38 в водном растворе в течение 5-10 ч в условиях аэрации газом, содержащим кислород (например, чистый кислород или воздух);

б. слив водного раствора и подвергание зерна воздушной выдержке в течение 8-16 ч, предпочтительно в условиях аэрации;

с. инкубацию зерна в водном растворе в течение 2-10 ч в условиях аэрации газом, содержащим кислород; и

д. слив водного раствора и подвергание зерна второй фазе воздушной выдержки в течение 8-20 ч, предпочтительно в условиях аэрации,

при этом содержание воды в зерне составляет по меньшей мере 20% в любой момент времени после стадии а,

и стадии с) по п. 42 не выполняется.

44. Способ по п. 42 или 43, в котором указанную стадию замачивания и проращивания проводят в течение не более 4 дней, например, не более 3 дней, предпочтительно в течение от 48 до 72 часов.

45. Способ приготовления водного экстракта, включающий следующие стадии:

а. обеспечение зерна растения ячменя по любому из пунктов 1-39 и/или солода, полученного в соответствии со способом по любому из пунктов 42-44;

б. приготовление водного экстракта указанного зерна и/или указанного солода, например, сусла.

46. Способ по п. 45, в котором указанный солод сохраняет содержание воды, составляющее по меньшей мере 20% от его содержания от момента его производства до использования для приготовления водного экстракта.

47. Способ по п. 45, в котором указанный водный экстракт имеет по меньшей мере на 5% больше общих сбраживаемых сахаров по сравнению с водным экстрактом растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt HvLDI, но в остальном того же генотипа, при приготовлении в тех же условиях.

48. Способ по пунктам 45-46, в котором указанный водный экстракт содержит по меньшей мере на 10% больше глюкозы, фруктозы и/или мальтотриозы по сравнению с водным экстрактом растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt HvLDI, но в остальном того же генотипа, при приготовлении в тех же условиях.

49. Способ получения напитка, включающий следующие стадии:

а. обеспечение зерна растения ячменя по любому из пунктов 1-39 и/или солода, полученного в соответствии со способом по любому из пунктов 42-44; и

б. приготовление водного экстракта из указанного зерна и/или солода; или

с. переработку указанного водного экстракта в напиток.

50. Способ по п. 49, в котором стадию б. осуществляют с помощью способа в соответствии с любым из пунктов 45-48.

51. Способ получения растения ячменя, включающий следующие стадии:

а. обеспечение зерна ячменя; и

б. подвергание указанных зерен ячменя случайному мутагенезу,

с. отбор зерна ячменя или их частей, несущих мутированный ген *HvLDI*, кодирующий мутантный полипептид *HvLDI*, несущий одну из следующих мутаций:

i. миссенс-мутация, приводящая к замене пролина на другую аминокислоту в одном или нескольких петлевых участках *HvLDI*, где петлевые участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 25-44, и аминокислот, соответствующих положениям 56-62, и аминокислот, соответствующих положениям 77-78, и аминокислот, соответствующих положениям 91-111, и аминокислот, соответствующих положениям 124-147 в SEQ ID NO:1; или

ii. миссенс-мутация, приводящая к замене отрицательно заряженной аминокислоты на неотрицательно заряженную аминокислоту в одном или нескольких альфа-спиральных участках wt *HvLDI*, где альфа-спиральные участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 45-55, и аминокислот, соответствующих положениям 63-76, и аминокислот, соответствующих положениям 79-90, и аминокислот, соответствующих положениям 112-123 в SEQ ID NO:1.

Последовательности

SEQ ID NO: 1

Аминокислотная последовательность wt *HvLDI Hordeum vulgare*. Номер доступа в UniProt Q2V8X0.

```
MASDHRRFVLSGAVLLSVLAVAAATLESVKDECQPGVDFPHNPLATCHTYVIKRVCGRGPSRPMLVKERCCRELA  
AVPDHCRCEALRILMDGVRTPEGRVVEGRLGDRRDCPREEQRAFAATLVTAAE CNLSSVQEPGVRVLVLLADG
```

SEQ ID NO: 2

ДНК-последовательность wt *HvLDI Hordeum vulgare* полной CDS DQ285564.1

TTATTGGACACCAAATGTATCATAAACTTGT TTTTTCACCGACAAAATATTGCTCCTCCATTTTCGCATTAAAATTGT
 CAAGCATGCTTGCAACAGTAACACGAACATTCATAAAAAAATATTTTAAAGAAAACATTTACTATTTTTTTGTTA
 CTATTCATCTGGGAGCATGTGCTTCCGGAAGCCAAAATGCCCTTCCAATATGCCCCGTGTAAAAGAAACCCCTTCT
 TTCTTAAAAATATATATCATCGTCCGTCATGATACGTTTATGTATTCAACGAAAAATATTTTCGCATGTCACCAAAA
 ATGTTTTATATTACACAAGTGAACAAATATGATAAACTCCCTCGTGTTAACTATTTTTCTGTGAAATAAAAGGATG
 ACAATCAAAACAAAAATGTAGACTGTAAACAAAGAAAACATTATTTCTAGAAATAAAAAAAGATTAGAGGGATA
 TGTATTGTCGAAACACATGAGGACTAGAACAAAAGAAAAGGGAAATGAGAAGGAAAAAAGGGGTAACCATTACCCA
 AAGAAAACAGAAAGTAACTAGACGTGTCGAAGGGAAACGGAGTTTGACAGGGGCGTTCCAAATTCAGTTGCAAGAAC
 CTCCAAATAAACGCCAACAAGAAAGAAATGAGCATTACTTGC GCGCTTTGCACTCTTATCTCTAGCATCTCCCGATA
 CATAACATATGTAGCCTAGCTGCAGATCTTGAATAGCTATTCTTGCCACCAGGCCAAGAGATTGAACCAACGACC
 AATAAACTAGTATCAACA**ATGG**CATCCGACCATCGTCGCTTCGTCCTCTCCGGCGCCGTCTTGCTCTCGGTCTCTCGC
 CGTCGCCGCCGCCACCCTGGAGAGCGTCAAGGACGAGTGCCAACCAGGGGTGGACTTCCCGCATAACCCGTTAGCCA
 CCTGCCACACCTACGTGATAAAACGGGTCTGCGGCCGCGGTCCAGCCGGCCCATGCTGGTGAAGGAGCGGTGCTGC
 CGGGAGCTGGCGGCCGTCCCGGATCACTGCCGGTGCGAGGCGCTGCGCATCCTCATGGACGGGGTGCGCACGCCGGA
 GGGCCGCGTGGTTGAGGGACGGCTCGGTGACAGGCGTGA CTGCCCAGGGAGGAGCAGAGGGCGTTCCGCCCCACGC
 TTGTCACGGCGGCGGAGTGCAACCTATCGTCCGTCCAGGAGCCGGGAGTACGCTTGGTGCTACTGGCAGATGGATGA
 CGATCGAAATGCGCCAAGGTAATGAAGCGGAGTACTGTATACAGAATAAAAGTA

ATG, выделенный жирным шрифтом, представляет собой стартовый кодон для кодирования SEQ ID NO: 1. Подчеркнутые кодоны соответствуют кодомам, которые мутированы в соответствии с настоящим изобретением.

SEQ ID NO:3

Аминокислотная последовательность мутантного P60S HvLDI *Hordeum vulgare* (HENZ-16a)

MASDHRRFVL SGAVLLSVLAVAAATLESVKDECQPGVD FPHNPLATCHTYVIKRVCGRGSSRPMLVKERCCRELA AV
 PDHCRCEALRILMDGVRTPEGRVVEGRLGDRRDCPREEQRAFAATLVTA AECNLSSVQEPGVRLVLLADG

SEQ ID NO:4

Аминокислотная последовательность мутантного P60L HvLDI *Hordeum vulgare* (HENZ-16b)

MASDHRRFVL SGAVLLSVLAVAAATLESVKDECQPGVD FPHNPLATCHTYVIKRVCGRGLSRPMLVKERCCRELA AV
 PDHCRCEALRILMDGVRTPEGRVVEGRLGDRRDCPREEQRAFAATLVTA AECNLSSVQEPGVRLVLLADG

SEQ ID NO:5

Аминокислотная последовательность мутантного V66M HvLDI *Hordeum vulgare* (HENZ-18)

MASDHRRFVL SGAVLLSVLAVAAATLESVKDECQPGVD FPHNPLATCHTYVIKRVCGRGP SRPMLMKERCCRELA AV
 PDHCRCEALRILMDGVRTPEGRVVEGRLGDRRDCPREEQRAFAATLVTA AECNLSSVQEPGVRLVLLADG

SEQ ID NO:6

Аминокислотная последовательность мутантного E68K HvLDI *Hordeum vulgare* (HENZ-31)

MASDHRRFVLSGAVLLSVLAVAAATLESVKDECQPGVDFPHNPLATCHTYVIKRVCGRGPSPRMLVKKRCCRELA
AVPDHCRCEALRILMDGVRTPEGRVVEGRLGDRRDCPREEQRAFAATLVTAECNLSSVQEPGVRLVLLADG

SEQ ID NO: 7

Аминокислотная последовательность wt HvLD *Hordeum vulgare*. Номер доступа UniProt Q9FYY0

MAVGETGASVSAAEAEAEATQAFMPDARAYWVTSDLIAWNVGELEAQSVCLYASRAAAMSLSPSNGGIQGYDSKVEL
QPESAGLPETVTQKFPISSYRAFKVPSSVDVASLVKCQLVVASFGADGKHVDVTGLQLPGVLDDMFAYTGPLGAVF
SEDSVSLHLWAPTAQGVSVCFDDGPAGPALETVQLKESNGVWSVTGPREWENRYLYEVDVYHPTKAQVLKCLAGDP
YTRSLSANGARTWLVDINNETLKPASWDELADEKPKLDSFSDITIYELHIRDFSAHDGTVDSDSRGGFRAFAYQASA
GMEHLRKLSDAGLTHVLLPSFHFAGVDDIKSNWKVFDECELATFPPGSDMQAAVVAIQEEDPYNWGYNPVLWGVP
KGSYASDPDGPRIIEYRQMVQALNRIGLCVMDVVYNHLDSSGPCGISSVLDKIVPGYYVRRDTNGQIENSAAMNN
TASEHFMVDRLIVDDLLNWAVNYKVDGFRFDLMGHIMKRTMMRAKSALQSLTTDAHGVDGSKIYLYGEGWDFAEVAR
NQRGINGSQLNMSGTGIGSFNDRIRDAINGGNPFGNPLQQGFNTGLFLEPNIFYQNEADTRRSLATYADQIQIGLA
GNLRDYVLISHTGEAKKGSEIHTFDGLPVGYTASPIETINYVSAHDNETLFDVIVSKTPMILSVDERCRINHASSM
MALSQGIPIFFHAGDEILRSKSIDRDSYNSGDWFNKLDFTYETNNWGVGLPPSEKNEDNWPMLKPRLENPSFKPAKGH
ILAALDSFVDILKIRYSSPLFRLSTANDIKQVRFHNTGPSLVPGVIVMGIEDARGESPEMAQLDTNFSYVVTVFNV
CPHEVSMDIPALASMGFELHPVQVNSSDTLVRKSAYEAATGRFTVPGRTVSVFVEPRC

SEQ ID NO: 8

Нуклеотидная последовательность wt HvLD *Hordeum vulgare*. Номер доступа в GenBank AF252635.1

ATGGCGGTGCGGGGAGACCGGCGCCTCCGTCTCCGCAGCCGAGGCCGAGGCCGAGGCCACCCAGGCGTTTCATGCCGGA
CGCCAGGGCGTACTGGGTGACGAGCGACCTCATCGCCTGGAACGTCGGCGAGCTGGAAGCGCAGTCCGTCTGCCTGT
ACGCCAGCAGAGCCGCCGCGATGAGCCTCTCGCCGTCGAATGGCGGCATCCAAGGCTACGACTCCAAGGTTGAGCTG
CAACCGGAGAGCGCCGGGCTCCCGGAAACCGTGACCCAGAAGTTCCTTTTCATCAGCAGTTACAGAGCATTCAGGT
CCCAGCTCTGTGACGTCGCCAGCCTTGTGAAATGCCAACTGGTCGTCGCTTCTTTCGGCGCTGACGGGAAACACG
TAGATGTTACTGGACTGCAATTACCCGGCGTGTGGATGATATGTTTCGCATACACGGGACCGCTCGGTGCGGTTTTT
AGCGAGGACTCTGTGAGCCTGCACCTTTGGGCTCCTACAGCACAGGGCGTGAGCGTGTGCTTCTTTGATGGTCCAGC

AGGCCCTGCGCTAGAGACGGTGCAGCTCAAGGAGTCAAATGGTGTTTGGAGTGTCACTGGACCAAGAGAGTGGGAAA
 ACCGGTACTATTTGTATGAAGTCGACGTGTATCATCCAATAAGGCGCAGGTTCTGAAATGTTTAGCTGGTGACCCT
 TATACTAGAAGCCTTTCTGCAAATGGAGCGCGTACCTGGTTGGTTGACATTAACAATGAGACATTGAAGCCGGCTTC
 CTGGGATGAATTGGCTGATGAGAAGCCAAAACCTTGATTCTTCTCTGACATAACCATCTATGAATTGCACATTCGTG
 ATTTTAGCGCCACGATGGCACAGTGGACAGTGACTCTCGTGGAGGATTTCTGTCATTGTCATATCAGGCCCTCGGCA
 GGAATGGAGCACCTACGGAATTATCTGATGCTGGTTTGACTCATGTGCATTTGTTGCCAAGCTTTCATTTTGCTGG
 CGTTGACGACATTAAGAGCAACTGGAAATTTGTCGATGAGTGTGAAGTAGCAACATTCCCTCCAGGGTCAGATATGC
 AACAAGCAGCAGTAGTAGCTATTAGGAAGAGGACCCCTTATAATTGGGGGTATAACCTGTGCTCTGGGGGGTTCCA
 AAAGGAAGCTATGCAAGTGACCCTGATGGCCCAGTGAATTATTGAATATCGTCAGATGGTCCAGGCCCTCAATCG
 CATAGGTCTTTGTGTTGTCATGGATGTTGTATACAATCATCTAGACTCAAGTGGCCCTGCGGTATCAGCTCAGTGC
 TTGACAAGATTGTTCTGGGTACTATGTTAGAAGGGATACTAATGGCCAGATTGAGAACAGTGCAGCTATGAACAAT
 ACAGCAAGTGAGCATTTTCATGGTTGATAGGTTAATCGTGGATGACCTTTTGAAGTGGGCAGTAACTACAAAGTTGA
 CGGGTTCAGATTTGATCTTATGGGCCATATCATGAAACGCACAATGATGAGAGCAAAATCTGCTCTTCAAAGCCTTA
 CAACAGATGCACATGGAGTTGATGGTTCAAAAATATACTTGTATGGTGAAGGATGGGACTTCGCTGAAGTTGCACGC
 AATCAACGTGGAATAAATGGGTCCCAGCTTAATATGAGTGAACGGGGATTGGTAGCTTCAATGATAGAATCCGGGA
 TGCTATTAATGGGGGTAATCCCTTTGGTAATCCGCTCCAGCAAGGCTTCAATACTGGTCTGTTCTTAGAGCCGAATG
 GGTTTTATCAGGGCAATGAAGCAGATAACCAGGCGCTCGCTCGCTACTTATGCTGACCAAATACAGATTGGACTAGCT
 GGTAATCTGAGGGATTATGTACTAATATCTCATACTGGAGAAGCTAAGAAGGGATCAGAAATTCACACTTTTGATGG
 ATTACCAGTAGGCTATACTGCGTCCCAATAGAAACGATAAACTATGTTTCTGCTCATGACAATGAGACTCTATTTG
 ATGTTATCAGTGTGAAGACCCCAATGATCCTTTAGTTGATGAGAGATGCAGGATAAATCATTTGGCCTCCAGCATG
 ATGGCATTATCCCAGGGAATACCCTTCTTCCACGCTGGTGACGAGATACTAAGATCTAAGTCCATCGACCGAGATTC
 ATATACTCTGGTGATTGGTTTAAACAAGCTTGATTTTACCTATGAAACAAACAATTGGGGTGTTGGGCTTCCTCCAA
 GTGAAAAGAACGAAGATAATTGGCCCCTGATGAAACCAAGATTGGAATCCGTCCTTTAAACCTGCAAAAGGACAC
 ATTCTTGCTGCCCTAGACAGTTTTGTTGACATCTTGAAGATCAGATACTCATCTCCACTTTTTCGTCTCAGTACAGC
 AAATGACATTAAAGCAAAGGTACGCTTTCACAACACAGGGCCCTCCTTAGTCCCAGGTGTTATTGTGTCATGGGCATTG
 AAGATGCACGAGGTGAGAGCCCCGAGATGGCTCAATTAGACACGAACCTTCTCTTATGTCGTAACCGTCTTCAATGTG
 TGCCGCACGAAGTGTCCATGGATATCCCCGCTCTCGCTTCGATGGGGTTTGAAGTGCATCCTGTGCAGGTGAATTC
 ATCAGATACTTTGGTGAGGAAATCGGCGTACGAGGCCGCGACGGGCAGGTTACCGTGCCCGGAAGAACCGTGTCAG
 TCTTTGTCGAACCTCGGTGTTGA

Ссылки на использованную литературу

Blennow, A., et al. (1998) The degree of starch phosphorylation is related to the chain length distribution of the neutral and the phosphorylated chains of amylopectin. *Carbohydr. Res.* 307: 45-54.

Calum et al 2004 *J Inst Brewing* 110(4): 284-296

Himi et al., 2012 *Euphytica* (2012) 188:141-151 DOI 10.1007/s10681-011-0552-5 Hough J.S., Briggs D.E., Stevens R. and Young T.W., *Malting and Brewing Science*, Springer US, 1982, doi 10.1007/978-1-4615-1799-3

Huang et al. *BMC Plant Biol.* 2014; 14: 117. PMID: [24885294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24885294/).

Jende-Strid, 1993, Hereditas 119:187-204

Li et al. (2015 April 06) Nucleic Acids Research 43 (W1) :W580-4 PMID: [25845596](#)

McWilliam et al., (2013 May 13) Nucleic Acids Research 41 (Web Server issue) :W597-600 PMID: [23671338](#)

Moller et al. (2015). The journal of biological chemistry vil.290, no 20, pp 12614-12629.

Shaik, S.S., et al. (2014) Starch bioengineering affects cereal grain germination and seedling establishment. J. Exp. Bot. 65: 2257-2270.

Sievers et al. (2011 October 11) Molecular Systems Biology 7:539, PMID: [21988835](#)

Stahl et al 2007 Plant Science 172(3): 452-561

Примеры

Пример 1. Скрининг мутантов ячменя (Hv) со специфическими мутациями в гене LDI

Сначала получали четыре HvLDI со специфической мутацией, приводящей к замене аминокислотного остатка в LDI (таблица 2).

Таблица 2. Мутанты HvLDI

Мутант HvLDI (Внутренний ID)	Нуклеотидная замена в кодирующей последовательности (SEQ ID NO:2)	Аминокислотная замена в белке (SEQ ID NO:1)
HENZ-16a	C на T (966)	Pro на Ser (60)
HENZ-16b	C на T (967)	Pro на Leu (60)
HENZ-18	G на A (984)	Val на Met (66)
HENZ-31	G на A (990)	Glu на Lys (68)

Затем мутанты растения ячменя HENZ-16a, HENZ-18, HENZ-31 получали путем случайного мутагенеза с последующей идентификацией методом на основе ddPCR, выполняемым по существу так же, как описано в международной патентной заявке WO 2018/001884. Более конкретно, был подготовлен пул случайно мутагенизированного зерна ячменя (родительский сорт Paustian и Planet) с последующим получением упорядоченной библиотеки, как описано в международной патентной заявке WO

2018/001884 в WS1 и WS2 на стр. 66-69, а также в примерах 1-2 (включенных в настоящий документ в качестве ссылки).

Ген HvLDI дикого типа, кодирующий HvLDI SEQ ID NO:1 (номер доступа UniProt Q2V8X0), использовали в качестве эталонного гена для HvLDI дикого типа.

Мутанты растений ячменя HENZ-16a, HENZ-16b, HENZ-18, HENZ-31 идентифицировали и отбирали, как описано в международной патентной заявке WO 2018/001884 в WS3 и WS4 на стр. 67-72, а также в примерах 3-15 с использованием праймеров и зондов, указанных в таблице 3 ниже.

Фон, т.е. родительское растение, для HENZ-16a, HENZ-16b и HENZ-18 представлял собой Paustian, и фон для HENZ-31 представлял собой Planet. Растения ячменя Paustian и Planet содержат ген HvLDI дикого типа, кодирующий полипептид HvLDI. Paustian можно приобрести у компании Sejet Plant Breeding, Norremarksvej 67, 8700 Horsens DK. Planet можно приобрести в компании RAGT Semences, Rue Emile Singla, 12000 Rodez, France.

Таблица 3. Праймеры и зонды, разработанные для конкретных мутантов растений ячменя

Мутант растения ячменя	Мишень-специфический прямой праймер	Мишень-специфический обратный праймер	Мутант-специфический детекторный зонд, меченый 6-карбоксифлуоресцеином (FAM)	Эталон-специфический детекторный зонд, меченый 6-карбоксифлуоресцеином (HEX)
HENZ-16a	CTACGTGAT AAAACGGGT C (SEQ ID NO:9)	CCGCTCCTT CACCAG (SEQ ID NO:10)	CGGCTGGAACC GC (SEQ ID NO:11)	CCGGCTGGGA CCG (SEQ ID NO:12)
HENZ-18	GCCGCGGTC CCA (SEQ ID NO:13)	CAGTGATCC GGGACG (SEQ ID NO:14)	ATGCTGATGAA GGAGCG (SEQ ID NO:15)	ATGCTGGTGAA GGAGC (SEQ ID NO:16)
HENZ-31	GCCGCGGTC CCA (SEQ ID NO:17)	CAGTGATCC GGGACG (SEQ ID NO:18)	TGGTGAAGAAG CGGTG (SEQ ID NO:19)	TGGTGAAGGAG CGGT (SEQ ID NO:20)

Пример 2. Исследования связывания *in vitro*

Способ

Коммерчески доступный анализ *in vitro* (Pullulanase/Limit-Dextrinase Assay Kit PullG6 Method, Megazyme, Ireland) использовали в соответствии с инструкциями производителя для оценки способности рекомбинантного экспрессируемого

полипептида HvLDI ингибировать активность рекомбинантной предельной декстриназы *Hordeum vulgare* (HvLD).

Способ PullG6 для измерения активности предельной декстриназы основан на использовании определенного водорастворимого субстрата, а именно 4,6-*O*-бензилиден-4-нитрофенил-6³-альфа-D-мальтотриозил-мальтотриозы (BPPNPG3G3), в сочетании со вспомогательными ферментами альфа-глюкозидазы и бета-глюкозидазы.

После специфического гидролиза 1,6- α -связи в субстрате предельной декстриназой следует дальнейший гидролиз до глюкозы и 4-нитрофенола ферментами альфа-глюкозидазой и бета-глюкозидазой, и реакцию останавливали добавлением щелочного раствора. Поглощение при 400 нм может напрямую коррелировать с активностью предельной декстриназы.

Для синтеза высоких уровней растворимого рекомбинантного HvLDI соответствующий ген (NS03) вставляли в вектор экспрессии *E. coli* pSol-SUMO (Lucigen, USA).

Для гетерологичной экспрессии использовали химически компетентные клетки *E. coli* 10G, трансформированные HvLDI дикого типа или содержащие нуклеотидные мутации в pSol-SUMO. Очистку белка осуществляли с использованием 5-мл колонки для аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (IMAC) (GE Healthcare, USA), и N-концевую метку удаляли путем расщепления протеазой TEV.

Концентрацию белка обогащенного, расщепленного и концентрированного HvLDI определяли с помощью анализа белка Pierce 660 нм (ThermoFisher Scientific, USA) перед анализом ингибирования *in vitro*.

В случае рекомбинантной wt HvLD соответствующий ген (SEQ ID NO:7) вставляли в вектор экспрессии pET28a (Novagen, USA) (Now Merck biosciences, Germany). Экспрессию проводили в экспрессионных клетках BL21 (DE3) (New England Biolabs, USA). Белок очищали на колонке для аффинной хроматографии с металлом HisTrap FF (GE Healthcare, USA), переносили в буфер PBS и концентрировали до 4,6 мг/мл перед использованием в анализах.

Анализ был уменьшен в масштабе, чтобы его можно было осуществить в общем реакционном объеме 25 мкл. В предварительных экспериментах конечная концентрация 1,5 мкМ HvLD привела к хорошему сигналу в стандартных условиях реакции с возможностью обнаружения ингибирования, но также и активации, при необходимости. Серийное разведение очищенного рекомбинантного мутантного HvLDI или wt HvLDI готовили в реакционном буфере (100 мМ малеат натрия, pH 5,5) и

10 мкл каждого разведения смешивали с 10 мкл 6 мкМ рекомбинантного HvLD в том же буфере. Смесь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Реакцию начинали добавлением 12,5 мкл HvLD/HvLDI к такому же объему реагента Р6. Реакция продолжалась в течение 30 мин при 40°C и была остановлена добавлением 187,5 мкл останавливающего реагента [2% (масс./об.) раствора Tris-основания, pH 9,0]. Аликвоту в 50 мкл каждой остановленной реакции переносили в отдельные лунки 96-луночного микропланшета с плоским дном с половинным объемом лунок. Поглощение при длине волны 400 нм измеряли снизу на устройстве для считывания микропланшетов SpectraMax 340PC384 (Molecular Devices, США) с использованием коррекции траектории для учета незначительных различий в объеме. Данные экспортировали, фон (HvLD заменяли таким же объемом реакционного буфера) вычитали и строили график зависимости поглощения от концентрации HvLDI в анализе. Полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC₅₀) определяли с помощью GraphPad Prism (версия 4, GraphPad Software, USA). См. фигуру 1 для активности свободной HvLD.

Результаты

Очищенный рекомбинантный wt и мутантный HvLDI использовали в коммерчески доступном ферментном анализе для определения активности свободной HvLD. Способность wt HvLDI дикого типа и мутантного HvLDI ингибировать рекомбинантную экспрессируемую HvLD оценивали по количеству хромофора, высвобождаемого во время анализа. Для всех протестированных мутантов была необходима заметно более высокая концентрация, чтобы увидеть ингибирующий эффект по сравнению с wt (см. фигуру 1 и таблицу 4).

Мутации P60, V66M и E68K показали значительное снижение способности ингибировать HvLD. HvLDI-P60L не полностью ингибирует HvLD даже при самой высокой тестируемой концентрации. Значительно более высокие концентрации HvLDI-P60L, HvLDI-P60S, HvLDI-V66M и HvLDI E68K необходимы для достижения ингибирования % активности HvLD по сравнению с растениями ячменя wt-LDI.

Таблица 4

LDI*	IC50 (мкМ)	Стандартное отклонение
WT	1,56	0,05
P60L	13,2	0,6
P60S	10,1	0,2
V66M	15,3	0,5
E68K	7,10	n/a**

*WT представляет собой LDI SEQ ID NO:1, указаны мутации по отношению к SEQ ID NO:1

** Стандартное отклонение не рассчитывалось, но визуальный осмотр графиков показал, что данные полезны

Пример 3. Тест на всхожесть

Следующие растения ячменя HENZ-16, HENZ-18, HENZ-31, Paustian и Planet выращивали на поле в Новой Зеландии в сезоне 2017/2018 в стандартных условиях и собирали после достижения зерном зрелости.

Все образцы зерна ячменя оценивали на следующие параметры: показатель всхожести (G-индекс), энергию прорастания и чувствительность к воде. Данные основаны на двух размерах образцов из 100 зерен для 4 мл теста на всхожесть и размере образца из 100 зерен ячменя для 8 мл теста на всхожесть в соответствии с методом Analytical-EBC Method 3.6.2 Germinative Energy of Barley: BRF Method, 2004.

Проросшее зерно подсчитывали через 24, 48 и 72 часа инкубации на чашке Петри с двумя фильтровальными бумагами (Whatman, Grade 1, 85 мм, номер по каталогу 1001-085) и 4 мл воды Milli-Q во влажном боксе при 20°C.

G-индекс

G-индекс является показателем всхожести в течение периода, составляющего 3 дня, описываемым следующим уравнением: $10 \cdot (x+y+z)/(x+2 \cdot y+3 \cdot z)$, где x обозначает количество проросшего зерна, подсчитанное через 24 ч, y обозначает количество проросшего зерна, подсчитанного через 48 ч, и z обозначает количество проросшего зерна, подсчитанного через 72 ч.

Энергия прорастания

Энергия прорастания описывает процент проросшего зерна от общего количества зерна в тесте на всхожесть. Энергия прорастания рассчитывается на основе данных, основанных на подсчете проросшего зерна каждые 24 часа на протяжении 3 дней.

Чувствительность к воде

Чувствительность к воде измеряли путем подсчета проросшего зерна после 72 часов инкубации в чашке Петри с 8 мл воды Milli-Q и сравнения с 4 мл : Энергия прорастания_{4мл} – Энергия прорастания_{8мл}

Результаты

Таблица 5

	G-индекс	Энергия прорастания, 4 мл	Энергия прорастания, 8 мл	Чувствительность к воде (%)
HENZ-16	8,3	96,5	44,0	52,5
HENZ-18	7,3	96,0	51,0	45,0
Paustian	8,5	96,5	38,0	58,5
HENZ-31	8,0	98,0	66,0	32,0
Planet	8,0	98,5	84,0	14,5

Не наблюдалось существенного различия в индексе прорастания (G-индекс), энергии прорастания и чувствительности к воде для зерна от HvLDI-мутантного растений ячменя по сравнению с зерном от растений ячменя дикого типа.

Пример 4. Температура клейстеризации

Следующие растения ячменя HENZ-16a, HENZ-31, Paustian и Planet выращивали в Дании в 2017 году в стандартных условиях и собирали после достижения зерном зрелости.

Образцы зерна ячменя перемалывали в мелкую муку с использованием лабораторной шаровой мельницы Retsch. Приблизительно 115 мг ячменной муки смешивали с 3-кратной массой воды, и 25 мкл суспензии пипеткой вносили в алюминиевые чашки. Чашки герметично закрывали. Температуры клейстеризации определяли путем нагревания чашки в дифференциальном сканирующем калориметре (DSC-1 STARe System, Mettler-Toledo) от 40 до 90°C при скорости нагревания 10°C/мин. В качестве эталона использовали пустую чашку.

Результаты:

Таблица 6

	GT (°C)
HENZ-16a	61.5 ± 0.1
Paustian	61.9 ± 0.1
HENZ-31	61.5 ± 0.2
Planet	61.0 ± 0.03

Существенного различия в температуре клейстеризации не наблюдалось.

Пример 5. Процесс соложения Flex-Malt

Зерно дикого типа Paustian или Planet и зерно растений ячменя, несущих мутацию в HvLDI, как описано в примере 1, подвергали ускоренному истиранию на воздухе в течение одной минуты с использованием изготовленного на заказ устройства для удаления около 3-4% шелухи перед замачиванием.

Зерно помещали в водный раствор в плексигласовый цилиндр и постоянно аэрировали атмосферным воздухом снизу столба зерна. Поток воздуха устанавливали с помощью массового расходомера и контроллера SmartTrak® 50 (Sierra, CA, USA), и температуру измеряли с помощью прецизионного термометра Testo 735 (Testo, Germany).

Зерно дикого и мутантного ячменя инкубировали в течение 24 ч в воде, содержащей 1 мкМ гибберелловой кислоты (GA_3 , G7645, Sigma-Aldrich), 0,01% Antifoam-204 (Sigma-Aldrich) и 0,01% H_2O_2 (Apoteket, Denmark).

Инкубацию проводили при 23°C, и зерно аэрировали атмосферным воздухом со скоростью 90 л/ч. После слива зерна аэрировали атмосферным воздухом со скоростью 90 л/ч в течение 24 часов.

Гибберелловая кислота (GA) представляет собой фитогормон, активирующий алейроновый слой прорастающего ячменя. Многие солодовщики добавляют GA в низкой концентрации в процессе соложения. В настоящем документе GA добавляли в воду для инкубации зерен в начале процесса. Раствор GA_3 готовили из гибберелловой кислоты (G7645, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) в абсолютном этаноле и добавляли к воде.

В течение всей инкубации через влажное зерно злаков со дна емкости пропускали воздух. В процессе flex-соложения зерно не сушили в печи, а измельчали и затирали без какой-либо стадии сушки.

Пример 6. Процесс соложения VLB

25 кг зерна ячменя от растений ячменя HENZ-16a и Paustian солодили на заводе VLB в Берлине. Замачивание проводили при 18°C и прорастивали в течение 5 дней при 14,5°C. Целевое содержание воды в зерне составляло 43% перед сушкой зерна в печи.

Пример 7. Способы определения активности гидролитических ферментов

Во время прорастания зерно ячменя начинает выделять ряд гидролитических ферментов, таких как альфа-амилазы, предельные декстриназы и (1,3;1,4)-бета-

глюканазы. Как правило, активности этих ферментов можно обнаружить своевременно скоординированным образом.

Подготовка образцов

Образцы пророщенного в течение 72 ч зерна от HENZ-16, HENZ-18, HENZ-31, Paustian и Planet получали путем проращивания 100 зерен в течение 72 часов на чашке Петри с двумя фильтровальными бумагами (Whatman, Grade 1, 85 мм, номер по каталогу 1001-085) и 4 мл воды Milli-Q во влажном боксе при 20°C. Солод EBC19, приготовленный в соответствии со стандартом Европейского пивоваренного конгресса EBC19, был включен в эксперимент в качестве контроля.

Образцы Flex-соложенного зерна от HENZ-16a, HENZ-31, Paustian и Planet получали в соответствии со способом, описанным в примере 5.

Образцы соложенного VLB зерна от HENZ-16a и Paustian получали в соответствии со способом, описанным в примере 6.

Все образцы пророщенного в течение 72 ч зерна и Flex-соложенного зерна замораживали и сушили путем выпаривания воды в сублимационной сушилке (ScanVac CoolSafe 4L, LaboGene) в течение 72 часов.

Перед анализом ферментативной активности все образцы измельчали с использованием стандартной мельницы Cyclotech (FOSS, Denmark) с получением муки. Все измерения активности ферментов в пророщенном зерне ячменя проводили в течение 48 ч после помола образца.

Активность альфа-амилазы

Активность альфа-амилазы определяли в соответствии с уменьшенной в масштабе версией метода Ceralpha от Megazyme, Ireland (K-CERA), начиная с 250 мг муки.

Результаты

Сопоставимая активность альфа-амилазы [Ед]/[г] была обнаружена в проросшем зерне, flex-соложенном зерне и соложенном VLB зерне от мутантов растений ячменя HvLDI и контрольных растений ячменя. См. фигуры 2A, 3A и 4A.

Активность бета-амилазы

Активность бета-амилазы определяли в соответствии с уменьшенной в масштабе версией метода Megazyme, Ireland (K-BETA3), начиная с 250 мг муки.

Результаты

Сопоставимая активность бета-амилазы [Ед]/[г] была обнаружена в проросшем зерне, соложенном зерне Flex-Malt и соложенном VLB зерне от мутантов растений ячменя HvLDI и контрольных растений ячменя. См. фигуры 2В, 3В и 4В.

Активность свободной и общей предельной декстриназы

Активность предельной декстриназы определяется в соответствии с уменьшенной в масштабе версией метода PullG6 от Megazyme (K-PullG6), начиная с 250 мг муки. Активность свободной предельной декстриназы измеряли после экстракции муки в 2,5 мл 0,1 М малеиновой кислоты при pH 4,7 в течение 1 ч при 40°C при регулярном перемешивании каждые 15 минут, при этом активность общей предельной декстриназы измеряли после экстракции муки в 2,5 мл 0,1 М малеиновой кислоты при pH 4,7, содержащей 25 мМ дитиотреитола, в течение 1 ч при 40°C при регулярном перемешивании каждые 15 мин. После экстракции образцы центрифугировали в течение 10 минут при 10000 об/мин в настольной центрифуге (центрифуга Heraeus Pico17, Thermo Scientific™) и надосадочную жидкость переносили в чашку для образцов на 500 мкл (Thermo Scientific™). Анализ выполняли с использованием специального анализа в анализаторе Gallery™ Plus Beermaster Discrete Analyzer (Thermo Scientific™). 24 мкл супернатанта инкубировали с 24 мкл субстрата PullG6 и позволяли реакции протекать в течение 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 240 мкл Trizma 2% и измеряли поглощение при 400 нм после вычитания фона в соответствии с методом PullG6 от Megazyme (K-PullG6, Megazyme, Ireland).

Результаты

Результаты для общей предельной декстриназы

Было обнаружено, что проросшее в течение 72 ч зерно и flex-соложеное зерно от мутантов растений ячменя HvLDI обладают сопоставимой активностью общей предельной декстриназы [мЕд]/[г] с контрольными растениями ячменя. См. фигуры 2С и 3С. Активность общей предельной декстриназы в соложенном VLB зерне была сопоставимой с активностью общей предельной декстриназы в соложенном зерне Pilsner. Из-за условий соложения, используемых для соложенного VLB зерна, уровни общей предельной декстриназы были ниже в зерне из соложенного VLB зерна по сравнению со стандартным солодом Pilsner. См. фигуру 4С.

Результаты для свободной и свободной/общей предельной декстриназы

Активность свободной предельной декстриназы, а также отношение свободной/общей предельной декстриназы были выше в прорастающем зерне от

мутантов ячменя HENZ-16a и HENZ-31 по сравнению с двумя контрольными растениями ячменя Paustian и Planet, а также HENZ-18 и EBC19 (фигура 2C).

Активность свободной предельной декстриназы, а также отношение свободной/общей предельной декстриназы были выше в flex-соложенном зерне от мутантов ячменя HENZ-16a и HENZ-31 по сравнению с двумя контрольными растениями ячменя Paustian и Planet (фигура 3C).

Активность свободной предельной декстриназы, а также отношение свободной/общей предельной декстриназы были выше в соложенном VLB зерне от мутанта ячменя HENZ-16a по сравнению с контрольным растением ячменя Paustian, а также солодом Pilsner (фигура 4C).

Результаты кинетических измерений

Кинетические измерения дополнительно проводили на flex-соложенном зерне.

Кинетику субстрата измеряли для свободной предельной декстриназы после экстракции flex-соложенной муки в 0,1 М малеиновой кислоте, pH 4,7, в течение 1 ч при 40°C, и для общей предельной декстриназы после экстракции муки в 0,1 М малеиновой кислоте, pH 4,7, содержащей 25 мМ дитиотреитола, в течение 1 ч при 40°C. Экстракции проводили по методу PullG6 от Megazyme.

50 мкл экстракта инкубировали в аналитических пробирках с 50 мкл субстрата PullG6 в конечной концентрации 0-3 мМ в течение 30 мин при 40°C. Затем реакцию останавливали с помощью 750 мкл Trizma 2% и измеряли поглощение при 400 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific™) после вычитания фона в соответствии с методом PullG6 от Megazyme. (K-PullG6, Megazyme, Ireland). Данные подгоняли с помощью функции Михаэлиса-Ментен с использованием общедоступного веб-сайта ic50.tk, а K_m определяли как концентрацию субстрата, когда реакция достигала половины V_{max} .

Таблица 7

	Активность свободной HvLD		Активность общей HvLD	
	K_m (mM)	V_{max}	K_m (mM)	V_{max}
HENZ-16	0.95 ± 0.12	46.9 ± 2.4	0.12 ± 0.04	69.3 ± 4.1
Paustian	7.48 ± 3.83	52.2 ± 20.9	0.11 ± 0.04	65.5 ± 3.7
HENZ-31	1.06 ± 0.12	58.9 ± 2.9	0.11 ± 0.03	74.6 ± 3.5
Planet	$5.98 \pm 0.2.42$	60.8 ± 18.4	0.14 ± 0.04	69.7 ± 3.4

Значение K_m для свободной HvLD было ниже для HENZ-16a и HENZ-31 по сравнению с двумя контрольными растениями ячменя, Planet и Paustian, см. таблицу 7.

Аналогичное значение K_m для общей HvLDI наблюдалось для HENZ-16a, HENZ-31, Planet и Paustian (таблица 7).

Активность свободной предельной декстриназы была выше у HENZ-16a по сравнению с Paustian. См. также фигуру 5.

Пример 8: Затираание и анализ на сахар в сусле

Солод VLB и сухой flex-солод измельчали в порошок с использованием стандартной мельницы Cyclotech (FOSS, Дания). Солод EBC19, приготовленный в соответствии со стандартом Европейского пивоваренного конгресса EBC19, был включен в эксперимент в качестве контроля.

Затираание сухого flex-солода

70 г сухого вещества смешивали в соотношении 5:1 вода:крупка и затирали в машине для затираания Lochner согласно следующей программе затираания: 10 минут при 52°C, 50 минут при 65°C и 5 минут при 78°C, с интервалом изменения температуры 1 градус/мин. Этот процесс также можно назвать «затираанием».

Затираание солода VLB

15 г сухого вещества смешивали в соотношении 4:1 вода:крупка и затирали на роботизированном затирочном оборудовании (Zinsser Analytics, Германия) согласно следующей программе затираания: 15 минут при 52°C, 45 мин при 65°C, 15 минут при 72°C и 5 минут при 78°C, при этом изменение температуры происходит линейно со скоростью 1 градус/мин. Этот процесс также можно назвать «затираанием».

В сусле определяли уровни сбраживаемых сахаров, таких как фруктоза, сахароза, глюкоза, мальтоза и мальтотриоза, а также других сахаров. Анализ проводили на фильтрованном сусле, нейтрализованном в 0,1 М растворе NaOH. Растворимые сахара определяли с помощью высокоэффективной анионообменной хроматографии в сочетании с импульсным электрохимическим детектированием (HPLC-PAD).

Анализ сахара в сусле, приготовленном из сухого flex-солода

Результаты представлены на фигуре 6. Результаты на рисунке 6А показывают, что сусло, приготовленное из зерна мутанта ячменя HENZ-16a, содержит на 8,2% больше сбраживаемых сахаров по сравнению с суслом, приготовленным из зерна сорта Paustian.

Более конкретно, уровни глюкозы, фруктозы, изомальтозы, изомальтотриозы, мальтозы, панозы, мальтотриозы, мальтотетраозы, мальтопентаозы, мальтогексаозы, мальтогептаозы и мальтоактаозы в сусле, приготовленном из HENZ-16a, выше по сравнению с уровнями этих сахаров в сусле, приготовленном из Paustian. (фигура 6B).

Анализ сахара в сусле, приготовленном из сухого солода VLB

Результаты представлены на фигуре 7. Результаты на фигуре 7A показывают, что сусло, приготовленное из зерна мутанта ячменя HENZ-16a, содержит на 7,2% больше сбраживаемых сахаров по сравнению с суслом, приготовленным из зерна сорта Paustian (фигура 7A).

Более конкретно, уровни глюкозы, фруктозы, изомальтозы, изомальтотриозы, мальтозы, панозы, мальтотриозы, мальтотетраозы, мальтогептаозы и мальтоактаозы в сусле, приготовленном из HENZ-16a, выше по сравнению с уровнями этих сахаров в сусле, приготовленном из Paustian (фигура 7B).

Пример 9. Анализ распределения амилопектина по длине цепи/степень полимеризации

Дания, сезон 2017

Растения ячменя HENZ-16a, HENZ-18 и HENZ-31, Planet и Paustian выращивали на соседних участках в Дании в сезоне 2017 года.

Новая Зеландия, сезон 2017/2018

Растения ячменя HENZ-16a, HENZ-18 и HENZ-31, Planet и Paustian выращивали на соседних участках в Новой Зеландии в сезоне 2017/18. Собранное зерно анализировали, как описано ниже.

Крахмал выделяли из муки (2 мг) в соответствии с Shaik et al. (2014). Крахмал разветвляли с помощью изоамилазы *Pseudomonas speargoides* и пуллулаказы *Bacillus licheniformis* (Megazyme, Ireland) и анализировали в хроматографической системе ICS-3000 (Dionex) с использованием аналитических колонок CarboPac PA100 в соответствии с Blennow et al. (1998).

Результаты, касающиеся степени полимеризации и распределения по длине цепи показаны на фигурах 8 и 9.

Профиль распределения амилопектина по длине цепи у мутантов (HENZ-8, HENZ-9, HENZ-16, HENZ-18 и HENZ-31) был по существу идентичен двум

контрольным растениям ячменя: Planet и Paustian. Незначительные различия в длине цепи являются результатом стандартных технических отклонений.

Пример 10. Анализ урожайности и зерна

Урожайность

Растения ячменя выращивали в Дании в 2018 г. (2 повтора) и Новой Зеландии в 2017/2018 гг. (3-8 повторов), и измеряли урожайность растений ячменя. Результаты эксперимента представлены в обобщенном виде в таблице 8.

Таблица 8

	<u>Урожайность</u>	
	Участки в Дании, 2017 г. (2 повтора)	Участки в Новой Зеландии, 2017/2018 гг. (3-8 повторов)
HENZ-16a	5,30	1,64
HENZ-18	N/A	1,71
Paustian	5,28	1,79
HENZ-31	5,26	1,71
Planet	5,31	2,03

Существенного различия между мутантными растениями ячменя и контролями не наблюдалось. Массу зерна анализировали у растений ячменя, выращенных в Новой Зеландии в 2017/2018 гг. Результаты эксперимента представлены в обобщенном виде в таблице 9.

Таблица 9

	<u>Новая Зеландия, 2017/2018 (10 технических повторов)</u>			
	Масса 1000 зерна (г)	Средняя масса зерна (мг)	Диаметр зерна	Отношение диаметр/длина
HENZ-16a	56,46	56,46	1,52	2,18
HENZ-18	57,51	57,51	1,53	2,15
Paustian	55,11	55,11	1,48	2,11
HENZ-31	62,20	62,20	1,59	2,30
Planet	62,64	62,64	1,58	2,30

Содержание белка, воды и крахмала

Содержание белка, воды и крахмала в зерне измеряли с помощью прибора FOSS Infratec™ NOVA в соответствии с инструкциями производителя, применяя калибровку для этих компонентов, предоставленную поставщиком прибора. Результаты показаны в таблице 10 ниже.

Таблица 10

Новая Зеландия, 2017/2018 гг.

	Белок, %	Вода, %	Крахмал, %
HENZ-16	$11,9 \pm 0,1$	$11,2 \pm 0,0$	$62,3 \pm 0,2$
HENZ-18	$13,3 \pm 0,0$	$11,3 \pm 0,0$	$60,0 \pm 0,2$
Paustian	$11,4 \pm 0,1$	$11,1 \pm 0,1$	$62,8 \pm 0,1$
HENZ-31	$10,8 \pm 0,1$	$11,4 \pm 0,1$	$63,4 \pm 0,1$
Planet	$11,5 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,1$	$62,9 \pm 0,2$

Результаты показывают, что нет существенного различия в содержании белка, воды и крахмала между HENZ-16, HENZ-18, Paustian, HENZ-31 и Planet.

Формула изобретения

1. Растение ячменя или его часть, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене *HvLDI*, где указанный мутированный ген *HvLDI* кодирует мутантный полипептид HvLDI, где мутация представляет собой одну из следующих мутаций:

а. миссенс-мутация, приводящая к замене пролина на другую аминокислоту в одном или нескольких петлевых участках мутантного полипептида HvLDI, где петлевые участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 25-44, и аминокислот, соответствующих положениям 56-62, и аминокислоты, соответствующие положениям 77-78, и аминокислот, соответствующих положениям 91-111, и аминокислот, соответствующие положениям 124-147 в SEQ ID NO:1; или

б. миссенс-мутация, приводящая к замене отрицательно заряженной аминокислоты на неотрицательно заряженную аминокислоту в одном или нескольких альфа-спиральных участках мутантного полипептида HvLDI, где альфа-спиральные участки выбраны из группы, состоящей из аминокислот, соответствующих положениям 45-55, и аминокислот, соответствующих положениям 63-76, и аминокислот, соответствующих положениям 79-90, и аминокислот, соответствующих положениям 112-123 в SEQ ID NO:1.

2. Растение ячменя или его часть по п. 1, где указанный мутантный полипептид HvLDI является идентичным зрелому полипептиду wt HvLDI или его природным вариантам, за исключением мутации в указанном положении(ях).

3. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где мутантный полипептид HvLDI содержит или состоит из аминокислотной последовательности от положения 25 до 142 в SEQ ID NO: 3 или от положения 25 до 147 в SEQ ID NO: 3, или состоит из аминокислотной последовательности от положения 25 до 142 в SEQ ID NO: 4 или от положения 25 до 147 в SEQ ID NO: 4.

4. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где мутантный полипептид HvLDI содержит или состоит из аминокислотной последовательности от положения 25 до 142 в SEQ ID NO: 6 или от положения 25 до 147 в SEQ ID NO: 6.

5. Растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов, где зерна или проросшие зерна, или солод из указанного растения ячменя имеют активность свободной HvLD, которая по меньшей мере на 20% выше по сравнению с активностью свободной HvLD, измеренной в зернах растения ячменя, несущего ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt HvLDI, но в остальном того же генотипа, при культивировании и получении в тех же условиях.

6. Растение ячменя или его часть, где указанное растение ячменя несет одну или несколько мутаций в гене *HvLDI*, выбранных из группы, состоящей из:

- i. мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 966 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2); и
- ii. мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 967 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2); и
- iii. мутации нуклеотида С на Т в положении, соответствующем нуклеотиду 968 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2); и
- iv. мутации G на A в положении, соответствующем нуклеотиду 990 кодирующей последовательности гена *HvLDI* (SEQ ID NO:2).

7. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где зерно указанного растения ячменя имеет массу тысячи зерен по меньшей мере 45 грамм, например, по меньшей мере 50 грамм, например, по меньшей мере 55 грамм.

8. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где зерно указанного растения ячменя имеет содержание крахмала по меньшей мере 50%, такое как по меньшей мере 55%, такое как по меньшей мере 60%.

9. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где растение ячменя дополнительно содержит мутацию в одном или нескольких дополнительных генах, выбранную из группы, состоящей из:

- a. мутации в гене, кодирующем LOX-1, приводящей к полной потере функциональной LOX-1;
- b. мутации в гене, кодирующем LOX-2, приводящей к полной потере функциональной LOX-2;

- с. мутации в гене, кодирующем MMT, приводящей к полной потере функциональной MMT;
- d. мутации в гене, кодирующем CslF6, где указанный мутантный ген кодирует мутантный белок CslF6 со сниженной активностью CslF6;
- e. мутации в гене, кодирующем ген HRT, приводящей к потере функции HRT;
- f. мутации в гене, кодирующем ген HBL12, приводящей к потере функции HBL;
- g. мутации в гене, кодирующем ген WRKY38, приводящей к потере функции WRKY38; и
- h. мутации *ant*, например, мутации в гене *Hvmyb10*.

10. Растительный продукт, содержащий растение ячменя или его часть по любому из предшествующих пунктов.

11. Растительный продукт по п. 10, где растительный продукт выбран из группы, состоящей из:

- a. солода, приготовленного из зерна указанного растения ячменя;
- b. водного экстракта, например, сусла, приготовленного из зерна указанного растения ячменя и/или из солода, содержащего переработанное зерно(а) указанного растения ячменя; и
- с. напитка, например, пива, приготовленного из указанного растения ячменя или его частей.

12. Способ приготовления солода, включающий следующие стадии:

- a. обеспечение зерна растения ячменя по любому из пп. 1-9;
- b. замачивание и проращивание указанного зерна в предварительно определенных условиях;
- с. необязательно сушку указанного проросшего зерна.

13. Способ по п. 12, в котором замачивание и проращивание включают следующие стадии:

- a. инкубацию зерна растения ячменя по любому из пп. 1-9 в водном растворе в течение периода, составляющего 5-10 ч, в условиях аэрации;

b. слив водного раствора и воздушную выдержку зерна в течение 8-16 ч, предпочтительно в условиях аэрации;

c. инкубацию зерна в водном растворе в течение 2-10 ч в условиях аэрации;
и

d. слив водного раствора и подвергание зерна второй фазе воздушной выдержки в течение 8-20 ч, предпочтительно в условиях аэрации, при поддержании температуры в диапазоне 20-28°C,

при этом содержание воды в зерне составляет по меньшей мере 20% в любой момент времени после стадии a.

14. Способ по п. 12 или 13, в котором указанное замачивание и проращивание проводят в течение от 48 до 72 часов, и стадию с по п. 12 опускают.

15. Способ приготовления водного экстракта, включающий следующие стадии:

a. обеспечение зерна ячменного растения по любому из пп. 1-9 и/или солода, полученного по пп. 12-14;

b. приготовление водного экстракта указанного зерна и/или указанного солода, например, сусла.

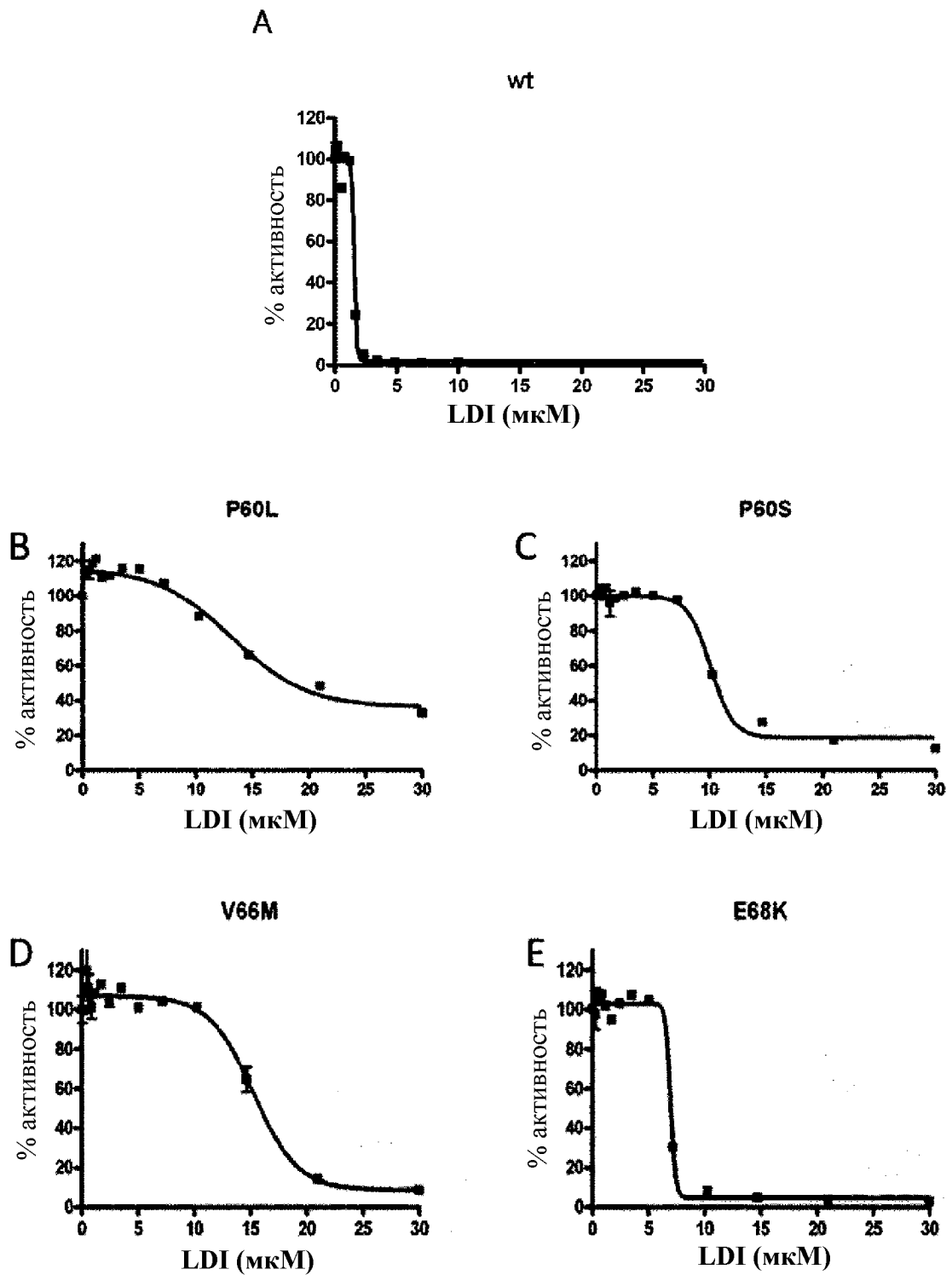
16. Способ по п. 15, в котором указанный водный экстракт содержит по меньшей мере на 10% больше глюкозы, фруктозы и/или мальтотриозы по сравнению с водным экстрактом растений ячменя, несущих ген *HvLDI*, кодирующий полипептид wt *HvLDI*, но в остальном того же генотипа, при приготовлении в тех же условиях.

17. Способ изготовления напитка, включающий следующие стадии:

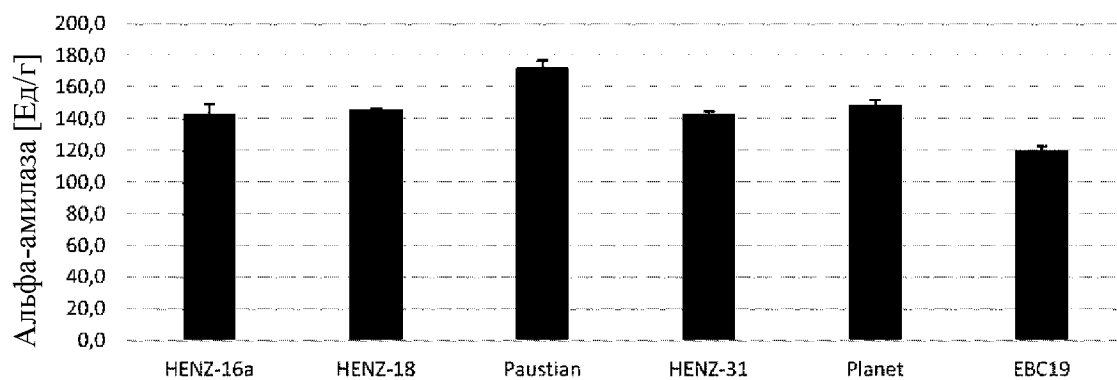
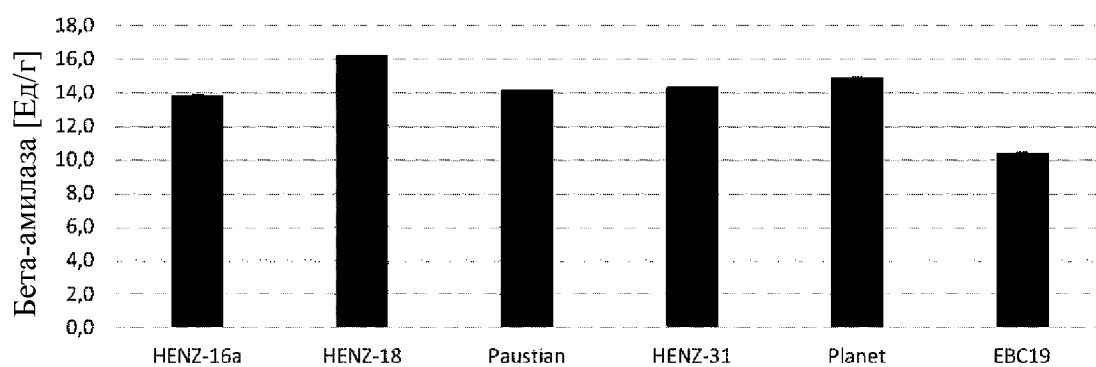
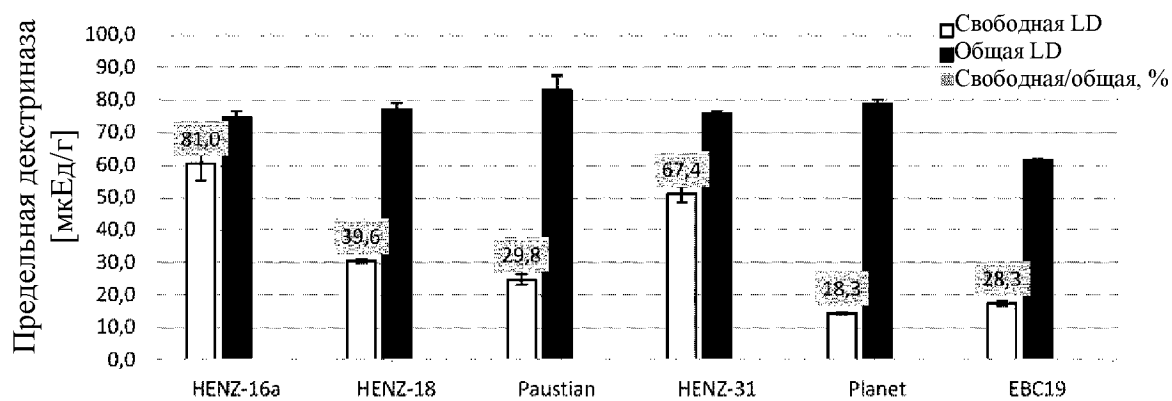
a. обеспечение зерна растения ячменя по любому из пп. 1-9 и/или солода, полученного по пп. 12-14, и/или водного экстракта, полученного в соответствии со способом по пп. 15 или 16;

b. переработку указанного водного экстракта в напиток.

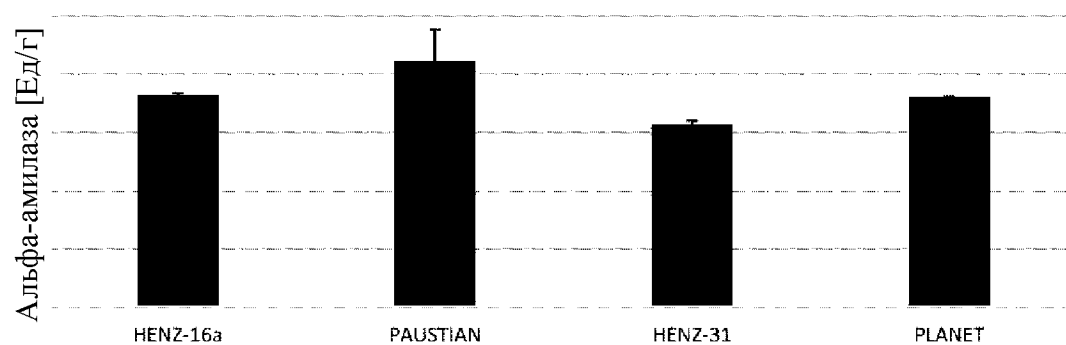
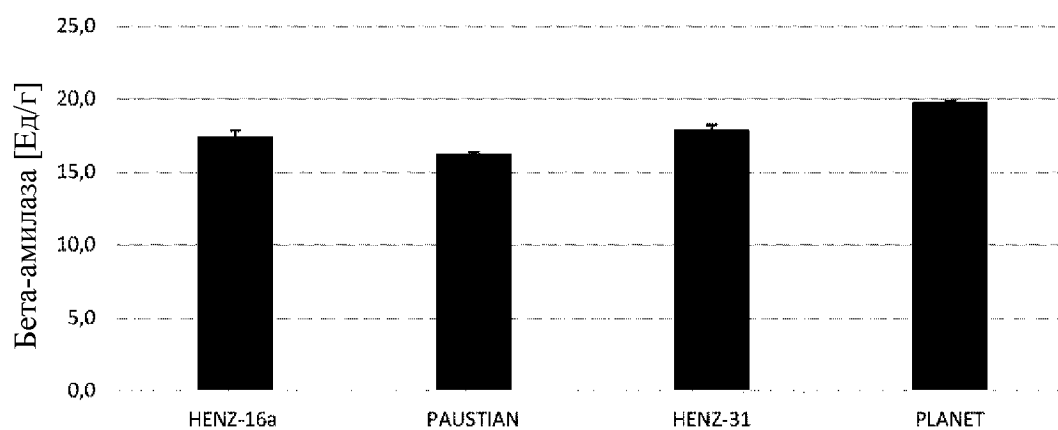
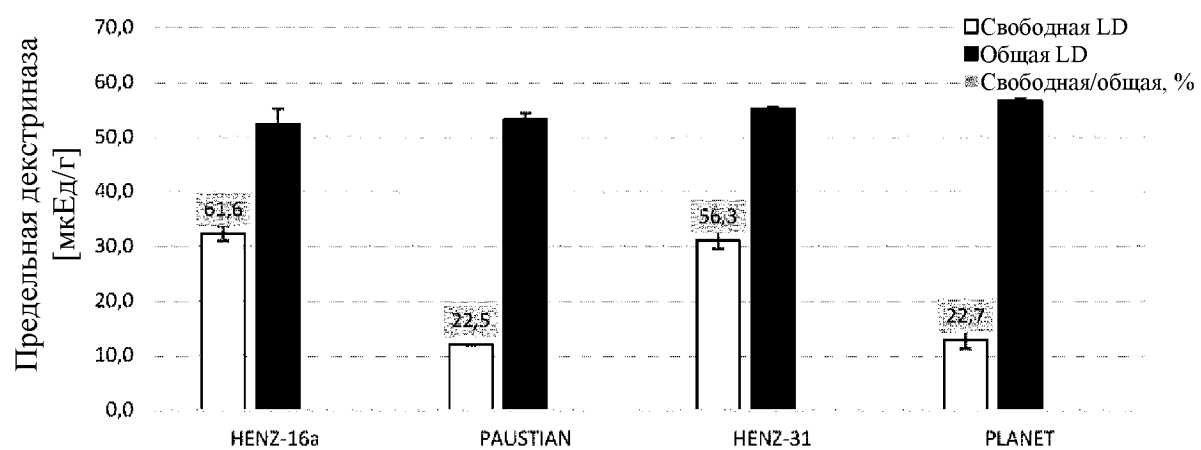
Фиг. 1



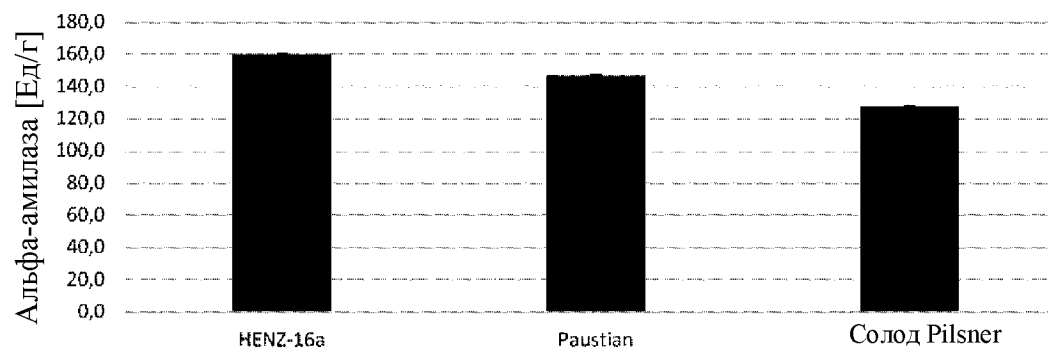
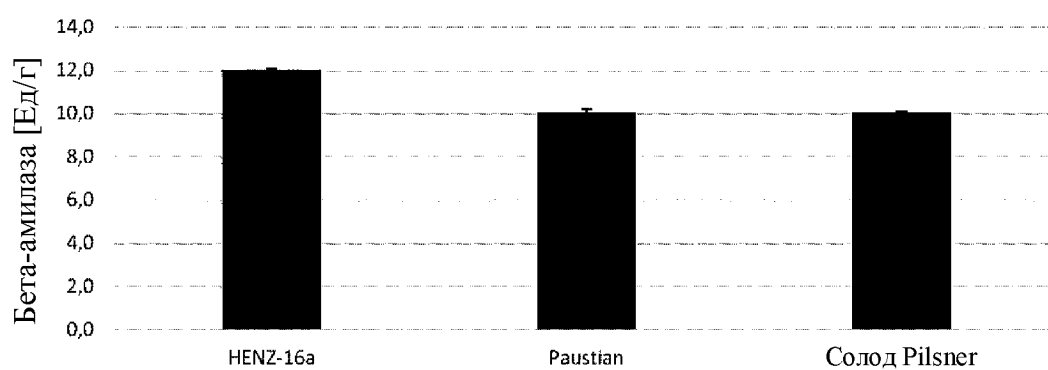
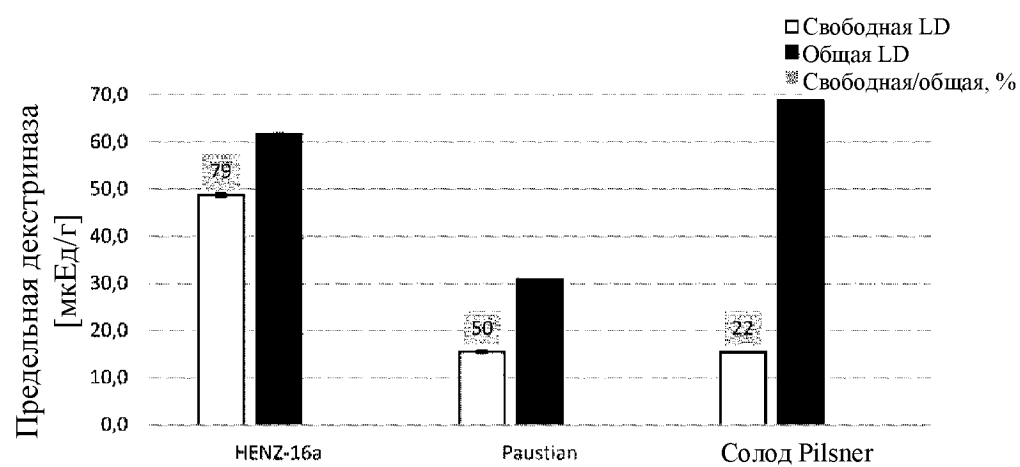
Фиг. 2

А**В****С**

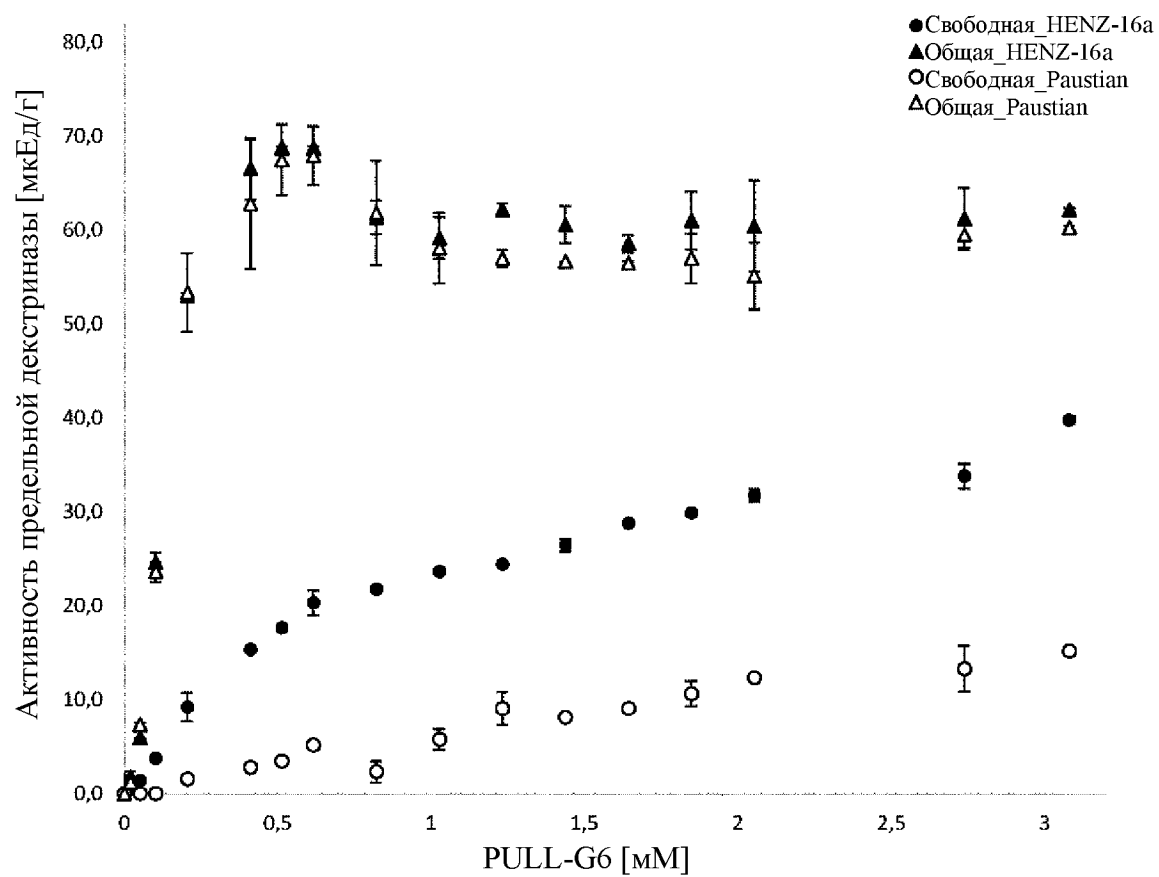
Фиг. 3

A**B****C**

Фиг. 4

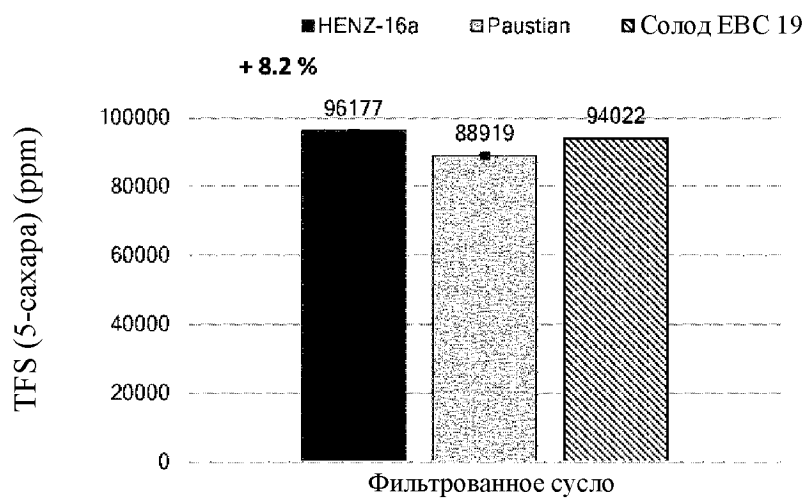
А**В****С**

Фиг. 5

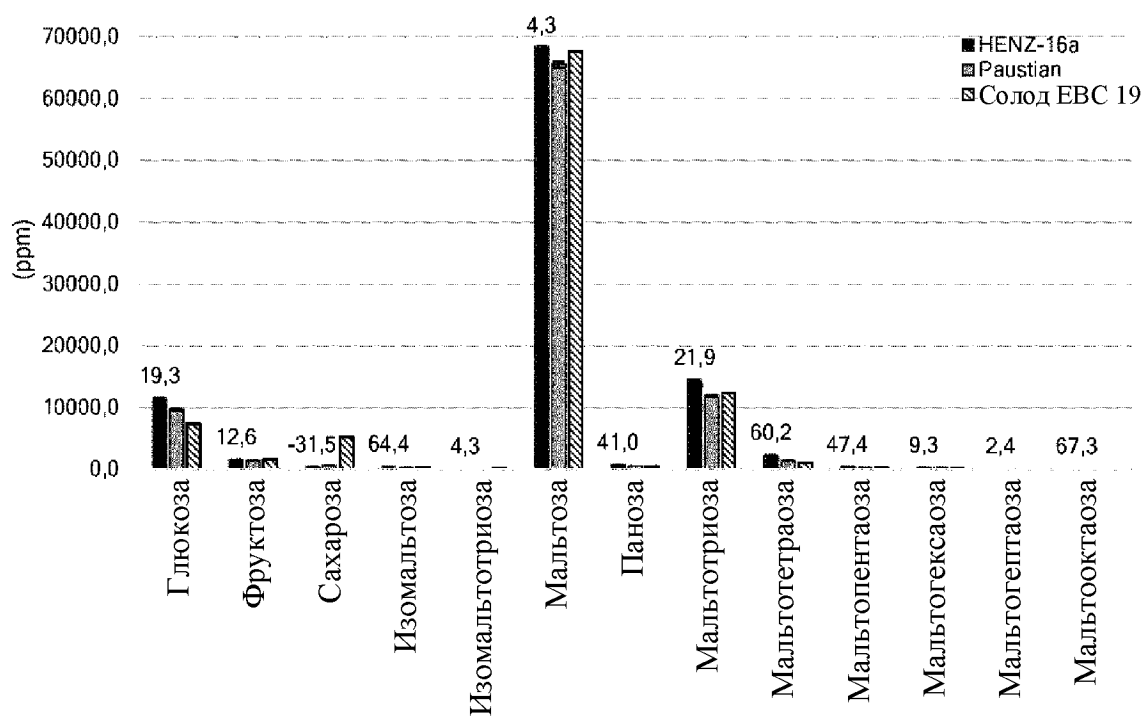


Фиг. 6

А

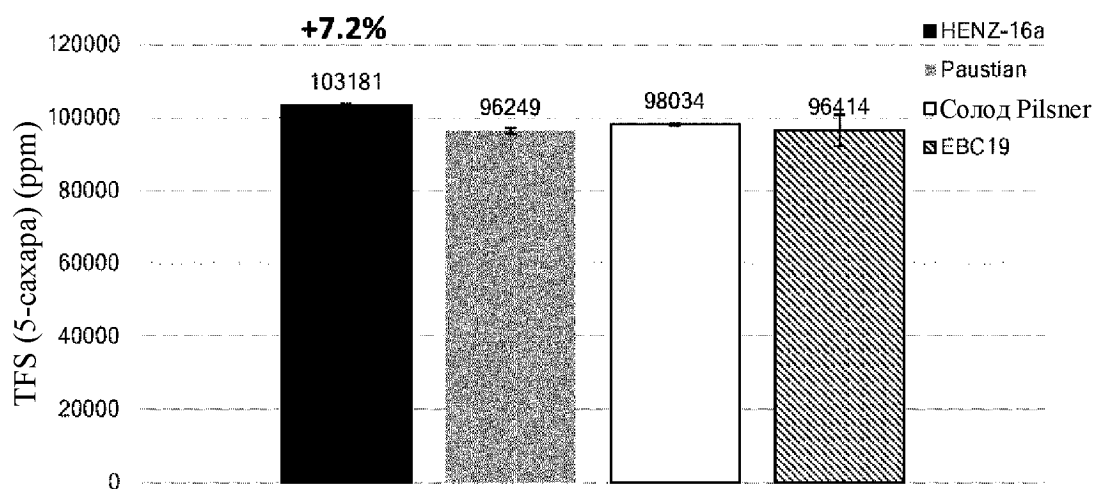


В

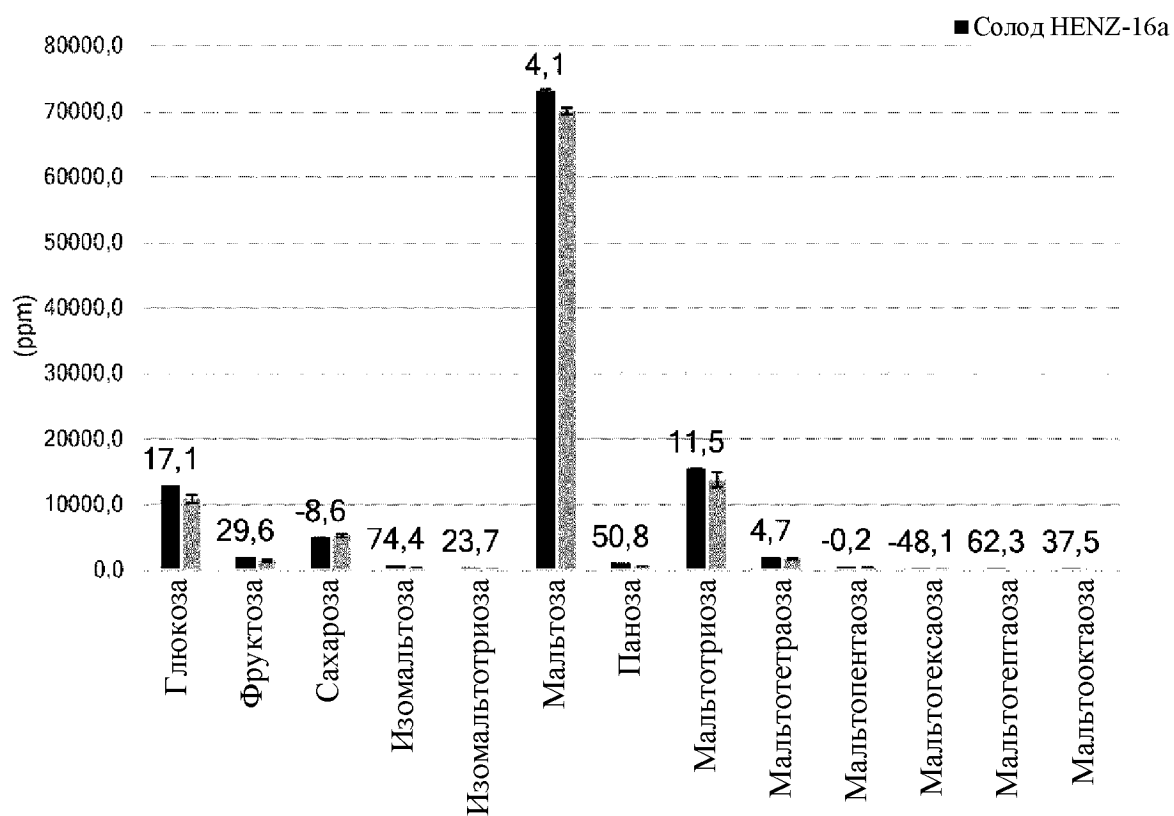


Фиг. 7

А



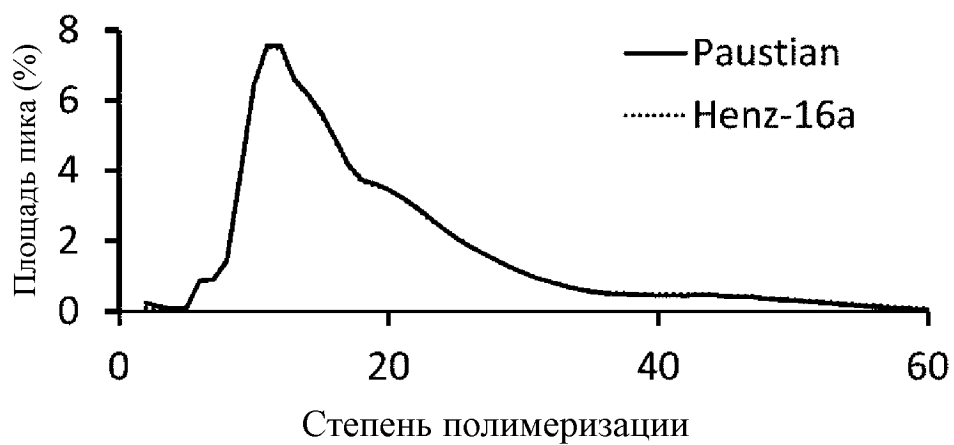
В



Фиг. 8

А

Распределение по длине цепи, Дания 2017 г.



В

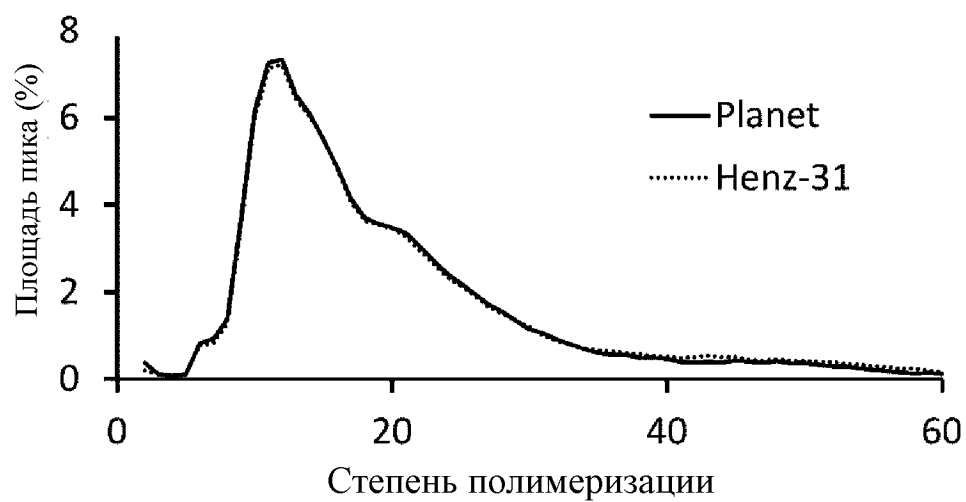
Различие в площади пика с контролем, Дания 2017 г.



Фиг. 8

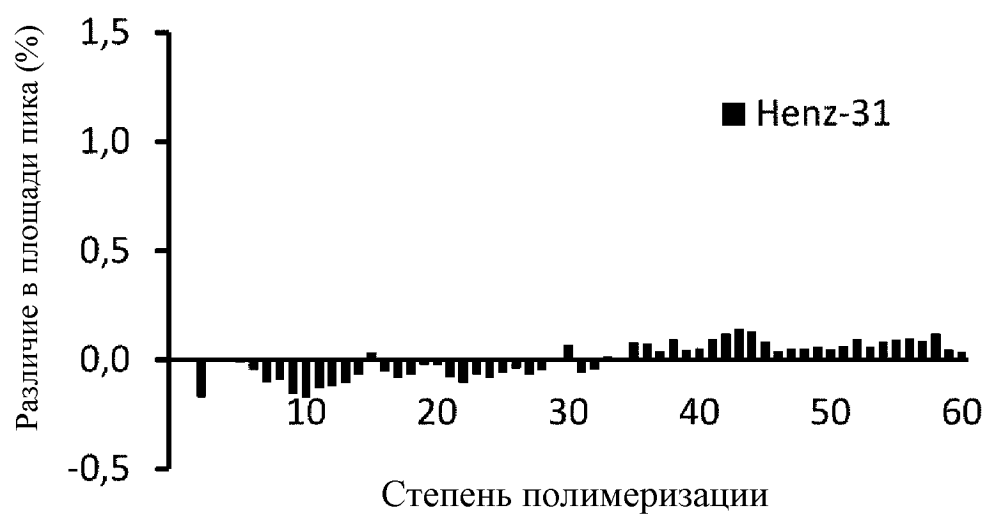
C

Распределение по длине цепи, Дания 2017 г.



D

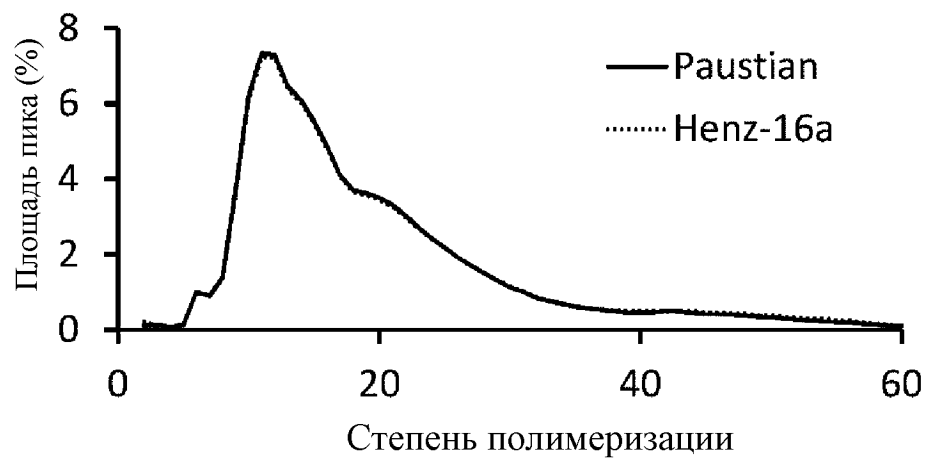
Различие в площади пика с контролем, Дания 2017 г.



Фиг. 9

А

Распределение по длине цепи, Новая Зеландия



В

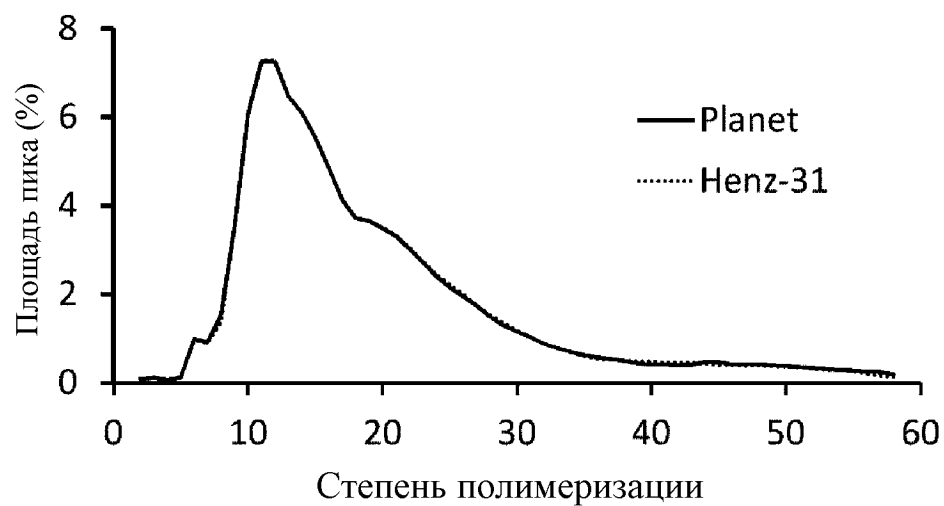
Различие в площади пика с контролем, Новая Зеландия



Фиг. 9

C

Распределение по длине цепи, Новая Зеландия



D

Различие в площади пика с контролем, Новая Зеландия

