

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045156**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.10.31

(21) Номер заявки

202091565

(22) Дата подачи заявки

2018.12.21(51) Int. Cl. **A01H 5/10** (2018.01)**C07K 14/415** (2006.01)**C12N 9/10** (2006.01)**C12N 15/82** (2006.01)**(54) ЗЕРНОВЫЕ РАСТЕНИЯ С УЛУЧШЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ**(31) **17210954.8**(32) **2017.12.28**(33) **EP**(43) **2021.01.20**(86) **PCT/EP2018/086719**(87) **WO 2019/129736 2019.07.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

КАРЛСБЕРГ А/С (DK)

(72) Изобретатель:

**Кнудсен Сорен (DK), Бодевин
Сабрина (SE), Олсен Оле, Томсен
Ханне, Вендт Тони, Хархольт
Джеспер, Лок Финн (DK)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Глухарёва А.О.,
Угрюмов В.М. (RU)**

(56) RACHEL A. BURTON et al.: "Over-expression of specific HvCslF cellulose synthase-like genes in transgenic barley increases the levels of cell wall (1,3;1,4)-[beta]-d-glucans and alters their fine structure: Over-expression of CslF genes in barley", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 9, № 2, 1 February 2011 (2011-02-01), pages 117-135, XP055468562, GB, ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2010.00532.x, page 125, column 2

GEORGE DIMITROFF et al.: "(1,3;1,4)-[beta]-Glucan Biosynthesis by the CSLF6 Enzyme: Position and Flexibility of Catalytic Residues Influence Product Fine Structure", BIOCHEMISTRY, vol. 55, № 13, 5 April 2016 (2016-04-05), pages 2054-2061, XP055467034, US, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01384, figure 2

GONGSHE HU et al.: "A mutation of the cellulose-synthase-like gene in barley partially affects the [beta]-glucan content in grains", Journal of Cereal Science, vol. 59, 1 March 2014 (2014-03-01), page 189, XP055468801, DOI: 10.1016/j.jcs.2013.12.009, retrieved from the Internet: URL: https://ac.els-cdn.com/S0733521014000095/1-s2.0-S0733521014000095-main.pdf?_tid=66ffcf3-cfa8-4357-b5e5-a341b78cd08&acdnat=1524141483_25eda753bd393d345ca0e92c55d9e3fe [retrieved on 2018-04-19], abstract EP-A1-2402440

SHIN TAKETA et al.: "Functional characterization of barley betaglucanless mutants demonstrates a unique role for CslF6 in (1,3;1,4)-[beta]-D-glucan biosynthesis", JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 63, № 1, 21 September 2011 (2011-09-21), pages 381-392, XP055468689, GB, ISSN: 0022-0957, DOI: 10.1093/jxb/err285, figure 6

DATABASE UniProt [Online], 17 February 2016 (2016-02-17), "SubName: Full=CslF6 {ECO:0000313|EMBL:AKJ66176.1}";", XP002780250, retrieved from EBI accession № UNIPROT:A0A0R6UQB6, database accession № A0A0R6UQB6, sequence

(57) Изобретение относится к растению ячменя или его части, где ядро указанного растения ячменя имеет пониженное содержание (1,3;1,4)-β-глюканов. Растение ячменя может нести мутацию в гене CslF6, где указанный мутированный ген CslF6 кодирует мутантный полипептид CslF6.

B1**045156****045156 B1**

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к растениям ячменя, имеющим улучшенные свойства клеточной стенки. В частности, изобретение относится к растениям ячменя, обладающим свойствами клеточной стенки, пригодными для производства напитков на основе ячменя, например пива. Кроме того, изобретение дополнительно относится к способам производства напитков на основе ячменя, а также к продуктам, полученным из растений ячменя по изобретению.

Уровень техники

В коммерческих процессах солодования зерна ячменя проращивают или солодуют, в контролируемых условиях, которые позволяют частично мобилизовать запасы крахмала и белка крахмального эндосперма в течение от 4 до 6 дней. Процесс солодования обычно инициируется погружением сухого зерна ячменя в воду. Данный процесс известен как замачивание, где целью является не только очистка зерна, но и повышение его влажности до от около 40 до 45% мас./мас., с тем чтобы последующая стадия мобилизации эндосперма происходила быстрее. Во время замачивания воду один раз сливают, чтобы обеспечить повторную аэрацию зерна. Данная стадия известна как "воздушная пауза" и считается необходимой, в первую очередь, потому что погруженное в воду зерно ощущает недостаток кислорода через оболочку 16 ч. После "воздушной паузы" длительностью около 8 ч зерно снова погружают в воду, чтобы завершить обработку замачиванием в течение еще 8-часового периода или серии повторных замачиваний. Двухступенчатый процесс замачивания для увеличения содержания влаги в сухом зерне до 40% или выше занимает в целом около 32 ч.

Замоченное зерно рассыпают для прорастания, во время которого ферменты, секретируемые из алейроновых и скутеллярных эпителиальных клеток, вместе с некоторыми ферментами, которые уже присутствуют в крахмалистых клетках эндосперма, разлагают клеточные стенки, крахмал и белок. Солодовник обычно имеет целью индукцию высоких уровней ферментов, которые разлагают полисахариды клеточной стенки в зерне ячменя, в частности, (1,3;1,4)- β -глюканы и арабиноксиланы. Не полностью разложившиеся (1,3;1,4)- β -глюканы могут быть особенно неприятными для пивоваров, поскольку они могут быть экстрагированы из солода в растворимых формах, которые образуют высоковязкие водные растворы, которые замедляют процессы фильтрации на пивоваренном заводе и способствуют нежелательному помутнению в готовом пиве. Кроме того, было показано, что пивоварение при высоком содержании (1,3;1,4)- β -глюканов отрицательно влияет на уровень солодового экстракта. Таким образом, низкие уровни растворимых (1,3;1,4)- β -глюканов представляют собой важный параметр качества солодования, по причине чего высокие уровни (1,3;1,4)- β -глюканазных ферментов остаются важными показателями качества солода. Кроме того, солодовник стремится быстро стимулировать синтез в зернах как можно большего количества ферментов, разрушающих крахмал. Разлагающие крахмал ферменты - которые включают α - и β -амилазы, ферменты, расщепляющие молекулы крахмала в местах разветвления (например, предельная декстриназа), и α -глюкозидазы - частично деполимеризуют запасы крахмала зерна до моносахаридов, олигосахаридов и глюкозы. Продукты деполимеризации крахмала впоследствии используются дрожжевыми клетками в качестве источника углерода и сбраживаются в пивной спирт.

Как отмечено выше, процесс проращивания обычно занимает около 5 дней. После контролируемых стадий проращивания влажный солод сушат, при этом содержание влаги уменьшается от около 40% до от 4 до 5%. Данный процесс сушки, называемый печной сушкой, является очень энергоемким и представляет собой большую часть производственных расходов. Весь процесс, включая печную сушку, обычно занимает от 6 до 7 дней.

На пивоваренном заводе высушенный в печи солод измельчают, чтобы разбить зерно, и полученное содержимое экстрагируют горячей водой в процессе, известном как затирание. Извлеченный материал включает частично расщепившиеся молекулы крахмала, белка и клеточной стенки, как описано выше, и они дополнительно расщепляются эндогенными ферментами зерна, которые были извлечены из солода. На данной стадии некоторые пивовары добавляют дополнительные и, как правило, более дешевые источники углерода (добавки), чтобы поддержать последующий процесс брожения дрожжей и снизить затраты на солод. Указанные добавки могут представлять собой ячменную, рисовую, пшеничную или другую зерновую муку из непроросшего зерна, но их добавление может потребовать сопутствующего добавления гидролитических ферментов, поскольку в солоде недостаточно эндогенных ферментов, чтобы расщеплять компоненты добавки. Добавленные ферменты обычно получают из неочищенных и относительно дешевых экстрактов грибковых и/или бактериальных культур. Добавление экзогенных ферментов не разрешено в некоторых странах, особенно, когда пиво должно производиться в строго регулируемых условиях.

Дальнейшая деградация крахмала и других компонентов эндосперма, экстрагированных в горячей воде, происходит в процессе, известном как осахаривание. После затирания экстракты отфильтровывают, часто в фильтрационном чане, и охлаждают. Экстракт может кипятиться в присутствии хмеля или экстрактов хмеля, с добавлением после его охлаждения дрожжевых культур для сбраживания высвобождаемых Сахаров в спирт. Производимое таким образом пиво обычно созревает и фильтруется перед розливом в бутылки. Пиво также может быть газировано углекислотой перед розливом в бутылки.

Ячмень является самой популярной зерновой культурой, используемой для производства пива. Именно большое количество крахмала, содержащегося в его ядрах, сделало ячмень очень привлекательным сырьем для пивоваренной промышленности. Для обеспечения полного использования потенциала зерна ячменя в пивоварении крайне важно обеспечивать оптимальную деградацию структур клеточной стенки, охватывающих гранулы крахмала. В упрощенном представлении его архитектуры ядро ячменя, в основном, состоит из крахмалистого эндосперма, окруженного алейроновым слоем. Клеточные стенки алейрона и эндосперма ядра ячменя, в основном, состоят из некрахмальных полисахаридов (non-starch polysaccharides (NSP)). Крахмалистый эндосперм состоит на 75% из (1-3,1-4)-β-глюканов (BGL) и на 20% из арабиноксилана (arabinoxylan (AX)), в то время как алейрон состоит на 71% из AX и на 26% из BGL. BGL ячменя представляют собой неразветвленные, длинные линейные цепи остатков глюкозы, связанные как β-(1-3), так и β-(1-4)-связями. AX ячменя состоит из молекулярного остова D-ксиланопираниозила, связанного β-(1-4) связями, случайным образом соединенными с L-арабинофуранозой α-(1-2) и α-(1-3) связями.

Сущность изобретения

Как указано выше, одной из стадий производства пива, требующей больших затрат времени и энергии, является солодование. Ограничивающей скоростью стадией в процедуре солодования является снижение содержания (1,3;1,4)-β-глюканов в прорастающих ядрах ячменя до приемлемо низких уровней. Соответственно существует необходимость в предоставлении материалов и способов, которые могут сократить время, необходимое для солодования. В частности, существует потребность в растениях ячменя с низким уровнем (1,3;1,4)-β-глюканов. Тем не менее растения ячменя, у которых (1,3;1,4)-β-глюканы полностью отсутствуют, характеризуются пониженным высотой, мощностью и урожайности (до приблизительно 70% от контроля) (Taketa et al., 2012). Фактически Taketa et al. приходит к выводу, что "поскольку агрономические характеристики снижаются, полезность мутантов bgl для солодования может быть не очень большой...". Hu et al. (2014) описывает мутант ячменя m351, содержащий очень низкие уровни β-глюканов со смешанной связью (1-3,1-4) (<1,6%). Однако, мутант m351 характеризовался пониженной твердостью зерна, о чем свидетельствует более чем четырехкратное увеличение разрушаемости зерна по сравнению с родительским растением, и чувствительность к солям, что приводило к более слабому прорастанию в условиях 400 мМ соли.

Соответственно существует потребность в растениях ячменя с низким уровнем (1,3;1,4)-β-глюканов, которые в то же время имеют хорошие агрономические характеристики и твердость зерна.

(1,3;1,4)-β-глюканы ячменя содержат целлотриозильные (DP3) и целлотетраозильные (DP4) остатки в соотношениях, которые обычно находятся в диапазоне от 2,5 до 4. Соотношение DP3/DP4 оказывает влияние на свойства (1,3;1,4)-β-глюканов.

В одном варианте осуществления изобретение относится к растениям ячменя, имеющим низкий уровень (1,3;1,4)-β-глюканов с соотношением DP3/DP4, сравнимым с соотношением DP3/DP4 ячменя дикого типа. Такие растения ячменя могут иметь агрономическое значение и иметь зерна ячменя с пониженной склонностью к поломке. Одной из технических проблем, решаемых с помощью настоящего изобретения, является обеспечение растениями ячменя, имеющими низкий уровень (1,3;1,4)-β-глюканов, при этом растения ячменя в то же время имеют приемлемые агрономические признаки, приемлемую частоту разрушения зерен (например, менее чем в 2 раза по сравнению с растением дикого типа, не имеющим мутации CsIF6, но в остальном имеющего тот же генотип) и в дополнение соотношение DP3/DP4, похожее на таковое у ячменя дикого типа.

В одном варианте осуществления изобретение относится к растениям ячменя, имеющим низкий уровень (1,3;1,4)-β-глюканов с высоким или низким соотношением DP3/DP4. Такие растения ячменя могут иметь агрономически приемлемые зерна, и они могут иметь более высокий уровень нерастворимых (1,3;1,4)-β-глюканов. Нерастворимые (1,3;1,4)-β-глюканы потенциально могут быть удалены в процессе пивоварения, и, таким образом, являются в некоторых вариантах осуществления предпочтительными. Burton & Fincher 2014 предположил, что растворимость молекул (1,3;1,4)-β-глюканов может быть предсказана из соотношения DP3:DP4, и что высокие и низкие соотношения могут привести в результате к более нерастворимым агрегатам.

Jobling et al. (2015) описывают экспрессию CSLF в искусственной системе в табачном листе, и описывают, что одна аминокислота (He757) в четвертом трансмембранном домене CSLF контролирует соотношение DP3:DP4, однако не описано, что модификация данного домена и соотношение DP3:DP4 коррелируют с количеством (1,3;1,4)-β-глюканов.

Одной из технических проблем, решаемых настоящим изобретением, является обеспечение растений ячменя, имеющих низкий уровень (1,3;1,4)-β-глюканов, при этом растения ячменя в то же время имеют приемлемые агрономические признаки и, кроме того, полезное соотношение DP3:DP4.

В одном аспекте изобретение относится к растениям ячменя, несущим мутацию отдельных аминокислот в трансмембранных доменах. Изобретение неожиданно демонстрирует, что такие растения ячменя содержат низкий уровень (1,3;1,4)-β-глюканов (обычно в диапазоне от 1,7 до 5%), являются жизнеспособными, агрономически приемлемыми и имеют урожайность, сопоставимую с другими сортами ячменя. Такие растения ячменя особенно полезны для способов производства напитков на основе зерновых

с уменьшенным временем прорастания.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам и приспособлениям для обеспечения растений ячменя с тонко регулируемым содержанием (1,3;1,4)-β-глюканов. Таким образом, растения ячменя по изобретению не только имеют низкое содержание (1,3;1,4)-β-глюканов, но также позволяют контролировать соотношение DP3:DP4 у данных растений ячменя.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к растению ячменя или его части, где ядра указанного растения ячменя имеют пониженное содержание (1,3;1,4)-β-глюканов, и где указанное растение ячменя несет мутацию в гене CsIF6, где указанный мутированный ген CsIF6 кодирует мутантный полипептид CsIF6, где указанный мутантный CsIF6 представляет собой CsIF6 последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену одной аминокислоты в локализованном в мембране домене CsIF6, где указанная замена представляет собой замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту или замещение полярной аминокислоты на неполярную аминокислоту, где локализованные в мембране домены CsIF6 состоят из аминокислот от 109 до 128, от 137 до 158, от 700 до 731, от 741 до 758, от 835 до 857 и от 864 до 882 последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Также аспектом изобретения является обеспечение растительных продуктов, приготовленных из указанного растения ячменя, а также способов приготовления растительных продуктов из указанного растения ячменя. Растения ячменя по настоящему изобретению предпочтительно могут быть использованы для приготовления растительных продуктов, например, суслу, с пониженной вязкостью по сравнению с суслom, приготовленным из ядер растения ячменя, несущего ген CsIF6 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип растения ячменя что и растения ячменя по изобретению.

Описание чертежей

На фиг. 1 показано содержание (1,3;1,4)-β-глюканов (сокращенно β-глюкан или BGL) в мутантах, идентифицированных либо способом цифровой идентификации мутаций (Digital Mutation Identification (DMI)) (Мут1, 2, 3 и 4 с соответствующим эталоном 1), либо секвенированием (Мут5 и соответствующий эталон). Столбцы показывают ± стандартное отклонение (standard deviation, SD).

На фиг. 2 показано соотношение DP3:DP4 у мутантов, идентифицированных либо способом DMI (Мут1, 2, 3, 4 с соответствующим эталоном 1), либо секвенированием (Мут5 и соответствующий эталон).

На фиг. 3 показана модель белка CsIF6, встроенного в плазматическую мембрану. Указанные мутации представляют собой DMI-мутанты.

На фиг. 4 показан пример оборудования, применяемого для приготовления зеленого солода. Оборудование содержит резервуар (2), в котором зерна можно погружать в водный раствор и непрерывно аэрировать. Оборудование содержит впускное отверстие для зерен зерновых культур (1), резервуар, например, резервуар для замачивания (2); впускные отверстия для газа, например, через пористые камни вулканического происхождения (sinter stone) (3); насос, например, воздушный насос (4); выпускное отверстие для зерен зерновых культур (5); зерновой насос (6); оборудование для мелкого раздробления зерен зерновых культур, например, мельница (7); впускное отверстие (8); емкость, например, емкость для затирания (9), и; выпускное отверстие (10).

На фиг. 5 показаны активности α-амилазы (а), β-амилазы (b) и свободной предельной декстриназы (с), измеренные в зернах мутанта 2 (мутант) и в зернах сорта Paustian (эталон) во время солодования.

На фиг. 6 показано содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в зернах мутанта 2 (мутант) и в сорт Paustian (эталон) в созревших зернах ячменя (0 день) и в зеленом солоде на 1, 2, 3, 4, 5, 6 дни, а также в обжаренном солоде (7 день).

На фиг. 7 показана вязкость (мПа·с) фильтрованного суслу CW-3a, Paustian, CW-4 и Quench.

Подробное описание

Определения.

Как используется в данном документе, неопределенный артикль "а" может означать один или несколько, в зависимости от контекста, в котором он используется.

Используемый в данном документе термин "добавка" относится к источникам богатого углеродом сырья, добавляемым во время приготовления пива. Добавкой может быть непропорощенное зерно злаков, которое может быть измельчено вместе с пророщенными зернами, приготовленными согласно изобретению. Добавкой также может быть сироп, сахар или т.п.

Используемый в данном документе термин "аминокислота" относится к протеиногенной аминокислоте. Предпочтительно протеиногенные аминокислоты представляют собой одну из 20 аминокислот, кодируемых стандартным генетическим кодом. Одно- и трехбуквенные коды согласно номенклатуре IUPAC используются для названия аминокислот.

Термин "аминокислота, соответствующая X" используется в данном документе для описания аминокислот данного полипептида (например, мутантного полипептида CsIF6) по отношению к аминокислотам эталонного полипептида (например, CsIF6 последовательности SEQ ID NO: 1). После выравнивания указанного полипептида с эталонным полипептидом аминокислота соответствует X, если она находится в том же положении, что и X в указанном выравнивании.

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

Термин "амилопектин" относится к гомополимерам α -D-глюкозы. Молекулы амилопектина содержат частые α -1-6-гликозидные связи. Это приводит к появлению точек ветвления в α -1-4-связанных глюкозных цепях, в результате чего образуются кластеры параллельных цепей через равные промежутки вдоль оси молекулы.

Термин "приблизительно" при использовании в данном описании в отношении числовых значений предпочтительно означает $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, еще более предпочтительно $\pm 1\%$.

Термин "ячмень" применительно к процессу приготовления напитков на основе ячменя, таких как пиво, особенно когда он используется для описания процесса солодования, означает ядра ячменя. Во всех других случаях, если не указано иное, "ячмень" означает растение ячменя (*Hordeum vulgare*, L.), включая любую селекционную линию, сорт или разновидность сорта, тогда как часть растения ячменя может быть любой частью растения ячменя, например, любой тканью или любыми клетками.

Используемый в данном документе термин "ячменная мука" относится к измельченным ядрам ячменя.

"Зерновое" растение, как определено в настоящем документе, является членом семейства растений Poaceae, культивируемых, главным образом, для их содержащих крахмал семян или ядер. Зерновые растения включают, но не ограничиваются ими, ячмень (*Hordeum*), пшеницу (*Triticum*), рис (*Oryza*), кукурузу (*Zea*), рожь (*Secale*), овес (*Avena*), сорго (*Sorghum*) и *Triticale*, гибрид пшеница-рожь.

Используемый в данном документе термин "заряженная аминокислота" относится к аминокислотам с электрически заряженными боковыми цепями. Предпочтительно, заряженная аминокислота выбрана из группы, состоящей из Arg, His, Lys, Asp и Glu. Отрицательно заряженные аминокислоты предпочтительно выбраны из группы, состоящей из Asp и Glu.

Используемый в данном документе термин "росток" относится к эмбриональному растущему зародышу, который виден во время фазы прорастивания зерна злаков. Термин " α -амилаза"

Используемый в данном документе термин "DP" относится к степени полимеризации и указывает на количество α -1,4-связанных единиц глюкозы в боковых цепях амилопектина. Таким образом, в качестве примера, DP3 относится к боковым цепям амилопектина, состоящим из последовательности трех α -1,4-связанных единиц глюкозы. Аналогичным образом, DP-4 относится к боковым цепям амилопектина, состоящим из последовательности четырех α -1,4-связанных единиц глюкозы. Термин "соотношение DP3:DP4" (1,3;1,4)- β -глюканов, как используется в данном описании, относится к соотношению боковых цепей амилопектина, состоящих из последовательности трех α -1,4-связанных единиц глюкозы, и боковых цепей амилопектина, состоящих из последовательности четырех α -1,4-связанных единиц глюкозы, в указанных (1,3;1,4)- β -глюканах. Соотношение DP3:DP4 может быть определено путем расщепления (1,3;1,4)- β -глюканов лихеназой с последующим количественным определением высвобожденных олигомеров DP3 и DP4, например, с помощью НРАЕС-РАD. В частности, соотношение DP3:DP4 может быть определено, как описано в примере 3.

Под "кодированием" или "кодированным" в контексте указанной нуклеиновой кислоты подразумевается включение информации для трансляции в указанный белок. Нуклеиновая кислота или полинуклеотид, кодирующий белок, может содержать нетранслируемые последовательности, например, интроны, в транслируемых областях нуклеиновой кислоты или может не иметь таких промежуточных нетранслируемых последовательностей, например, в кДНК. Информация, с помощью которой кодируется белок, определяется использованием кодонов.

Используемый в данном документе термин "экспрессия" в контексте нуклеиновых кислот следует понимать как транскрипцию и накопление мРНК. "Экспрессия", используемая в контексте белков, относится к трансляции мРНК в полипептид.

Термин "ген" означает сегмент ДНК, участвующий в продуцировании полипептидной цепи; он включает области, предшествующие кодирующей области и следующие за кодирующей областью (промотор и терминатор). Кроме того, гены растений обычно состоят из экзонов, прерываемых интронами.

Используемый в данном документе термин "проросшее зерно" относится к зерну, имеющему видимый росток и видимый стебель.

Используемый в данном документе термин "иницирование прорастивания" относится к моменту времени, когда зерна ячменя с содержанием воды менее 15% контактируют с достаточным количеством воды для иницирования прорастивания.

Используемый в данном документе термин " β -глюканаза" относится к ферментам, способным деполимеризовать зерновой β -глюкан. Соответственно, если не указано иное, термин " β -глюканаза" относится к эндо- или экзоферменту или их смеси, характеризующейся (1,3;1,4)- β - и/или (1,4)- β -глюканазной активностью.

"Содержание (1,3;1,4)- β -глюканов" в данном описании может быть определено любым применимым способом. Предпочтительно, содержание "(1,3;1,4)- β -глюканов" определяется как сумма содержа-

ния олигомеров Glc- β -(1 \rightarrow 4)-Glc- β -(1 \rightarrow 3)-Glc (DP3) и Glc- β -(1 \rightarrow 4)-Glc- β -(1 \rightarrow 4)-Glc- β -(1 \rightarrow 3)-Glc (DP4). Содержание олигомеров DP3 и DP4 можно, например, определить путем расщепления лихеназой (1,3;1,4)- β -глюканов с последующим количественным определением, например, высокоэффективной анионообменной хроматографией с импульсным амперометрическим детектированием (High-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)). Предпочтительно, содержание (1,3;1,4)- β -глюканов определяют, как описано ниже в примере 3.

Термин "(1,3;1,4)- β -глюкансинтаза", как используется в данном документе, следует рассматривать как любой белок, который катализирует синтез (1,3;1,4)- β -глюканов и, необязательно, катализирует полимеризацию глюкопиранозильных мономеров. Например, (1,3;1,4)- β -глюкансинтаза может быть полипептидом, кодируемым геном CsIF или его функциональным гомологом.

Термин "ядро" определяется как включающее зерновой кариопсис, также обозначаемый как внутреннее семя. Кроме того, ядро может содержать лемму и палеу. У большинства сортов ячменя лемма и палеа прилипают к кариопсису и являются частью ядра после обмолота. Однако, встречаются и голые сорта ячменя. В них кариопсис свободен от леммы и палеи и вымывается свободно, как в пшенице. Термины "ядро" и "зерно" используются здесь взаимозаменяемым образом.

Используемый в данном документе термин "солодование" относится к контролируемому проращиванию зерен злаков (в частности, зерен ячменя), происходящему в контролируемых условиях окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления "солодование" может дополнительно включать стадию сушки указанных пророщенных зерен злаков, например, печной сушки.

Используемый в данном документе термин "зеленый солод" относится к пророщенным зернам злаков, которые не подвергались стадии печной сушки. В целом указанные зерна злаков прорастали в контролируемых условиях окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления зеленый солод представляет собой измельченный зеленый солод.

Используемый в данном документе термин "высушенный в печи солод" относится к пророщенным зернам зерновых, которые были высушены печной сушкой. В целом, указанные зерна злаков прорастали в контролируемых условиях окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления высушенный в печи солод представляет собой измельченный высушенный в печи солод.

"Затирание" представляет собой инкубацию измельченного солода (например, зеленый солод или высушенный в печи солод) и/или непроросших зерен злаков в воде. Затирание предпочтительно проводится при определенной температуре(ах) и в определенном объеме воды.

"Мутации" включают делеции, вставки, замены, трансверсии и точечные мутации в кодирующих и некодирующих областях гена. Делеции могут быть всего гена или только части гена. Точечные мутации могут касаться изменений одной пары оснований и могут приводить в результате к преждевременным стоп-кодонам, мутациям со сдвигом рамки, мутации сайта сплайсинга или аминокислотным заменам. Ген, содержащий мутацию, может упоминаться как "мутантный ген". Если указанный мутантный ген кодирует полипептид с последовательностью, отличной от дикого типа, указанный полипептид может упоминаться как "мутантный полипептид".

Термин "измельченный" относится к материалу (например, ядрам ячменя или солоду), который был тонко измельчен, например, путем резки, помола, измельчения или дробления. Ядра ячменя можно измельчать во влажном состоянии, например, с помощью измельчителя или мельницы мокрого помола. Измельченные ядра ячменя или измельченный солод достаточно тонко измельчены, чтобы сделать материал пригодным для водных экстрактов. Измельченные ядра ячменя или солод не могут быть регенерированы в целое растение по существу биологическими способами.

Используемый в данном документе термин "неполярная аминокислота" относится к аминокислотам с гидрофобными боковыми цепями. Предпочтительно, неполярная аминокислота выбрана из группы, состоящей из Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp и Gly, более предпочтительно из группы, состоящей из Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Trp и Gly.

Под термином "растительный продукт" подразумевается продукт, полученный в результате обработки растения или растительного материала. Таким растительным продуктом может быть, например, зеленый солод, высушенный в печи солод, сусло, ферментированный или неферментированный напиток, пищевой продукт или кормовой продукт.

Используемый в данном документе термин "полярная аминокислота" относится к аминокислотам с полярными, незаряженными боковыми цепями. Предпочтительно, полярная аминокислота выбрана из группы, состоящей из Ser, Thr, Asn и Gln.

Используемый в данном документе термин "потомство" означает растение, которое прямо или косвенно является потомством данного растения. Таким образом, потомство не ограничивается прямым потомком, но также включает и потомков в многочисленных поколениях. Как правило, потомство растения ячменя, несущего специфическую мутацию, также несет данную специфическую мутацию. Таким образом, потомство растения ячменя, несущее специфическую мутацию в гене CsIF6, также несет данную специфическую мутацию.

Используемый в данном документе термин "идентичность последовательности" относится к %

идентичных аминокислот или нуклеотидов между последовательностью-кандидатом и эталонной последовательностью после выравнивания. Таким образом, последовательность-кандидат, имеющая 80%-ную идентичность аминокислот с эталонной последовательностью, требует, чтобы, после выравнивания, 80% аминокислот в последовательности-кандидате были идентичны соответствующим аминокислотам в эталонной последовательности. Идентичность в соответствии с настоящим изобретением определяется с помощью компьютерного анализа, такого как, без ограничений, компьютерная программа выравнивания Clustal Omega для выравнивания полипептидных последовательностей (Sievers et al. (2011 October 11), *Molecular Systems Biology*, 7:539, PMID: 21988835; 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 и предлагаемые в ней параметры по умолчанию. Программное обеспечение Clustal Omega доступно на веб-сайте EMBL-EBI по адресу <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. При использовании данной программы с настройками по умолчанию, зрелая (биоактивная) часть запроса и эталонный полипептид выравниваются. Число полностью консервативных остатков подсчитывается и делится на длину эталонного полипептида. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей могут быть использованы алгоритмы MUSCLE или MAFFT. Идентичности последовательностей можно рассчитывать аналогично тому, как указано для аминокислотных последовательностей. Таким образом, идентичность последовательности, обеспеченная в данном документе, рассчитывается по всей длине эталонной последовательности.

Используемый в данном документе термин "крахмал" относится к композиции одной или обеих дискретных макромолекул: амилозы и амилопектина.

Используемый в данном документе термин "замачивание" относится к процессу увеличения содержания воды злакового ядра.

Используемый в данном документе термин "содержание воды" зерна относится к % H₂O мас./мас., в указанном зерне.

Используемый в данном документе термин "CsIF6 дикого типа" относится к гену, кодирующему полипептид последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Ферментативные активности злаковых зерен в контексте настоящего описания относятся к активностям, измеренным в муке, приготовленной из указанного типа зерна. Например, 10 ед./г активности β-амилазы на грамм злакового зерна относятся к указанной активности β-амилазы (10 ед.), измеренной в водном экстракте, полученном из 1 г муки (сухого вещества) из указанного зерна. Активность α-амилазы определяют с помощью K-CERA 01/12 (протокол и набор доступны от Megazyme, Ирландия). Активность β-амилазы определяют с помощью K-BETA3 (протокол и набор доступны от Megazyme, Ирландия). Активность предельной декстриназы определяют с помощью T-LDZ1000 (протокол и набор доступны от Megazyme, Ирландия).

Объем газа, указанный в данном документе, относится к объему указанного газа при 1 атм и 20°C.

Объем O₂, как указано в данном документе, относится к объему O₂ при 1 атм и 20°C. В вариантах осуществления изобретения, где O₂ содержится в смеси газов, тогда может быть определен общий объем газовой смеси, и объем O₂ может быть рассчитан как процент от общего объема, составляющий O₂. Например, атмосферный воздух содержит 21% O₂. Таким образом, объем O₂ в атмосферном воздухе, используемый в данном документе, составляет 21% от общего объема атмосферного воздуха.

Под термином "сусло" подразумевается жидкий экстракт солода и/или злаковых ядер, таких как измельченный солод и/или измельченные злаковые ядра и необязательно дополнительные добавки. Сусло, как правило, получают путем затиранья, необязательно с последующим "барботированием", в процессе извлечения остаточных Сахаров и других соединений из отработанного зерна после затиранья горячей водой. Барботирование, как правило, проводят в барабане-отстойнике, фильтре для затиранья или в другом устройстве, чтобы обеспечить отделение извлеченной воды от отработанного зерна. Сусло, приготовленное после затиранья, обычно называют "первым суслом", тогда как сусло, приготовленное после барботирования, обычно называют "вторым суслом". Если не указано, термин "сусло" может быть первым суслом, вторым суслом или их комбинацией. При обычном производстве пива сусло варят вместе с хмелем. Сусло без хмеля может также упоминаться как "сладкое сусло", тогда как сусло, сваренное с хмелем, может упоминаться как "вареное сусло" или просто как сусло.

CsIF6.

Настоящее изобретение обеспечивает растение ячменя или его часть, где ядро указанного растения ячменя имеет пониженное содержание (1,3;1,4)-β-глюканов и где указанное растение ячменя несет мутацию в гене CsIF6, причем указанный мутированный ген CsIF6 кодирует мутантный полипептид CsIF6.

Последовательность полной кодирующей последовательности целлюлозосинтазаподобного гена CsIF6 (CsIF6) дикого типа из сорта Sloop ячменя *Hordeum vulgare* представлена здесь как SEQ ID NO: 2.

Последовательность последовательности целлюлозосинтазаподобного полипептида CsIF6 дикого типа из сорта Sloop ячменя *Hordeum vulgare* представлена здесь как SEQ ID NO: 1. В дополнение к последовательности, представленной здесь как SEQ ID NO: 1, полипептид CsIF6 дикого типа также может нести полиморфизм A590T (Taketa et al. (2012)). Соответственно CsIF6 полипептид дикого типа также

может иметь последовательность, представленную в настоящем описании как SEQ ID NO: 3.

Несмотря на предпринятые исследователями значительные усилия, конкретные функции отдельных генов CsI в значительной степени неизвестны. Гены CsI были подразделены на восемь групп, обозначенных от CsIA до CsIH. В соответствии с настоящим изобретением было обнаружено, что (1,3;1,4)-β-глюкансинтазы кодируются членами семейства гена CsIF6.

Растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6.

Настоящее изобретение обеспечивает растение ячменя или его часть, где ядро указанного растения ячменя имеет пониженное содержание (1,3;1,4)-β-глюканов, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене CsIF6 и где указанный мутированный ген CsIF6 кодирует мутантный полипептид CsIF6. Мутация в гене CsIF6 может представлять собой любую из мутаций, описанных в данном документе, однако, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения мутация представляет собой точечную мутацию в кодирующей области гена CsIF6.

Мутантный полипептид CsIF6, кодируемый указанным мутантным геном CsIF6, может представлять собой любой мутантный полипептид CsIF6, однако, предпочтительно указанный мутантный полипептид CsIF6 содержит одно аминокислотное замещение.

В частности, мутантный полипептид CsIF6 может включать замену одной аминокислоты в локализованном в мембране домене CsIF6. Мутантный полипептид CsIF6 может предпочтительно включать одно или несколько из следующих замещений в локализованном в мембране домене:

замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту; и

замещение полярной аминокислоты на неполярную аминокислоту.

Используемые в данном документе термины "замещение аминокислоты XX на аминокислоту YY" или "замещение аминокислоты XX аминокислотой YY" относятся к аминокислоте XX в эталонной последовательности (обычно последовательность CsIF6 дикого типа), заменяемой аминокислотой YY.

В одном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид CsIF6 может включать замену одной аминокислоты в одном из локализованных в мембране доменов CsIF6. Локализованные в мембране домены CsIF6 показаны в данном документе в табл. 3.

В одном варианте осуществления изобретения мутантный полипептид CsIF6 может включать замену неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту в одном или более из следующих локализованных в мембране доменов CsIF6: аминокислоты от 109 до 128, от 137 до 158, от 700 до 731, от 741 до 758, от 835 до 857 и от 864 до 882 в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления изобретения растение ячменя несет мутацию в гене CsIF6, что приводит в результате к мутантному гену CsIF6, кодирующему мутантный полипептид CsIF6, включающий замещение, причем замещением может быть замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту, в одном или более из следующих локализованных в мембране доменов CsIF6: аминокислоты от 109 до 128, от 137 до 158, от 700 до 731, от 741 до 758, от 835 до 857 и от 864 до 882 последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления мутантный полипептид CsIF6 может представлять собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену одной аминокислоты в трансмембранном домене, состоящем из аминокислот от 835 до 857 из CsIF6, где указанная замена представляет собой замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту. Указанная неполярная аминокислота может, например, представлять собой любую из аминокислот от 835 до 857, которые подчеркнуты в табл. 3. Например, указанная замена может представлять собой замещение неполярной аминокислоты на отрицательно заряженную аминокислоту.

Например, мутантный полипептид CsIF6 может представлять собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 847 на заряженную аминокислоту. Например, указанная замена может представлять собой замещение глицина (G) в положении 847 на отрицательно заряженную аминокислоту, например, Glu или Asp.

Предпочтительно мутантный полипептид CsIF6 может представлять собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 847, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) в положении 847 на глутаминовую кислоту. (E).

В одном варианте осуществления мутантный полипептид CsIF6 может представлять собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену одной аминокислоты в трансмембранном домене, состоящем из аминокислот от 741 до 758 из CsIF6, где замена представляет собой замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту. Указанная неполярная аминокислота может, например, представлять собой любую из аминокислот от 741 до 758, которые подчеркнуты в табл. 3. Например, указанная замена может представлять собой замещение неполярной аминокислоты на отрицательно заряженную аминокислоту.

Например, мутантный полипептид CsIF6 может представлять собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 748 на заряженную аминокислоту. Например, указанная замена может представлять собой замеще-

ние глицина (G) в положении 748 на отрицательно заряженную аминокислоту, например, Glu или Asp. Предпочтительно мутантный полипептид CsIF6 может представлять собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 748, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) в положении 748 на аспарагиновую кислоту (D). Таким образом, растение ячменя может нести мутированный ген HvCsIF6, кодирующий мутантный белок HvCsIF6, содержащий Gly→Asp мутацию аминокислоты 748 в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления изобретения растение ячменя может нести Gly→Asp мутацию нуклеотида 2243 в кодирующей последовательности гена HvCsIF6 (SEQ ID NO: 2).

В одном варианте осуществления мутантный полипептид CsIF6 может включать замену одной аминокислоты в любом локализованном в мембране домене полипептида CsIF6. Например, замена может представлять собой замещение полярной аминокислоты на неполярную аминокислоту в одном или нескольких следующих локализованных в мембране доменах CsIF6: аминокислоты от 109 до 128, от 137 до 158, от 700 до 731, от 741 до 758, от 835 до 857 и от 864 до 882 в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

Мутантный полипептид CsIF6 может представлять собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену одной аминокислоты в трансмембранном домене, состоящем из аминокислот от 700 до 731 из CsIF6, где указанная замена представляет собой замещение полярной аминокислоты на неполярную аминокислоту. Указанная полярная аминокислота может, например, представлять собой любую из аминокислот от 700 до 731, что подчеркнуто в табл. 3.

Например, мутантный полипептид CsIF6 может представлять собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 709 на неполярную аминокислоту.

Предпочтительно мутантный полипептид CsIF6 может представлять собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 709, где указанная замена представляет собой замещение треонина (T) в положении 709 на изолейцин (I).

Для целей настоящей заявки на патент семена растения ячменя (*Hordeum vulgare*), обозначенные как "мутант 2", были депонированы в NCIMB Ltd, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA Scotland в соответствии с положениями Будапештского договора. Растение ячменя "мутант 2" был депонировано 12 ноября 2018 г. и получило регистрационный номер NCIMB 43273.

В одном варианте осуществления изобретения растение ячменя по настоящему изобретению представляет собой растение ячменя (*Hordeum vulgare*), депонированное 12 октября 2018 г. в NCIMB под номером NCIMB 43273, и упоминается как "мутант 2"; или его потомство. Таким образом, растение ячменя по настоящему изобретению может представлять собой растение ячменя мутант 2, депонированное в NCIMB 12 октября 2018 г. и имеющее регистрационный номер NCIMB 43273, или любое растение ячменя, являющееся его потомством, где растение ячменя несет Gly→Asp мутацию нуклеотида 2243 кодирующей последовательности гена HvCsIF6 (SEQ ID NO: 2) и/или где ген HvCsIF6 из указанного растения ячменя кодирует мутантный белок HvCsIF6, содержащий Gly→Asp мутацию аминокислоты 748 в SEQ ID NO: 1.

Интересно, что растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6, ведущую в результате к мутантному гену CsIF6, кодирующему мутантный полипептид CsIF6, несущий мутацию за пределами локализованных в мембране аминокислот (G732D), не показало какого-либо значительного снижения содержания (1,3;1,4)-β-глюканов. В растении ячменя, содержащем мутацию в гене CsIF6, ведущую в результате к преждевременному стоп-кодону (T676Stop), уровни (1,3;1,4)-β-глюканов были чрезвычайно низкими, и такие растения ячменя не обладали хорошими агрономическими свойствами. Таким образом, такие растения характеризовались значительно сниженными плодovitостью и растительным ростом.

Растение ячменя.

Растение ячменя по изобретению может представлять собой любое растение вида *Hordeum vulgare*, включая любую селекционную линию, сорт или разновидность сорта.

"Дикий ячмень", *Hordeum vulgare ssp. spontaneum*, считается прародителем современных культивируемых форм ячменя. Одомашненные, но неоднородные смеси ячменя называются местными сортами ячменя. В настоящее время, большинство местных сортов были вытеснены в передовых земледельческих хозяйствах чистыми линейными сортами. По сравнению с местными сортами, современные сорта ячменя обладают множеством улучшенных свойств (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 CsIF6.

Однако предпочтительными растениями ячменя для использования в настоящем изобретении являются современные сорта ячменя или чистые линии. Сорт ячменя, используемый в настоящем изобретении, может быть выбран, например, из группы, состоящей из

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 and 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 and Jersey,

предпочтительно из группы, состоящей из

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 Beckic, 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 и Golden Promise.

Растение ячменя может быть в любой подходящей форме. Например, растение ячменя согласно изобретению может представлять собой жизнеспособное растение ячменя, высушенное растение, гомогенизированное растение или измельченное ядро ячменя. Растение может быть зрелым растением, зародышем, ядром, пророщенным ядром, солодовым ядром (например, в форме зеленого солода или высушенного в печи солода), измельченным солодовым ядром, измельченным ядром или т.п.

Части растений ячменя могут представлять собой любую подходящую часть растения, такую как ядра, зародыши, листья, стебли, корни, цветы или их фракции. Фракция может представлять собой, например, часть ядра, эмбриона, листа, стебля, корня или цветка. Части растений ячменя также могут представлять собой фракцию гомогената или фракцию измельченного растения ячменя или ядра.

В одном варианте осуществления изобретения частями растений ячменя могут быть клетки указанного растения ячменя, такие как жизнеспособные клетки, которые могут размножаться *in vitro* в тканевых культурах. В других вариантах осуществления, однако, части растений ячменя могут быть жизнеспособными клетками, которые не способны созревать в целое растение ячменя, т.е. клетками, которые не являются репродуктивным материалом.

Характеристики растений ячменя, несущих мутацию в CsIF6.

Изобретение обеспечивает растения ячменя, несущие мутацию в гене CsIF6. Одно из главных преимуществ таких растений ячменя является то, что ядра указанного растения ячменя имеют пониженное содержание (1,3;1,4)-β-глюканов.

Одно преимущество, обеспечиваемое растениями ячменя, несущими мутацию в гене CsIF6 и имеющими пониженное содержание (1,3;1,4)-β-глюканов, является то, что более низкое содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в зерне может быть полезным в процессе пивоварения, так как может помочь обеспечить оптимальное количество Сахаров, доступное для дрожжевого брожения в конце затирания и, следовательно, уменьшить общую стоимость сырья. Другое преимущество, обеспечиваемое растениями ячменя, несущими мутацию в гене CsIF6 и имеющими пониженное содержание (1,3;1,4)-β-глюканов, является то, что растение ячменя с низким содержанием (1,3;1,4)-β-глюканов может улучшить промышленные процедуры, такие как фильтруемость. Кроме того, такие растения ячменя особенно полезны для энергосберегающих процессов солодования. В то время как снижение содержания (1,3;1,4)-β-глюканов может быть полезным, слишком низкие уровни содержания (1,3;1,4)-β-глюканов также могут быть проблематичными и могут привести к ухудшению агрономических свойств.

Таким образом, в одном варианте осуществления растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6, может представлять собой растение ячменя с ядрами, имеющими содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диа-

пазоне от 1 до 3% общей массы сухого вещества ядер.

Растения ячменя по изобретению, несущие мутацию в гене CsIF6 и имеющие ядра с пониженным содержанием (1,3;1,4)-β-глюканов, дополнительно характеризуются хорошими агрономическими качествами, такими как агрономические качества, сравнимые с диким типом.

Растение ячменя может представлять собой растение ячменя с ядрами, имеющими содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1 до 5% общей массы сухого вещества ядер, например, от 1 до 3% общей массы сухого вещества ядер, такое как от 1,3 до 4% общей массы сухого вещества ядер, например, от 1,3 до 3% общей массы сухого вещества ядер, предпочтительно от 1,3 до 2% общей массы сухого вещества ядер.

В одном варианте осуществления растение ячменя может представлять собой растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6 и кодирующее мутантный полипептид CsIF6, где полипептид CsIF6 представляет собой полипептид CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену одной аминокислоты в одном или нескольких из следующих локализованных в мембране доменов CsIF6: аминокислоты от 109 до 128, от 137 до 158, от 700 до 731, от 741 до 758, от 835 до 857 и от 864 до 882 в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, где замена представляет собой замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту или замещение полярной аминокислоты на неполярную аминокислоту и где ядра указанного растения ячменя могут иметь содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, например, содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, такое как содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 2,5% общей массы сухого вещества ядер, предпочтительно содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 2,0% общей массы сухого вещества ядер, например, содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,3 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, такое как содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,5 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, предпочтительно содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,7 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер.

В одном варианте осуществления растение ячменя может представлять собой растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6 и кодирующее мутантный полипептид CsIF6, где полипептид CsIF6 представляет собой полипептид CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 847, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) на глутаминовую кислоту (E), и ядра указанного растения ячменя могут иметь содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, например, содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, таких как содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 2,5% общей массы сухого вещества ядер, предпочтительно содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 2,0% общей массы сухого вещества ядер, например, содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,3 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, такое как содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,5 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, предпочтительно содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,7 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер.

В одном варианте осуществления растение ячменя может представлять собой растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6 и кодирующее мутантный полипептид CsIF6, где полипептид CsIF6 представляет собой полипептид CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 748, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) на аспарагиновую кислоту (D), и ядра указанного растения ячменя могут иметь содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, например, содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, таких как содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 2,5% общей массы сухого вещества ядер, предпочтительно содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 2,0% общей массы сухого вещества ядер, например, содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,3 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, такое как содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,5 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, предпочтительно содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,7 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер.

В одном варианте осуществления растение ячменя может представлять собой растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6 и кодирующее мутантный полипептид CsIF6, где полипептид CsIF6 представляет собой полипептид CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 709, где указанная замена представляет собой замещение треонина (T) на изолейцин (I), и ядра указанного растения ячменя могут иметь содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, например, содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, таких как содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 2,5% общей массы сухого вещества ядер, предпочтительно содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 2,0% общей массы сухого веще-

ства ядер, например, содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,0 до 1,7% общей массы сухого вещества ядер, например, содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,2 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, такое как содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,5 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер, предпочтительно содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1,3 до 3,0% общей массы сухого вещества ядер.

В одном варианте осуществления изобретения растение ячменя может иметь содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в ядрах, сниженное до не более чем 70%, предпочтительно не более чем 60%, например, не более чем 55% от содержания (1,3;1,4)-β-глюканов в ядрах ячменя, содержащего CsIF6 ген дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

Растение ячменя может представлять собой растение ячменя, имеющее содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в ядрах, сниженное до по меньшей мере 30% и не более чем 60%, предпочтительно по меньшей мере 40% и не более чем 60%, например по меньшей мере 40% и не более чем 55% от содержания (1,3;1,4)-β-глюканов в ядрах ячменя, содержащего CsIF6 ген дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

В одном варианте осуществления растение ячменя может представлять собой растение ячменя, имеющее содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в ядрах, сниженное до по меньшей мере 30% и не более чем 60%, предпочтительно по меньшей мере 40% и не более чем 60%, например, по меньшей мере 40% и не более чем 55% от содержания (1,3;1,4)-β-глюканов в ядрах растения ячменя сорта Paustian.

В одном варианте осуществления растение ячменя может представлять собой растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6 и кодирующее мутантный полипептид CsIF6, где полипептид CsIF6 представляет собой полипептид CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 847, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) на глутаминовую кислоту (E), и ядра указанного растения ячменя могут иметь содержание (1,3;1,4)-β-глюканов, сниженное до по меньшей мере 30% и не более чем 60%, например по меньшей мере 40% и не более чем 60% от содержания (1,3;1,4)-β-глюканов в ядрах ячменя, содержащего CsIF6 ген дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

В одном варианте осуществления растение ячменя может представлять собой растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6 и кодирующее мутантный полипептид CsIF6, где полипептид CsIF6 представляет собой полипептид CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 748, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) на аспарагиновую кислоту (D), и ядра указанного растения ячменя могут иметь содержание (1,3;1,4)-β-глюканов, сниженное до по меньшей мере 30% и не более чем 60%, например, по меньшей мере 40% и не более чем 60% от содержания (1,3;1,4)-β-глюканов в ядрах ячменя, содержащего CsIF6 ген дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

В одном варианте осуществления растение ячменя может представлять собой растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6 и кодирующее мутантный полипептид CsIF6, где полипептид CsIF6 представляет собой полипептид CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 709, где указанная замена представляет собой замещение треонина (T) на изолейцин (I), и ядра указанного растения ячменя могут иметь содержание (1,3;1,4)-β-глюканов, сниженное до по меньшей мере 30% и не более чем 60%, например, по меньшей мере 40% и не более чем 60% от содержания (1,3;1,4)-β-глюканов в ядрах ячменя, содержащего CsIF6 ген дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

Растения ячменя по изобретению, несущие мутации в гене CsIF6 и кодирующие мутированный полипептид CsIF6, и имеющие ядра с пониженным содержанием (1,3;1,4)-β-глюканов, могут дополнительно характеризоваться ядрами с заданным соотношением DP3:DP4, например соотношением DP3:DP4 ниже, чем соотношение DP3:DP4 для растения дикого типа, или выше, чем соотношение DP3:DP4 для растения дикого типа, или аналогично соотношению DP3:DP4 для растения дикого типа.

В зависимости от различных факторов, могут быть желательны различные DP3:DP4.

Растения ячменя дикого типа обычно характеризуются соотношением DP3:DP4 в диапазоне от 2,5 до 4.

В одном варианте осуществления растения ячменя по изобретению содержат (1,3;1,4)-β-глюкан в ядрах, имеющие соотношение DP3:DP4 не более чем 2,5, например не более чем 2,2, например, в диапазоне от 1,0 до 2,2.

В одном варианте осуществления растение ячменя может представлять собой растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6 и кодирующее мутантный полипептид CsIF6, где полипептид CsIF6 представляет собой полипептид CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 847, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) на глутаминовую кислоту (E), и ядра указанного растения ячменя могут иметь соотношение DP3:DP4 не более чем 2,5, такое как не более чем 2,2, например, в диапазоне от 1,0 до 2,2.

В одном варианте осуществления ядра указанного растения ячменя могут иметь соотношение

DP3:DP4 в диапазоне от 2,5 до 4.

В одном варианте осуществления растение ячменя может представлять собой растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6 и кодирующее мутантный полипептид CsIF6, где полипептид CsIF6 представляет собой полипептид CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 748, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) на аспарагиновую кислоту (D), и ядра указанного растения ячменя могут иметь соотношение DP3:DP4 в диапазоне от 2,5 до 4.

В одном варианте осуществления ядра указанного растения ячменя могут иметь соотношение DP3:DP4, равное по меньшей мере 3,5, например по меньшей мере 4,0, например по меньшей мере 4,5, например, в диапазоне от 4 до 6.

В одном варианте осуществления растение ячменя может представлять собой растение ячменя, несущее мутацию в гене CsIF6 и кодирующее мутантный полипептид CsIF6, где полипептид CsIF6 представляет собой полипептид CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 709, где указанная замена представляет собой замещение треонина (T) на изолейцин (I), и ядра указанного растения ячменя могут иметь соотношение DP3:DP4, равное по меньшей мере 3,5, такое как по меньшей мере 4,0, например по меньшей мере 4,5, например, в диапазоне от 4 до 6.

(1,3;1,4)-β-глюкан является компонентом клеточной стенки, и снижение уровня (1,3;1,4)-β-глюканов может повлиять на растения ячменя. Например, снижение уровня (1,3;1,4)-β-глюканов и/или изменение соотношения DP3/DP4 (1,3;1,4)-β-глюканов может привести к появлению хрупких зерен ячменя с высоким процентом битых зерен.

В одном варианте осуществления предпочтительно, чтобы растения ячменя по изобретению имели ядра с приемлемой твердостью зерна. Таким образом, в одном варианте осуществления растения ячменя могут иметь ядра с частотой битого зерна менее 5%, например менее 3%, при определении, как описано в примере 6, приведенном ниже.

В частности, предпочтительно, чтобы частота битых зерен после обмолота зерен растений ячменя по изобретению была не более чем в 3 раза выше, более предпочтительно не более чем в 2 раза выше, чем частота битых зерен после обмолота зерен растения ячменя, не несущего мутацию в гене CsIF6, но в остальном идентичного. Так, например, растения ячменя, несущие мутации в гене CsIF6, кодирующем мутантный белок HvCsIF6, содержащий мутацию (например, Gly→Asp) аминокислоты 748 в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3, имеют частоту битых зерен после обмолота зерна, которая не более чем в 3 раза выше, более предпочтительно не более чем в 2 раза выше, чем частота битых зерен после обмолота зерен растения ячменя, не несущего указанной мутации, но в остальном идентичного. Частоту битых зерен предпочтительно определяют, как описано в примере 6, приведенном ниже.

Растения ячменя, содержащие более одной мутации.

В дополнение к описанным в данном документе мутациям растения ячменя могут также содержать одну или несколько дополнительных мутаций. Соответственно растение ячменя может содержать одну или несколько следующих мутаций.

В дополнение к одной или нескольким мутациям, описанным выше, растение ячменя может также содержать мутацию в гене, кодирующем LOX-1, что приводит к полной потере функционального LOX-1. Указанная мутация может, например, представлять собой любую из мутаций, описанных в международной заявке на патент WO 2005/087934. Например, растение ячменя может содержать ген, кодирующий LOX-1, содержащий преждевременный стоп-кодон, причем указанный кодон соответствует номерам оснований от 3572 до 3574 SEQ ID NO: 2 из WO 2005/087934, или мутацию сайта сплайсинга, причем указанная мутация соответствует номеру основания 2311 в SEQ ID NO: 6 из SEQ ID NO: 2 в WO 2005/087934.

В дополнение к одной или нескольким мутациям, описанным выше, растение ячменя может также содержать мутацию в гене, кодирующем LOX-2, что приводит к полной потере функционального LOX-2. Указанная мутация может, например, представлять собой любую из мутаций, описанных в международной заявке на патент WO 2010/075860. Например, растение ячменя может содержать ген, кодирующий LOX-2, содержащий мутацию в положении нуклеотида 2689 в SEQ ID NO: 1 в WO 2010/075860, приводящую в результате к образованию преждевременного стоп-кодона.

В дополнение к одной или нескольким мутациям, описанным выше, растение ячменя может также содержать мутацию в гене, кодирующем MMT, что приводит в результате к полной потере функционального MMT. Указанная мутация может, например, представлять собой любую из мутаций, описанных в международной заявке на патент WO 2010/063288. Например, растение ячменя может содержать ген, кодирующий MMT, содержащий мутацию G→A основания № 3076 в SEQ ID NO: 3 в WO 2010/063288, или ген, кодирующий MMT, содержащий мутацию G→A основания № 1462 в SEQ ID NO: 16 в WO 2010/063288.

В дополнение к одной или нескольким мутациям, описанным выше, растение ячменя также может содержать любую из мутаций, приводящих к повышенной активности альфа-амилазы, описанной в одно- временно рассматриваемой заявке под названием "Ячмень с повышенной активностью гидролитического фермента (Barley with increased hydrolytic enzyme activity)", назначенной тому же заявителю и с той же

датой подачи, что и настоящая заявка.

Растительные продукты.

Настоящее изобретение также относится к растительным продуктам, получаемым из растения ячменя с пониженным содержанием (1,3;1,4)- β -глоуканов и несущего мутацию в гене CsIF6, или его потомства, где указанный мутированный ген CsIF6 кодирует мутантный полипептид CsIF6, например, любого из растений ячменя, описанных в данном документе.

Растительный продукт может представлять собой любой продукт, приготовленный из растения ячменя, например пищу, корм или напиток. Таким образом, растительный продукт может представлять собой любой из напитков, описанных ниже в разделе "Напиток и способ его производства". Растительный продукт также может представлять собой водный экстракт растения ячменя и/или солод, приготовленный из зерен указанного растения ячменя, например, растительный продукт может представлять собой сусло. Указанный водный экстракт может, например, быть приготовлен, как описано ниже в разделе "Водный экстракт и способы его получения".

В одном варианте осуществления растительный продукт может представлять собой солод, например, зеленый солод или высушенный в печи солод, такой как любой из солодов, описанных в настоящем документе ниже в разделе "Зеленый солод, высушенный в печи солод и способы его получения", или основанный на солоде продукт, такой как солодовые напитки. 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 опосредованно, как солодовый сироп и т.д. Таким образом, растительный продукт по изобретению может представлять собой любой из вышеупомянутых продуктов.

В одном варианте осуществления изобретения растительный продукт представляет собой ячменную муку, т.е. ячменную муку, приготовленную из зерен растения ячменя согласно изобретению.

В другом аспекте растительные продукты согласно изобретению содержат или даже состоят из сиропа, такого как ячменный сироп или сироп ячменного солода. Растительный продукт также может представлять собой экстракт ячменя или солода. Таким образом, растительный продукт может представлять собой сусло.

Зеленый солод, высушенный в печи солод и способы их производства.

Изобретение также относится к солоду, полученному из растения ячменя, несущего мутацию в гене CsIF6, например, любого из растений ячменя, описанных в данном документе. Указанный солод может представлять собой зеленый солод или высушенный в печи солод, приготовленный из зерен ячменя из растения ячменя, несущего мутацию в гене CsIF6, или его потомства. Указанная мутация может представлять собой любую из мутаций в гене CsIF6, описанную в данном документе выше.

Зеленый солод может быть приготовлен путем солодования, т.е. путем проращивания зерновых культур в контролируемых условиях окружающей среды. Как правило, упомянутое проращивание может включать стадию замачивания ядер ячменя, за которой следует стадия проращивания. Замачивание и проращивание также могут выполняться одновременно или частично одновременно. В некоторых вариантах осуществления производство солода может включать стадию сушки пророщенных зерен. Указанная стадия сушки предпочтительно может представлять собой печную сушку пророщенных ядер при повышенных температурах. Таким образом, высушенный в печи солод можно приготовить, подвергнув зеленый солод стадии печной сушки.

Таким образом, в одном варианте осуществления способ солодования может включать стадии

(a) обеспечения ядер растения ячменя, в частности, растения ячменя, несущего мутацию в гене CsIF6;

(b) замачивания указанных ядер ячменя;

(c) проращивания указанного ядра ячменя; и

(d) высушивания указанных пророщенных ядер ячменя, предпочтительно печной сушкой.

Пророщенные зерна ячменя могут быть получены способом, включающим стадии

(a) обеспечения ядер растения ячменя, в частности растения ячменя, несущего мутацию в гене CsIF6;

(b) замачивания указанных ядер ячменя;

(c) проращивания указанного ядра ячменя.

Стадии замачивания и проращивания могут выполняться последовательно, одновременно или частично одновременно.

В одном предпочтительном варианте осуществления замачивание и проращивание проводят одновременно в процессе проращивания, который включает инкубацию зерен ячменя в водном растворе, обычно при аэрации, в течение не более чем 72 ч.

Замачивание может быть выполнено любым обычным способом, известным специалисту. Один неограничивающий пример включает выдерживание при температуре в диапазоне от 10 до 25°C с чередованием сухих и влажных условий. Например, во время замачивания ядра ячменя можно инкубировать во влажных условиях в течение от 30 мин до 3 ч, а затем инкубировать в сухих условиях в течение от 30 мин

до 3 ч и при необходимости повторять указанную схему инкубации в диапазоне от 2 до 5 раз. Конечное содержание воды после замачивания может составлять, например, от 40 до 50%, например от 40 до 45%.

Растения ячменя, обеспеченные в настоящем изобретении, характеризуются наличием мутации в гене CsIF6 и, таким образом, кодированием мутантного полипептида CsIF6. Одно из главных преимуществ таких растений ячменя заключается в том, что ядра имеют пониженное содержание (1,3;1,4)-β-глюканов и адекватное соотношение DP3:DP4. Зерна таких растений ячменя с пониженным содержанием (1,3;1,4)-β-глюканов могут успешно прорасти в процессе короткого проращивания. Примеры применимых процессов короткого проращивания описаны в международной заявке на патент PCT/EP2017/065498, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Одним из примеров применимого процесса короткого проращивания является процесс проращивания, включающий стадию, где зерна ячменя инкубируют в водном растворе, как правило, при аэрации, причем весь процесс проращивания выполняется в течение не более чем 72 ч. Фактически во время проращивания (1,3;1,4)-β-глюканы обычно, по меньшей мере, частично гидролизуются ферментами, такими как β-глюканаза. Гидролитические ферменты, специфичные для (1,3;1,4)-β-глюканов, обычно присутствуют в небольшом количестве в начале процесса проращивания. Присутствие гидролитических ферментов, специфичных для (1,3;1,4)-β-глюканов, увеличивается с продолжением процесса проращивания. Процесс проращивания, проводимый в течение не более чем 72 ч в общем не обеспечивает достаточного времени для гидролиза (1,3;1,4)-β-глюканов до желаемого низкого уровня, если содержание (1,3;1,4)-β-глюканов является высоким с самого начала. Однако, растения ячменя по изобретению уже имеют низкий уровень (1,3;1,4)-β-глюканов с самого начала и, таким образом, гидролиз (1,3;1,4)-β-глюканов s во время проращивания менее критичен.

Как описано выше, проращивание может включать стадию инкубации зерен растения ячменя, несущих мутацию в гене CsIF6, в водном растворе при аэрации. Зерна ячменя могут инкубироваться в указанном водном растворе в течение достаточного времени, чтобы позволить проращивание большинства из указанных зерен ячменя. Зерна ячменя также могут инкубироваться в указанном водном растворе в течение периода времени, достаточного для того, чтобы получить содержание воды, составляющее по меньшей мере 35%, предпочтительно по меньшей мере 37%, например, в диапазоне от 35 до 60%. Обычно, зерна ячменя инкубируют в водном растворе в течение по меньшей мере 20 ч, например по меньшей мере 24 ч. Обычно зерна инкубируют в указанном водном растворе не более чем 72 ч, например не более чем 60 ч, например не более чем 48 ч. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления зерна ячменя инкубируют в указанном водном растворе в течение от 20 до 72 ч, например в течение от 20 до 60 ч, например от 20 до 48 ч, например, в диапазоне от 20 до 30 ч, например в диапазоне от 22 до 26 ч.

Может быть предпочтительным, чтобы зерна ячменя были полностью покрыты указанным водным раствором в течение всей инкубации.

Указанные ячменя зерна часто инкубируют в указанном водном растворе, в то время как через водный раствор пропускают O₂. Указанный O₂ может быть добавлен к указанному водному раствору в виде чистого O₂. Однако, часто указанный O₂ содержится в газовой смеси. В одном варианте осуществления указанный O₂ содержится в атмосферном воздухе.

Обычно, по меньшей мере 2 л, предпочтительно, по меньшей мере 3 л, более предпочтительно по меньшей мере 4 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 5 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 л O₂ проходят через указанный водный раствор на кг зерна ячменя в час. Масса указанных зерен ячменя представляет собой массу сухого вещества. Например, в диапазоне от 2 до 100 л, например в диапазоне от 2 до 75 л, например в диапазоне от 2 до 50 л, например в диапазоне от 4 до 100 л, например в диапазоне от 4 до 75 л, например в диапазоне от 4 до 50 л, например в диапазоне от 6 до 100 л, например в диапазоне от 6 до 75 л, например в диапазоне от 6 до 50 л O₂ проходит через указанную смесь водный раствор/зерна ячменя на кг зерен ячменя (масса сухого вещества) в час.

Как отмечалось выше, часто атмосферный воздух пропускается через водный раствор. Таким образом, способ может включать пропускание по меньшей мере 10 л, предпочтительно по меньшей мере 15 л, более предпочтительно по меньшей мере 20 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 25 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 30 л атмосферного воздуха через указанный водный раствор на кг зерен ячменя в час. Масса указанных зерен ячменя представляет собой массу сухого вещества. Например, в диапазоне от 10 до 500 л, например в диапазоне от 10 до 375 л, например в диапазоне от 10 до 250 л, например в диапазоне от 20 до 500 л, например в диапазоне от 20 до 375 л, например в диапазоне от 20 до 250 л, например в диапазоне от 30 до 500 л, например в диапазоне от 30 до 375 л, например в диапазоне от 30 до 250 л, атмосферного воздуха пропускается через указанный водный раствор на кг зерен ячменя (масса сухого вещества) в час.

В некоторых вариантах осуществления стадия проращивания включает

- a) по меньшей мере одну стадию инкубации указанных ядер в водном растворе, где по меньшей мере 2 л O₂ на кг массы сухого вещества ядер ячменя пропускают через указанный водный раствор в час; и
- b) по меньшей мере одну стадию инкубации указанных ядер ячменя на воздухе.

В некоторых вариантах осуществления после инкубации зерен ячменя в указанном водном растворе

содержание воды в ячмене составляет по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 30%, например в диапазоне от 30 до 60%, например в диапазоне от 30 до 50%, например в диапазоне от 30 до 60%, например в диапазоне от 30 до 50%.

Во время указанной стадии инкубации указанных зерен ячменя на воздухе, через указанные ядра ячменя в час можно пропускать по меньшей мере 2 л O_2 на кг массы сухого вещества ячменя. Например, во время инкубации на воздухе через ядра ячменя может быть пропущено такое же количество O_2 , что и во время инкубации в указанном водном растворе, как описано выше.

Пророщенные ядра ячменя, полученные данным способом, также называются в данном документе зеленым солодом.

Содержание воды в зернах ячменя может быть определено путем определения массы зерен ячменя с последующей сушкой указанных зерен ячменя и определения массы высушенных зерен ячменя. Разница в массе влажных и сухих зерен ячменя считается водой, и содержание воды представлено как масса воды, деленная на общую массу зерен ячменя (влажных зерен ячменя). Содержание воды в %, таким образом, является % мас./мас. (по массе).

Зерно ячменя можно инкубировать при любой применимой температуре, однако, может быть предпочтительным, чтобы инкубация проводилась при температуре, достаточно высокой, чтобы обеспечить быстрое увеличение содержания воды.

В частности, в вариантах осуществления изобретения, в которых зерна ячменя инкубируют при температуре в диапазоне от 20 до 30°C, тогда указанные зерна ячменя можно инкубировать в течение от 20 до 48 ч.

Проращивание зерен также может быть выполнено любым обычным способом, известным специалисту в данной области техники. Один неограничивающий пример включает проращивание при температуре в диапазоне от 10 до 25°C, необязательно с изменением температуры в диапазоне от 1 до 4 дней.

Как упомянуто выше в некоторых вариантах осуществления изобретения, пророщенные зерна ячменя (т.е. зеленый солод) могут быть высушены в печи. В некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы зеленый солод не сушился в печи. В частности, предпочтительно, что когда зеленый солод получают путем проращивания, включающего стадию инкубации указанных зерен ячменя в водном растворе при аэрировании, тогда зеленый солод не сушат в печи.

Если зеленый солод сушат в печи, это может быть сделано при обычных температурах, таких как, по меньшей мере 75°C, например, в диапазоне от 80 до 90°C, например, в диапазоне от 80 до 85°C. Таким образом, солод, например, может быть получен любым из способов, описанных Hough et al. (1982). Однако, любой другой подходящий способ получения солода также может быть использован с настоящим изобретением, такой как способы производства специального солода, включая, но не ограничиваясь ими, способы обжаривания солода.

Высушенный в печи солод и зеленый солод могут быть дополнительно обработаны, например, путем измельчения. Таким образом, растительный продукт согласно изобретению может представлять собой любой вид солода, такой как необработанный солод или измельченный солод, такой как мука. Таким образом, растительный продукт может представлять собой, например, измельченный, высушенный в печи солод или измельченный зеленый солод. Измельченный солод и его мука содержат химические компоненты солода и мертвых клеток, которые не обладают способностью повторно прорасти.

В некоторых вариантах осуществления ячмень представляет собой шелушенный ячмень, и способ включает стадию удаления, по меньшей мере, части указанной оболочки перед инкубацией указанных ядер в водном растворе. Шелушенные зерна злаков можно обработать, чтобы удалить оболочку, подвергнув зерна злаков физической обработке, удаляющей оболочку. Указанная физическая обработка может быть выбрана, например, из группы, состоящей из полировки, шлифования, шелушения и разглаживания. Предпочтительно, физическая обработка приводит к потере оболочки. Потеря оболочки может быть определена как общая потеря массы. Таким образом, физическая обработка предпочтительно приводит к потере в диапазоне от 1 до 4%, например, к потере в диапазоне от 1,5 до 3,0% от общей массы зерновых культур.

Водный экстракт и способы его получения.

Изобретение обеспечивает напитки на основе ячменя, а также способы приготовления напитков на основе ячменя, где растение ячменя или его потомство несет мутацию в гене CsIF6. Изобретение также обеспечивает водные экстракты ядер растений ячменя, несущие мутацию в гене CsIF6. Указанный водный экстракт может, например, быть приготовлен из зеленого солода или высушенного в печи солода.

Часто способы приготовления напитка включают стадию приготовления водного экстракта зерен растений ячменя по изобретению и/или солода, полученного из растений ячменя по изобретению.

Водный экстракт, как правило, может быть приготовлен путем инкубации ячменной муки, муки из зеленого солода и/или муки из высушенного в печи солода в воде или в водном растворе. Упомянутый водный раствор также упоминается как "раствор для затириания" в данном документе. В частности, водный экстракт может быть приготовлен путем затириания.

Настоящее изобретение также относится к способу получения водного экстракта, причем указанный способ включает следующие стадии:

a) получение ядер растения ячменя, где указанное растение ячменя имеет пониженное содержание (1,3;1,4)-β-глюканов и несет мутацию в гене CsIF6, как описано в данном документе;

b) подвергание ядер ячменя стадии проращивания, получая при этом пророщенные ядра, причем указанная стадия проращивания включает инкубацию указанных ядер в водном растворе не более чем 72 ч;

c) мелкое раздробление указанных пророщенных зерен, тогда как указанные пророщенные ядра имеют содержание воды по меньшей мере 20%, при условии, что указанные ядра ячменя не имеют содержания воды ниже 20 в любое время между стадиями b) и c);

d) приготовление водного экстракта указанных измельченных пророщенных ядер, тем самым получая водный экстракт ячменя.

Стадия проращивания подробно описана в приведенном выше разделе "Зеленый солод, высушенный в печи солод и способ их производства".

Как правило, указанный раствор для затириания может представлять собой воду, такую как водопроводная вода, в которую может быть добавлено одно или несколько добавочных компонентов. Добавочные компоненты могут присутствовать в водном растворе с самого начала или они могут добавляться в процессе приготовления водного экстракта. Указанные добавочные компоненты могут быть ферментами. Таким образом, раствор для затириания может содержать один или несколько ферментов. Указанные ферменты могут быть добавлены в водный раствор с самого начала или впоследствии во время процесса.

Указанные ферменты могут, например, представлять собой один или несколько гидролитических ферментов. Подходящие ферменты включают липазы, ферменты, разлагающие крахмал (например, амилазы), глюканазы [предпочтительно (1-4)- и/или (1,3;1,4)-β-глюканазы], и/или ксиланазы (такие как арабиноксиланазы), 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 α-амилазы, β-амилазы, предельной декстриназы, пуллулазы, β-глюканазы (например эндо-(1,3;1,4)-β-глюканазы или эндо-1,4-β-глюканазы), ксиланазы (например, эндо- или экзо-1,4-ксиланазы, арабинофуранозидазы или эстеразы феруловой кислоты), глюкоамилазы и протеазы.

В одном варианте осуществления к указанному раствору для затириания β-глюканаза не добавляется или добавляется только в ограниченном количестве.

Указанные добавочные компоненты, предпочтительно пищевого качества, также могут представлять собой соль, например CaCl₂, или кислоту, например H₃PO₄.

Водный экстракт обычно готовят инкубацией ячменной муки, муки из зеленого солода и/или муки из высушенного в печи солода в растворе для затириания при одной или нескольких заранее заданных температурах. Указанная заданная температура также может упоминаться в данном документе как "температура затириания". Указанные температуры затириания могут быть, например, обычными температурами, используемыми для затириания. Температура затириания, как правило, либо поддерживается постоянной (изотермическое затириание), либо постепенно увеличивается, например, повышается последовательно. В любом случае растворимые вещества в зернах ячменя и/или солоде высвобождаются в указанный раствор для затириания, образуя водный экстракт.

Температура(ы) затириания обычно представляют собой температуру(ы) в диапазоне от 30 до 90°C, например, в диапазоне от 40 до 85°C, например в диапазоне от 50 до 85°C. Температуры затириания могут быть выбраны в соответствии с используемым типом ячменя. В частности, может использоваться относительно низкая температура затириания, например, температура в диапазоне от 50 до 60°C. Часто инкубация в растворе для затириания включает заключительную стадию нагревания до более высокой температуры, например до температуры в диапазоне от 75 до 80°C.

После инкубации в водном растворе, например, в сосуде для затириания, водный раствор может быть перенесен в другой контейнер, например в фильтрационный чан, и выдержан в течение дополнительного времени при повышенной температуре.

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

Затириание (т.е. инкубация ячменной муки, муки из зеленого солода и/или муки из высушенного в печи солода в растворе для затириания) может происходить в присутствии добавок, которые, как считается, включают любой источник углеводов, кроме солода или пророщенных зерен ячменя, таких как, но не ограничиваясь ими, ячмень, ячменные сиропы или кукуруза или рис - или как целые зерна, или в виде обработанных продуктов, таких как крупы, сиропы или крахмал. Все вышеупомянутые добавки могут использоваться, главным образом, в качестве дополнительного источника экстракта (сиропы обычно дозируют во время нагревания сусла). Требования к обработке добавки на пивоваренном заводе зависят от состояния и типа используемой добавки.

После инкубации в растворе для затириания водный экстракт обычно может быть разделен, например, путем фильтрации на водный экстракт и остаточные нерастворенные твердые частицы, последние также обозначены как "отработанное зерно". Фильтрация может выполняться, например, в фильтрационном чане. В качестве альтернативы, фильтрация может представлять собой фильтрацию через затворный

фильтр. Полученный таким образом водный экстракт также может быть обозначен как "первое сусло". Дополнительная жидкость, такая как вода, может быть добавлена к отработанным зернам во время процесса, также обозначенного как барботирование. После барботирования и фильтрации можно получить "второе сусло". Дальнейшее сусло может быть приготовлено путем повторения процедуры. Таким образом, водный экстракт может представлять собой сусло, например, первое сусло, второе сусло, дополнительное сусло или их комбинацию.

Способ приготовления водного экстракта в одном варианте осуществления может быть выполнен с использованием любого из устройств, описанных в международной заявке на патент PCT/EP2017/065498, например, любого из устройств, описанных в ней на с. 20-22. Неограничивающий пример применимого устройства представлен в данном документе на фиг. 4.

Неполностью деградированные (1,3;1,4)-β-глюканы могут быть особенно неприятными для пивоваров, потому что они могут быть извлечены из солода в растворимых формах, которые образуют высоковязкие водные растворы, которые замедляют процессы фильтрации на пивоваренном заводе. Интересно, что растения ячменя по изобретению имеют низкий уровень (1,3;1,4)-β-глюканов, и, таким образом, сусло, приготовленное из таких растений ячменя, обычно имеет низкую вязкость. В одном варианте осуществления изобретения относится к суслу, полученному из растения ячменя, несущего мутацию в гене CsIF6, причем указанное сусло имеет более низкую вязкость по сравнению с суслом, полученным из растения ячменя, несущего ген CsIF6 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип растения ячменя, раскрытого в данном документе. Указанное сусло обычно получают экстракцией зерен ячменя и/или солода.

В одном варианте осуществления изобретение относится к суслу, где указанное сусло получают из растения ячменя, несущего любую из мутаций в гене CsIF6, описанном в данном документе, где указанное сусло имеет вязкость в диапазоне от 0,5 до 1,0 мПа·с ниже, например, в диапазоне от 0,5 до 0,8 мПа·с ниже, чем вязкость сусла, полученного таким же образом из растения ячменя, несущего ген CsIF6 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип. В одном варианте осуществления изобретение относится к суслу, в котором указанное сусло получают из растения ячменя, несущего любую из мутаций в гене CsIF6, описанном в данном документе, и указанное сусло имеет вязкость в диапазоне от 1,7 до 2,5 мПа·с, такую как в диапазоне от 1,8 до 2,5 мПа·с, например, от 2,0 до 2,5 мПа·с, такую как от 2,1 до 2,5 мПа·с, например, от 1,8 до 2,2 мПа·с, такую как около 2 мПа·с, например, около 2,1 мПа·с, такую как около 2,2 мПа·с. В частности, растение ячменя может нести мутированный ген HvCsIF6, кодирующий мутантный белок HvCsIF6, содержащий мутацию (например, Gly→Asp) аминокислоты 748 в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления изобретение относится к суслу, где указанное сусло получают из солода, полученного из растения ячменя, несущего любую из мутаций в гене CsIF6, описанном в данном документе, где указанное сусло имеет вязкость не более чем 2,2 мПа·с.

Вязкость сусла, приготовленного из стандартного солода, приготовленного путем замачивания в течение от 1 до 2 дней и проращивания в течение от 5 до 7 дней с последующей печной сушкой, составляет около 2 мПа·с.

Напиток и способ его производства.

Настоящее изобретение также относится к напиткам на основе ячменя и способам производства таких напитков, где растение ячменя или его потомство имеет пониженный уровень (1,3;1,4)-β-глюканов и несет мутацию в гене CsIF6. Изобретение также относится к напиткам на основе ячменя, приготовленным из растений ячменя, несущих мутацию в гене CsIF6, или их потомства.

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, Bière 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, Kölsch, Lambic, Light ale, Maibock, Malt liquor, Mild, Märzenbier, Old ale, Oud bruin, Pale ale, Pilsener, Porter, Red ale, Roggenbier, Saison, Scotch ale, Steam beer, Stout, Schwarzbier, lager, Witbier, Weissbier и Weizenbock.

Указанный дистиллированный спирт может представлять собой любой дистиллированный спирт. В частности, дистиллированный спирт может быть на основе ячменя, например, ячменного солода. Неограничивающие примеры такого дистиллированного спирта включают виски и водку.

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

Напиток может, например, быть приготовлен способом, включающим стадии:

(i) обеспечения ядер растения ячменя по изобретению и/или зеленого солода и/или высушенного в

печи солода, приготовленного из ядер растения ячменя по изобретению;

(ii) приготовления водного экстракта из указанных ядер и/или указанного солода, например, как описано в данном документе выше в разделе, посвященном приготовлению водного экстракта;

(iii) переработки указанного водного экстракта в напиток.

Водный экстракт можно кипятить с хмелем или без него, после чего его можно назвать вареным суслом. Первое, второе и дополнительные сусла могут быть объединены, а затем подвергнуты кипячению. Водный экстракт можно кипятить в течение любого подходящего периода времени, например, в диапазоне от 60 до 120 мин.

Стадия (iii) может содержать

a) нагревание указанного водного экстракта необязательно в присутствии хмеля или экстракта хмеля;

b) охлаждение водного экстракта;

c) сбраживание указанного водного экстракта с дрожжами с получением ферментированного напитка.

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

После приготовления водного экстракта его можно перерабатывать в пиво любым способом, включая обычные способы пивоварения. Неограниченные описания примеров подходящих способов пивоварения можно найти, например, в публикациях Hough et al. (1982). Доступны многочисленные, регулярно обновляемые способы анализа продуктов из ячменя и пива, например, но не ограничиваясь ими, Американская ассоциация химиков-зерновиков (American Association of Cereal Chemists) (1995), Американское общество солодованных химиков (American Society of Brewing Chemists) (1992), Европейская конвенция о солодовании (European Brewery Convention) (1998) и Институт солодования (Institute of Brewing) (1997). Признано, что для определенной пивоварни используется много специфических процедур, причем наиболее значительные различия касаются предпочтений местного потребителя. Любой такой способ производства пива может быть использован с настоящим изобретением.

Первая стадия производства пива из водного экстракта предпочтительно включает кипячение указанного водного экстракта, как описано в данном документе выше, с последующей фазой охлаждения и, необязательно, вихревой ванны. Одно или несколько добавочных соединений могут быть добавлены к водному экстракту, например, одно или несколько добавочных соединений, описанных ниже в разделе "Добавочные соединения". После охлаждения водный экстракт можно перенести в бродильные чаны, содержащие дрожжи, например, пивные дрожжи, такие как *S. pastorianus* или *S. cerevisiae*. Водный экстракт может быть подвергнут сбраживанию в течение любого подходящего периода времени, обычно в диапазоне от 1 до 20 дней, например от 1 до 10 дней. Сбраживание проводят при любой применимой температуре, например, при температуре в диапазоне от 10 до 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. Неограничивающими примерами пролин-специфической эндопротеазы является "Brewer's Clarex", доступная от DSM. В других вариантах осуществления экзогенные ферменты не добавляют во время проведения способов.

Во время процесса сбраживания продолжительностью в несколько дней сахар превращается в спирт и CO₂ одновременно с образованием некоторых ароматических веществ. Сбраживание может быть прекращено в любое желаемое время, например, если не наблюдается дальнейшего снижения % Р.

Впоследствии пиво может быть дополнительно переработано, например, охлаждено. Оно также может быть отфильтровано и/или выдержано (lagered) - процесс, при котором приобретает приятный аромат и уменьшается привкус дрожжей. Также могут быть добавлены добавки. Кроме того, может быть добавлен CO₂. Наконец, пиво может быть пастеризовано и/или отфильтровано перед упаковкой (например, перенесено в контейнеры или кеги, разлито в бутылки или консервировано). Пиво также можно пастеризовать стандартными способами.

Добавочные соединения.

Способы по изобретению могут включать стадию добавления одного или нескольких добавочных соединений. Указанные добавочные соединения могут, например, представлять собой ароматизирующее соединение, консервант, функциональный ингредиент, краситель, подсластитель, средство, регулирующее рН, или соль. Средство, регулирующее рН, может, например, представлять собой буфер или кислоту, такую как фосфорная кислота.

Функциональными ингредиентами может быть любой ингредиент, добавленный для достижения заданной функции. Предпочтительно функциональный ингредиент делает напиток более здоровым. Неограничивающие примеры функциональных ингредиентов включают витамины или минералы.

Консервант может представлять собой любым пищевой консервант, например, он может представлять собой бензойную кислоту, сорбиновую кислоту, сорбаты (например, сорбат калия), сульфиты и/или их соли.

Добавочное соединение также может представлять собой CO₂. В частности, CO₂ может быть добав-

лен для получения газированного напитка.

Вкусовое соединение, используемое в настоящем изобретении, может представлять собой любое применимое вкусовое соединение. Вкусовое соединение может быть выбрано, например, из группы, состоящей из ароматических добавок, растительных экстрактов, растительных концентратов, частей растения и настоев из трав. В частности, вкусовые соединения могут быть хмелем.

Способ получения растения ячменя с мутацией в CsIF6.

Растения ячменя, несущие мутацию в CsIF6, например, любую из специфических мутаций, описанных в данном документе, могут быть получены любым применимым способом.

Например, такие растения ячменя могут быть получены способом, включающим стадии подвергания множества растений ячменя или ядер ячменя случайному мутагенезу, например, облучением или химической обработкой, например обработкой азидом натрия; идентификации растений ячменя или ядер ячменя, несущих мутацию в CsIF6.

Такие способы могут также включать одну или несколько стадий воспроизводства указанных растений ячменя/ядер ячменя для того, чтобы получить множество растений ячменя/ядер ячменя, каждое из которых несет случайные мутации.

В частности, растения ячменя, несущие определенную мутацию в CsIF6, могут быть получены и идентифицированы, по существу, как описано в международной патентной заявке PCT/EP2017/065516, с использованием праймеров и зондов, предназначенных для идентификации мутации в гене CsIF6. Примеры праймеров и зондов, применимых для идентификации растения ячменя, несущего мутацию в гене CsIF6, в результате чего указанный ген кодирует мутантный белок CsIF6, несущий одну из мутаций G847E или G748D, представлены в табл. 2. Специалисты на основе общих знаний и/или руководства, предоставленного в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки, смогут разработать приемлемые праймеры и зонды для идентификации других мутантов.

Растения ячменя, несущие мутацию в гене CsIF6, также могут быть получены с использованием различных способов сайт-направленного мутагенеза, которые, например, могут быть сконструированы на основе последовательности гена CsIF6, представленной в настоящем документе. В одном варианте осуществления изобретения растение ячменя получают с использованием любого из CRISPR, TALEN, цинкового пальца, мегануклеазы и ДНК-разрезающего (DNA-cutting) антибиотика, как описано в WO 2017/138986. В одном варианте осуществления растение ячменя получают с использованием технологии CRISPR/cas9, например, с использованием РНК-Направляющей нуклеазы Cas9. Это может быть сделано, как описано в Lawrenson et al., *Genome Biology* (2015), 16:258, DOI: 10.1186/s13059-015-0826-7, за исключением того, что последовательность одиночной направляющей РНК сконструирована на основе обеспеченных в данном документе последовательностей генов. В одном варианте осуществления изобретения растение ячменя получают, используя комбинацию обоих способов TALEN и CRISPR/cas9, например, с помощью РНК-направляющей нуклеазы Cas9. Это может быть сделано, как описано в Holme et al., *Plant Mol. Biol.* (2017), 95:111-121, DOI: 10.1007/s11103-017-0640-6 за исключением того, что TALEN и последовательность одиночной направляющей РНК сконструированы на основе последовательностей генов, обеспеченных в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретения зерновое растение получают с использованием направляемой гомологией репарации, комбинации ДНК-разрезающей нуклеазы и фрагмента донорной ДНК. Это может быть сделано, как описано в Sun et al., *Molecular Plant* (2016), 9:628-631, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.001> за исключением того, что ДНК-разрезающая нуклеаза разработана на основе обеспеченных в данном документе последовательностей генов и фрагмент донорной ДНК разработан на основе кодирующей последовательности варианта мутировавшего злака, обеспеченной в данном документе.

В одном варианте осуществления изобретения цель состоит в том, чтобы обеспечить агрономически применимые растения ячменя, несущие мутацию в гене CsIF6. В дополнение к мутации в гене CsIF6 существуют и другие факторы, которые также могут учитываться при создании коммерческого сорта ячменя, применимого для солодования и/или пивоварения и/или в качестве основы для напитков, например, урожай и размер ядра, и другие параметры, которые относятся к производительности солодования или производительности пивоварения. Поскольку многие, если не все, соответствующие признаки, как было показано, находятся под генетическим контролем, настоящее изобретение также относится к современным, гомозиготным, высокоурожайным сортам для солодования, которые могут быть получены от скрещивания с растениями ячменя, которые раскрыты в настоящей публикации. Специалист-селекционер, занимающийся выведением ячменя, сможет отбирать и выращивать растения ячменя, которые после скрещивания с другими растениями ячменя приведут к превосходящим по качеству сортам. Альтернативно, селекционер может использовать растения по настоящему изобретению для дальнейшего мутагенеза с целью получения новых сортов, несущих дополнительные мутации в дополнение к мутации гена CsIF6.

Изобретение также включает растения ячменя, несущие мутацию в гене CsIF6, полученные способом селекции растений, включая способы самоопыления, обратного скрещивания, скрещивания с попу-

лящими и т.п. Способы обратного скрещивания могут быть использованы с настоящим изобретением для введения в другой сорт мутации гена CsIF6.

В одном варианте осуществления изобретение относится к потомству растения ячменя, депонированному 12-11-2018 г. в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43273 и именуемому "мутант 2". Указанное потомство может быть получено любым применимым способом, включая, но не ограничиваясь ими, самоопыление, возвратное скрещивание или скрещивание с другими популяциями. В частности, указанное потомство может также нести G→A мутацию нуклеотида 2243 в кодирующей последовательности гена HvCsIF6 (SEQ ID NO: 2).

Способ ускорения процесса селекции растений заключается в первоначальном размножении генерируемых мутантов путем применения способов культивирования тканей и регенерации. Таким образом, другой аспект настоящего изобретения заключается в создании клеток, которые при росте и дифференцировке продуцируют растения ячменя, несущие мутацию гена CsIF6. Например, селекция может включать традиционные скрещивания, подготовку плодородных растений, полученных из пыльников, или использование культуры микроспор.

В одном варианте осуществления растение ячменя по изобретению не было получено исключительно при помощи по существу биологического способа. Потомство растения ячменя, полученное с помощью технического способа, рассматривается в данном документе как не исключительно полученное при помощи по существу биологического способа, поскольку исходное растение получают техническим способом.

В одном варианте осуществления растение ячменя несет мутацию в гене CsIF6, где указанная мутация индуцирована химическими и/или физическими средствами.

В одном варианте осуществления растение ячменя было получено способом, включающим стадию индуцированного мутагенеза, или указанное растение является потомством растения, полученного способом, включающим стадию индуцированного мутагенеза. Таким образом, растение ячменя может представлять собой растение ячменя, полученное способом, включающим следующие стадии, или потомство растения, полученное способом, включающим следующую стадию: мутагенез растения ячменя или их части, например, с помощью химического мутагенизирующего агента, такого как NaN₃.

Отбор растений ячменя, несущих одну из вышеупомянутых мутаций в гене CsIF6.

В одном варианте осуществления указанная мутация гена CsIF6 приводит в результате к мутантному гену CsIF6, кодирующему мутантный полипептид CsIF6, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 847 на заряженную аминокислоту, например, на глутаминовую кислоту. В частности, указанный мутантный ген CsIF6 может нести G→A мутацию нуклеотида 2243 в кодирующей последовательности гена HvCsIF6 (SEQ ID NO:2).

Пункты.

Изобретение может быть дополнительно определено следующими пунктами.

1. Растение ячменя или его часть, где ядра указанного растения ячменя имеют пониженное содержание (1,3;1,4)-β-глюканов, и где указанное растение ячменя несет мутацию в гене CsIF6, где указанный мутированный ген CsIF6 кодирует мутантный полипептид CsIF6, где указанный мутантный CsIF6 представляет собой CsIF6 последовательности SEQ ID NO: 1 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену одной аминокислоты в локализованном в мембране домене в CsIF6, где указанная замена представляет собой замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту или замещение полярной аминокислоты на неполярную аминокислоту, где локализованные в мембране домены CsIF6 состоят из аминокислот от 109 до 128, от 137 до 158, от 700 до 731, от 741 до 758, от 835 до 857 и от 864 до 882 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

2. Растение ячменя или его часть, где ядра указанного растения ячменя имеют пониженное содержание (1,3;1,4)-β-глюканов и где указанное растение ячменя несет мутацию в гене CsIF6, где указанный мутированный ген CsIF6 кодирует мутантный полипептид CsIF6, где указанный мутантный CsIF6 представляет собой CsIF6 последовательности SEQ ID NO: 1 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит одну замену аминокислоты в локализованном в мембране домене в CsIF6, где указанная замена представляет собой замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту или замещение полярной аминокислоты на неполярную аминокислоту, где локализованный в мембране домен выбран из группы, состоящей из локализованных в мембране доменов CsIF6, состоящих из аминокислот от 835 до 857 или аминокислот от 700 до 731 или аминокислот от 741 до 775 в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3.

3. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где указанное растение ячменя имеет содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в диапазоне от 1 до 5% общей массы сухого вещества ядер, например, от 1,3 до 3% общей массы сухого вещества ядер, предпочтительно от 1,3 до 2% общей массы сухого вещества ядер.

4. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где ядра указанного растения ячменя имеют содержание (1,3;1,4)-β-глюканов, составляющее по меньшей мере 30% и не более чем 60%, предпочтительно не менее 40% и не более чем 60% от содержания (1,3;1,4)-β-глюканов растения ячменя, не-

сущего ген CsIF6 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

5. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где ядра указанного растения ячменя имеют содержание (1,3;1,4)-β-глюканов, составляющее по меньшей мере 30% и не более чем 60%, предпочтительно по меньшей мере 40% и не более чем 60% от содержания (1,3;1,4)-β-глюканов растения ячменя, несущего ген CsIF6 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

6. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит зерна с частотой битых зерен после обмолота, которая не более чем в 3 раза превышает частоту битых зерен после обмолота зерен растения ячменя, не несущего мутацию в гене CsIF6a, но в остальном имеющего тот же генотип.

7. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где растение ячменя содержит зерна с частотой битых зерен после обмолота, которая не более чем в 2 раза превышает частоту битых зерен после обмолота зерен растения ячменя, не несущего мутацию в гене CsIF6a, но в остальном имеющего тот же генотип.

8. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где замена представляет собой замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту.

9. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену одной аминокислоты в трансмембранном домене, состоящем из аминокислот от 835 до 857 в CsIF6, где указанная замена представляет собой замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту.

10. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 847 на заряженную аминокислоту.

11. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 847, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) на глутаминовую кислоту (E).

12. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене CsIF6, где указанный мутированный ген CsIF6 кодирует мутантный полипептид CsIF6 последовательности SEQ ID NO: 27.

13. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где указанное растение ячменя несет G→A мутацию нуклеотида 2243 в кодирующей последовательности гена HvCsIF6.

14. Растение ячменя по п.13, где кодирующая последовательность гена HvCsIF6 представляет собой SEQ ID NO:2.

15. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где растение ячменя представляет собой мутант 2, депонированный в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43273, или его потомство.

16. Растение ячменя или его потомство или его части, где геном указанного растения содержит ген CsIF6 растения ячменя мутант 2, депонированного в NCIMB под регистрационным номером NCIMB 43273.

17. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где ядра указанного растения ячменя имеют содержание β-глюканов в диапазоне от 1,7 до 5,0% общей массы сухого вещества ядер.

18. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где ядра указанного растения ячменя имеют соотношение DP3:DP4 не более чем 2,5, например не более чем 2,1, например, в диапазоне от 1,0 до 2,1.

19. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену одной аминокислоты в трансмембранном домене, состоящем из аминокислот от 741 до 758 в CsIF6, где указанная замена представляет собой замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту.

20. Растение ячменя по любому из пп.1-8 и п.19, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 748 на заряженную аминокислоту.

21. Растение ячменя по любому из пп.1-8 и 19, 20, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 748, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) на аспарагиновую кислоту (D).

22. Растение ячменя по любому из пп.1-8 и 19-21, где ядра указанного растения ячменя имеют содержание β-глюканов в диапазоне от 1,7 до 3% общей массы сухого вещества ядер.

23. Растение ячменя по любому из пп.1-8 и 19-22, где ядра указанного растения ячменя имеют соотношение DP3:DP4 в диапазоне от 2,5 до 4.

24. Растение ячменя по любому из пп.1-8, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представля-

ет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену одной аминокислоты в трансмембранном домене, состоящем из аминокислот от 700 до 731 из CsIF6, где указанная замена представляет собой замещение полярной аминокислоты на неполярную аминокислоту.

25. Растение ячменя по любому из пп.1-8 и 24, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену одной аминокислоты в локализованном в мембране домене, состоящем из аминокислот от 700 до 711 из CsIF6, где указанная замена представляет собой замещение полярной аминокислоты на неполярную аминокислоту.

26. Растение ячменя по любому из пп.1-8 и 24, 25, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 709 на неполярную аминокислоту.

27. Растение ячменя по любому из пп.1-8 и 24-26, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 709, где указанная замена представляет собой замещение треонина (Т) на изолейцин (I).

28. Растение ячменя по любому из пп.1-8 и 24-27, где ядра указанного растения ячменя имеют содержание β -глюканов в диапазоне от 1,3 до 3% общей массы сухого вещества ядер.

29. Растение ячменя по любому из пп.1-8 и 24-28, где ядра указанного растения ячменя имеют соотношение DP3:DP4, составляющее по меньшей мере 3,5, такое как по меньшей мере 4,0, например, по меньшей мере 4,5, такое как в диапазоне от 4 до 6.

30. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов или его потомство, где указанное растение ячменя не было получено исключительно биологическим способом.

31. Растение ячменя по любому из предшествующих пунктов или его потомство, где растение ячменя получено способом, включающим следующие стадии: мутагенез растений ячменя или их частей, например, с помощью химического мутагенизирующего агента отбор растений ячменя, несущих любую из вышеупомянутых мутаций в гене CsIF6.

32. Растительный продукт, содержащий растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, или его часть.

33. Растительный продукт по п.32, где растительный продукт представляет собой зеленый солод или высушенный в печи солод, полученные из ядер указанного растения ячменя.

34. Растительный продукт по п.32, где растительный продукт представляет собой сусло, приготовленное из ядер указанного растения ячменя и/или из зеленого солода или высушенного в печи солода, содержащее обработанное ядро(а) указанного растения ячменя.

35. Растительный продукт по любому из пп.32-34, где растительный продукт представляет собой сусло и где указанное сусло имеет вязкость не более чем 2,5 мПа·с, предпочтительно не более чем 2,2 мПа·с.

36. Растительный продукт по п.32, где растительный продукт представляет собой напиток, приготовленный из указанного растения ячменя его частей.

37. Напиток по п.32, где указанный напиток получают из зерен указанного растения ячменя и/или из солода, содержащего обработанное ядро(а) указанного растения ячменя.

38. Напиток по любому из пп.36, 37, где напиток представляет собой пиво.

39. Способ приготовления зеленого солода, причем указанный способ включает стадии

a) обеспечения ядер растения ячменя по любому из пп.1-31;

b) замачивания указанных ядер;

c) проращивания замоченных ядер в заданных условиях.

40. Способ приготовления высушенного в печи солода, причем указанный способ включает стадии

a) обеспечения ядер растения ячменя по любому из пп.1-31;

b) замачивания указанных ядер;

c) проращивания замоченных ядер в заданных условиях;

d) сушки указанных пророщенных ядер.

41. Способ производства напитка, причем указанный способ включает стадии

a) Обеспечения ядер растения ячменя по любому из пп.1-31 и/или солода в соответствии с п.33;

b) Приготовления водного экстракта указанных ядер и/или указанного солода;

c) обработки указанного водного экстракта в напиток.

42. Способ получения водного экстракта, причем указанный способ включает стадии

a) обеспечения ядер растения ячменя по любому из пп.1-31;

b) подвергания ядер ячменя стадии проращивания, получая при этом пророщенные ядра, причем указанная стадия проращивания включает инкубацию указанных ядер в водном растворе в течение не более чем 72 ч;

c) мелкого раздробления указанных пророщенных ядер, тогда как указанные пророщенные ядра

имеют содержание воды, составляющее по меньшей мере 20%, при условии, что указанные ядра ячменя не имеют содержания воды ниже 20% в любое время между стадиями b) и c);

d) приготовления водного экстракта указанных измельченных пророщенных ядер, тем самым получая водный экстракт ячменя.

43. Способ получения водного экстракта, причем указанный способ включает стадии:

a) обеспечения ядер растения ячменя по любому из пп.1-31;

b) подвергания ядер ячменя стадии проращивания, получая при этом пророщенные ядра, причем указанная стадия проращивания включает инкубацию указанных ядер в водном растворе в течение не более чем 72 ч;

c) мелкого раздробления указанных пророщенных зерен, тогда как указанные пророщенные ядра имеют содержание воды, составляющее по меньшей мере 20%, при условии, что указанные ядра ячменя не имеют содержания воды ниже 20% в любое время после проращивания и до точного разделения пророщенных ядер;

d) приготовления водного экстракта указанных измельченных пророщенных ядер, тем самым получая водный экстракт ячменя.

44. Способ по любому из п.42 и 43, где стадия проращивания (b) включает инкубирование указанных ядер в водном растворе до тех пор, пока содержание воды ядер не составит по меньшей мере 30%, при этом через указанный водный раствор пропускается по меньшей мере 2 л O₂ на кг массы сухого вещества зерен ячменя в час.

45. Способ по любому из пп.42-44, где ядра ячменя погружены в водном растворе в течение всей стадии проращивания.

46. Способ по любому из пп.42-45, где стадия проращивания содержит

a) по меньшей мере одну стадию инкубации указанных ядер в водном растворе, где через указанный водный раствор пропускается по меньшей мере 2 л O₂ на кг массы сухого вещества зерен ячменя в час; и

b) по меньшей мере одну стадию инкубации указанных ядер ячменя на воздухе.

47. Способ по любому из пп.42-46, где по меньшей мере 3 л, более предпочтительно по меньшей мере 4 л, еще более предпочтительно, по меньшей мере 5 л, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 л O₂ на кг массы сухого вещества зерен ячменя пропускается через указанный водный раствор в час.

48. Способ по любому из пп.42-47, где указанный O₂ содержится в газовой смеси, причем газовая смесь представляет собой атмосферный воздух.

49. Способ по любому из пп.42-48, где вся стадия проращивания не превышает 72 ч, более предпочтительно не превышает 60 ч, еще более предпочтительно не превышает 54 ч.

50. Способ по любому из пп.42-49, где ячмень представляет собой шелушенный ячмень, и способ включает стадию удаления, по меньшей мере, части указанной оболочки перед инкубацией указанных ядер в водном растворе.

51. Способ производства напитка, причем указанный способ включает стадии

a) приготовления водного экстракта способом по любому из пп.42-50;

b) обработки указанного экстракта в напиток.

52. Способ по п.51, где стадия b) содержит стадии

a) нагревания указанного водного экстракта необязательно в присутствии хмеля или экстракта хмеля;

b) охлаждения водного экстракта;

c) сбраживания указанного водного экстракта с дрожжами с получением ферментированного напитка.

53. Способ по любому из п.51 до 52, где напиток представляет собой пиво.

54. Способ получения растения ячменя с содержанием β-глюкана в диапазоне от 1 до 5% сухой массы от общего количества ядер, причем способ включает стадии

a) обеспечения ядер ячменя; и

b) подвергания случайному мутагенезу указанных ядер ячменя, тем самым вводя мутацию в ген CsIF6, где указанный мутированный ген CsIF6 кодирует мутантный полипептид CsIF6, где указанный мутантный CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутант CsIF6 содержит замену одной аминокислоты в трансмембранном домене CsIF6, где указанная замена представляет собой замещение неполярной аминокислоты на заряженную аминокислоту или замещение полярной аминокислоты на неполярную аминокислоту, где трансмембранный домен CsIF6 состоит из аминокислот от 109 до 128, от 137 до 158, от 700 до 731, от 741 до 758, от 835 до 857 и от 864 до 882; и

c) отбора ядер ячменя или его потомства, несущих мутированный ген CsIF6.

55. Способ по п.54, где растение ячменя или мутация таковы, как определено в любом из пп.1-31.

56. Растение ячменя по любому из пп.1-31, где растение ячменя содержит мутацию в одном или нескольких дополнительных генах, например, одну или несколько из следующих мутаций:

a) мутация в гене, кодирующем LOX-1, приводящая в результате к полной потере функционального LOX-1;

- b) мутация в гене, кодирующем LOX-2, приводящая в результате к полной потере функционального LOX-2;
- c) мутация в гене, кодирующем ММТ, приводящая в результате к полной потере функционального ММТ.

Последовательности

>SEQ ID NO: 1, последовательность целлюлозосинтазаподобного CsIF6 (на основе номера GenBank NCBI: EU267181.1).

MAPAVAGGGRVRSNEPVAAPAAAAAPAASGKPCVCGFQVCACTGSAAVASAASSLDMDIVAMGQIGAVNDESWVGVE
 LGEDGETDESGAAVDDRPVFRTEKIKGVLLHPYRVLI FVRLIAFTLFVIWRI SHKNPDAMWLWVTSICGEFWFGF
 SWLLDQLPKLNPIINRVPDLAVLRQRFDRPDGTSTLPLGLDIFVTTADPIKEPILSTANSVLSILAADYPVDRNTCY
 VSDDSGMLLTYEALAESSKFATLWVFPCKRHGIEPRGPESYFELKSHPYMGRAQDEFVNDRRRVRKEYDEFKARI
 NSLEHDIKQRNDGYNAAIAHSQGVPRPTWMADGTQWEGTWVDASENHRRGDHAQIVLVLLNHPSHRRQTGPPASA
 DNPDLDSGVDVRLPMLVYVSREKRPHGDHQQKAGAMNLRASALLSNSPFI LNLD CDHYINNSQALRAGICFMV
 GRSDTVAFVQFPQRFEGVDPTDLYANHNRIFFDGTLLRALDGMQGPITYVGTGCLFRRITVYGFDP PRINVG GPCF
 PRLAGLFAKT KYEKP GLEMTTAKAKAAPVPAKKGHFLPLPKKTYGKSDAFVDTIPRASHPSPYAAAAEGIVADE
 ATIVEAVNVTAAFEKKTGWGKEIGWVYDVTVEDVVTGYRMIKGWRSRYCSIYPHAFIGTAPINLTERLFQVLR
 WSTGSLEIFFSKNNPLFGSTYLHPLQRVAYINITTYPTAI FLI FYTTVPALS FVTGHFIVQRPRTTMFYVYLGIV
 LSTLLVIAVLEVKWAGVTVFEWFRNGQFWMTASCSAYLAAVCQVLTKVI FRRDISFKLTSKLP SGDEKKDPYADL
 YVVRWTPLMITPIIIIFVNIIGSAVAFKVLGDGEWTHWLKVAGGVFFNFVWLFHLYPFAKGI LGKHGKTPVVVLV
 WWAFTFVITAVLYINI PHMHTSGGKHTTVHGHNGKLVDTGLYGLWH

>SEQ ID NO: 2, *Hordeum vulgare* целлюлозосинтазаподобный CsIF6 (CsIF6), полный cds (на основе номера GenBank NCBI: EU267181.1).

ATGGCGCCAGCGGTGGCCGGAGGGGGCCGCGTGCAGCAATGAGCCGGTTGCTGCTGCTGCCGCCGCGCCGGCG
 GCCAGCGCCAGCCCTCGCTGTGCGGCTTCCAGGTTTGCCTGTCACGGGGTGGCCCGCGGTGGCTCCGCCGCC
 TCGTCTGCTGGACATGGACATCGTGGCCATGGGGCAGATCGCGCCGCTCAACGACGAGAGCTGGGTGGCGTGGAG
 CTCGGCGAAGATGGCGAGACCGACGAAAGCGGTGCCGCGTGTGACGACCGCCCGTATTCCGCACCGAGAAGATC
 AAGGGTGTCTCTCCACCCCTACCGGGTGTGATTTTCGTTCTGCTGATCGCCTTACGCTGTTCGTGATCTGG
 CGTATCTCCCAAGAACCAGACGCGATGTGGCTGTGGGTGACATCCATCTGCGGCGAGTTCTGGTTCGGTTTC
 TCGTGGCTGCTAGATCAGCTGCCAAGCTGAACCCATCAACCGCTGCCGACCTGGCGGTGTGCGGCAGCGC
 TTCGACCGCCCGACGGCACCTCCAGCTCCCGGGCTGGACATCTTCGTACCACGGCCGACCCCATCAAGGAG
 CCCATCTCTCCACCGCAACTCGGTGCTCTCCATCTGGCCGCGACTACCCGTGGACCGCAACACATGCTAC
 GTCTCCGACGACAGTGGCATGCTGCTCACCTACGAGGCCCTGGCAGAGTCTCCAAGTTCGCCACGCTCTGGGTG
 CCCTTCTGCCGCAAGCAGCGGATCGAGCCAGGGTCCGGAGAGCTACTTCGAGCTCAAGTACACCCCTTACATG
 GGGAGAGCCAGGACGAGTTCGTCAACGACCGCCGCGCGTTCGCAAGGAGTACGACGAGTCAAGGCCAGGATC
 AACAGCCTGGAGCATGACATCAAGCAGCGCAACGACGGGTACAACGCGCCCATTGCCACAGCCAAGGCGTGCC
 CGGCCACCTGGATGGCGGACGGCACCCAGTGGGAGGGACATGGGTGACGCTCCGAGAACCACCGCAGGGGC
 GACCACCGCGGCATCGTACTGGTGTGCTGAACCCAGCCAGCCGCGGCGAGACGGGCCCGCGGAGCGCT
 GACAACCCACTGGATTGAGCGCGTGGATGTGCTCTCCCATGCTGGTGTACGTGTCCCGTGAGAAGCGCCCC
 GGGCACGACACCAGCAAGAAGGCGGTGCCATGACACGCGCTTACCCGCGCTCGGCGCTGCTTCCAATCCCC
 TTCATCTCAACCTCGACTGCGATCATTACATCAACAACCTCCAGGCCCTTCGCGCCGGCATCTGCTTCATGGT
 GGACGGGACAGCGACCGTTGCCCTTCGTCCAGTTCGCCGACGCTTCGAGGGCGTGCACCCACCGACCTCTAC
 GCCAACACAACCAGCATCTTCTCGACGGCACCTCCGTGCCCTGGACGGCATGCAGGGCCCATCTACGTGGC
 ACTGGGTGTCTCTTCGCCCGCATCACCGTCTACGGCTTCGACCCGCGAGGATCAACGTCCGCGGTCCCTGCTTC
 CCCAGGCTCGCCGGCTCTTCGCCAAGACCAAGTACGAGAAGCCCGGGCTCGAGATGACCACGGCCAAGGCCAAG
 GCCGCGCCCGTCCCGCAAGGGTAAGCACGGCTTCTTGCCTACTGCCAAGAAGACGTACGGCAAGTCGGACGCC
 TTCGTGGACACCATCCCGCGCGCTGCACCCGTGCCCTACGCCGCGCGGCTGAGGGGATCGTGGCCGACGAG
 GCGACCATCGTCGAGGCGGTGAACGTGACGGCCGCGCGTTCGAGAAGAAGACCGGCTGGGGCAAGAGATCGGC
 TGGGTGTACGACACCGTACCGGAGGACGTGGTACCGGCTACCGGATGCATATCAAGGGGTGGCGGTACGCTAC
 TGCTCCATCTACCCACACGCCTTCTCGGCACCGCCCCATCAACCTCACGGAGAGGCTCTTCCAGGTGCTCCGC
 TGGTCCACGGGATCCCTCGAGATCTTCTTCTCCAAGAACAACCGCTCTTCGGCAGCACATACTCCACCCGCTG
 CAGCGCGTCCCTACATCAACATCACCACTTACCCCTTACCAGCCATCTTCTCATCTTCTACACCACCGTGGC
 GCGCTACTCTCGTACCGGCCACTTCTATCGTGCAGCGCCGACCCACCATGTTCTACGTCTACCTGGGCGCTG
 STATCCACGCTGCTGTCATCGCCGTGCTGGAGGTCAAGTGGGCCGGGTACAGTCTTCGAGTGGTTTCAGGAAC
 GGCCAGTTCGGATGACAGCAAGTGTCTCCGCTACCTCGCCGCGTCTGCCAGGTGCTGACCAAGGTGATATTC
 CGGCGGGACATCTCCTTCAAGCTCACATCCAAGCTACCTCGGGAGACGAGAAGAAGACCCCTACGCCGACCTC
 TACGTGGTGGCTGGACGCGCTCATGATTACCCATCATCATCTTCGTCAACATCATCGGATCCGCCGTG
 GCCTTCGCCAAGGTTCTCGACGGCGAGTGGACGCACTGGTCAAGGTGCGCCGGCGGCTTCTTCAACTTCTGG
 GTGCTCTTCCACCTTACCCCTTCGCCAAGGGCATCTGGGAAGCACGGAAAGACGCCAGTCTGGTGTCTGCTC
 TGGTGGGCATTCACCTTCTCATCACCGCGTGTCTTACATCAACATCCCCACATGCATACCTCGGGAGGCAAG
 CACACAACGGTGCATGGTACCATGGCAAGAAGTGGTGCACACAGGGCTCTATGGCTGGCTCCATTGA

>SEQ ID NO: 3, последовательность целлюлозосинтазаподобного CsIF6 (содержащая полиморфизм A590T).

MAPAVAGGGRVRSNEPVAAAAAAPAASGKPCVCGFQVCACTGSAAVASAASSLDMDIVAMGQIGAVNDESWVGVE
 LGEDGETDESGAAVDDRPVFRTEKIKGVLLHPYRVLI FVRLIAFTLFVIWRI SHKNPDAMWLWVTSICGEFWFGF
 SWLLDQLPKLNPINRVPD LAVLRQRFRDPDGTSTLPLGLDIFVTTADPIKEPILSTANSVLSILAADYPVDRNTCY
 VSDDSGMLLTYEALAESSKFATLWVPFCRKHGIEPRGPESYFELKSHPYMGRAQDEFVNDRRRVRKEYDEFKARI
 NSLEHDIKQRNDGYNAAI AHSQGVPRPTWMADGTQWEGTWVDASENHRRGDHAGIVLVLLNHP SHRRQTGPPASA
 DNPLDLSGVDVRLPMLVYVSREKRPGHDHQQKAGAMNALTRASALLSNSPFILNLD CDHYINNSQALRAGICFMV
 GRSDTVA FVQFPQRFEGVDPTDLYANHNRIFFDGTLRALDGMQGP IYVGTGCLFRRI TVYGFDP PRINVG GPCF
 PRLAGLFAKTKYEKPGLEMTTAKAKAAPVPAKKGHGF LPLPKKTYGKSDAFVDTI PRASHPSPYTAAAEGIVADE
 ATIVEAVNV TAAAFEKKTGWGKEIGWVYDVTEDVVTGYRMH IKGWRSRYCSIYPHAFI GTAPINLTERLFQVLR
 WSTGSLEIFFSKNNPLFGSTYLHPLQRVAYINITTYPFTAI FLI FYTTPALS FVTGHFIVQRPTTMFYVYL GIV
 LSTLLVIAVLEVKWAGVTVFEWFRNGQFWMTASCSAYLAAVCQVLT KVI FRRDISFKLTSKLP SGDEKKDPYADL
 YVVRWTPLMITPIIIIFVNIIGSAVAFKVL DGEWTHWLK VAGGVFFNFVWLFHLYPFAKGI LGKHGKTPVVVLV
 WWAFTFVITAVLYINIPHMHTSGGKHTTVHGHGK KLVDTGLYGWLH

>SEQ ID NO: 27, Cell Wall мутант 2 (CW3a) на основе SEQ ID NO: 1, последовательность целлюлозосинтазаподобного CsIF6 (на основе номера GenBank NCBI:EU267181.1).

MAPAVAGGGRVRSNEPVAAAAAAPAASGKPCVCGFQVCACTGSAAVASAASSLDMDIVAMGQIGAVNDESWVGVE
 LGEDGETDESGAAVDDRPVFRTEKIKGVLLHPYRVLI FVRLIAFTLFVIWRI SHKNPDAMWLWVTSICGEFWFGF
 SWLLDQLPKLNPINRVPD LAVLRQRFRDPDGTSTLPLGLDIFVTTADPIKEPILSTANSVLSILAADYPVDRNTCY
 VSDDSGMLLTYEALAESSKFATLWVPFCRKHGIEPRGPESYFELKSHPYMGRAQDEFVNDRRRVRKEYDEFKARI
 NSLEHDIKQRNDGYNAAI AHSQGVPRPTWMADGTQWEGTWVDASENHRRGDHAGIVLVLLNHP SHRRQTGPPASA
 DNPLDLSGVDVRLPMLVYVSREKRPGHDHQQKAGAMNALTRASALLSNSPFILNLD CDHYINNSQALRAGICFMV
 GRSDTVA FVQFPQRFEGVDPTDLYANHNRIFFDGTLRALDGMQGP IYVGTGCLFRRI TVYGFDP PRINVG GPCF
 PRLAGLFAKTKYEKPGLEMTTAKAKAAPVPAKKGHGF LPLPKKTYGKSDAFVDTI PRASHPSPYAAAAEGIVADE
 ATIVEAVNV TAAAFEKKTGWGKEIGWVYDVTEDVVTGYRMH IKGWRSRYCSIYPHAFI GTAPINLTERLFQVLR
 WSTGSLEIFFSKNNPLFGSTYLHPLQRVAYINITTYPFTAI FLI FYTTPALS FVTGHFIVQRPTTMFYVYL D_{IV}
 LSTLLVIAVLEVKWAGVTVFEWFRNGQFWMTASCSAYLAAVCQVLT KVI FRRDISFKLTSKLP SGDEKKDPYADL
 YVVRWTPLMITPIIIIFVNIIGSAVAFKVL DGEWTHWLK VAGGVFFNFVWLFHLYPFAKGI LGKHGKTPVVVLV
 WWAFTFVITAVLYINIPHMHTSGGKHTTVHGHGK KLVDTGLYGWLH

Примеры

Пример 1.

Разработка зондов для цифровой идентификации мутантов.

Кодирующая последовательность гена HvCsIF6 с регистрационным номером AB621332 была получена из Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Данная последовательность была использована для BLAST-поиска на сайте: <http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley/>. Последовательности гена и транскрипта HvCsIF6 с регистрационным номером MLOC_57200 были отобраны с использованием: http://plants.ensembl.org/Hordeum_vulgare/. Зонды для цифровой идентификации мутантов были разработаны на основе последовательности MLOC_57200.2, кодирующей ДНК и белок.

Пример 2.

Скрининг мутантов ячменя со специфическими мутациями в гене целлюлозосинтазаподобного CsIF6.

Всего было идентифицировано 5 мутантов со специфической мутацией, ведущей к замещению аминокислотного остатка в целлюлозосинтазаподобном CsIF6 (HvCsIF6) (табл. 1).

Таблица 1

Идентифицированные мутанты

| Мутант № | Изменение нуклеотида в кодирующей последовательности (SEQ ID NO: 2) | Аминокислотное изменение в белке (SEQ ID NO: 1) |
|----------|---|---|
| Мутант 1 | G→A (2540) | Gly→Glu (847) |
| Мутант 2 | G→A (2243) | Gly→Asp (748) |
| Мутант 3 | G→A (2028) | Trp→Stop (676) |
| Мутант 4 | G→A (2195) | Gly→Asp (732) |
| Мутант 5 | C→T (2126) | Thr→Ile (709) |

Мутант 1, мутант 2, мутант 3 и мутант 4 были идентифицированы с использованием способа скрининга ddPCR по существу, как описано в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516. Более конкретно, был подготовлен пул случайно мутагенизированных зерен ячменя с последующей подготовкой упорядоченной библиотеки, как описано в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516 в WS1 и WS2 на с. 66-69, а также в примерах от 1 до 2. Мутант 1, мутант 2, мутант 3 и мутант 4 были идентифицированы и выбраны, как описано в международной патентной заявке PCT/EP2017/065516 в WS3 и WS4 на стр. 67-72, а также в примерах от 3 до 15, с использованием праймеров и зондов, указанных в табл. 2 ниже. В частности, скрининг был выполнен по существу, как описано в международной заявке на патент PCT/EP2017/065516 в WS3 и в примерах от 3 до 7, с использованием праймеров и зондов, указанных в табл. 2 ниже. Отдельные зерна ячменя, несущие мутацию гена, были идентифицированы по существу, как описано в международной патентной заявке PCT/EP2017/065516 в WS4 (с. 69-72) и в примерах от 8 до 15, с использованием праймеров и зондов, указанных в табл. 2 ниже. Праймеры и зонды, которые были разработаны специально для идентификации специфических мутантов в локусе HvCslF6, описаны в табл. 2.

Таблица 2

Праймеры и зонды, предназначенные для конкретных мутантов

| Мутант | Мишень-специфичный прямой праймер | Мишень-специфичный обратный праймер | Мутант-специфичный зонд для обнаружения, меченный 6-карбоксихлорфлуоресцеином (FAM) | Эталон-специфичный зонд для обнаружения, меченный гексахлорфлуоресцеином (HEX) |
|--------|---|---|---|--|
| Мут 1 | TACACCCAT CATCATCAT CT (SEQ ID NO:4) | CGAGAACCT TGGCGA (SEQ ID NO:5) | ATCATCGAAT CCGCCG (SEQ ID NO:6) | CATCATCGGAT CCGCC (SEQ ID NO:7) |
| Мут 2 | CCGACCAC CATGTTCT (SEQ ID NO:8) | GGCGATGAC GAGCAG (SEQ ID NO:9) | CTACCTGGAC ATCGTGC (SEQ ID NO:10) | CTACCTGGGCA TCGTG (SEQ ID NO:11) |
| Мут 3 | ACTGCTCCA TCTACCCAC (SEQ ID NO:12) | GTATGTGCTG CCGAAGAG (SEQ ID NO:13) | TGCTCCGCTG ATCCA (SEQ ID NO:14) | TCCGCTGGTCC ACG (SEQ ID NO:15) |
| Мут 4 | CACCACCG TGCCG (SEQ ID NO:16) | CATGGTGGT CGGGC (SEQ ID NO:17) | CGTCACCGAC CACTTC (SEQ ID NO:18) | TCACC GGCCAC TTCA (SEQ ID NO:19) |

Мутант 5 был идентифицирован с использованием способа прямого секвенирования 6000 мутагенизированных мутантов ячменя M3 с использованием специфических праймеров (прямой праймер

5'-ACTGCTCCATCTACCCACAC-3'; обратный праймер 5'-GATGACGAAGGTGAATGCCC-3') для амплификации частей локуса HvCsIF6.

Мутант 1, мутант 2, мутант 3, мутант 4 и мутант 5 в настоящем документе также упоминаются как Мут1, Мут2, Мут3, Мут4 и Мут5 соответственно.

Для визуализации местоположения мутаций была использована программа Swissprot (swiss-model.exPASy.org/) для моделирования белка CsIF6. Сначала вся последовательность белка загружается в "функцию построения модели (model building feature)", и затем модель рассчитывается на основе доступных данных. Для последовательности белка CsIF6 признано, что она имеет встроенную в последовательность структуру, напоминающую "субъединицу целлюлозосинтазы А". Затем программа использует распознанную последовательность (позиция полипептида 109-883) для построения модели. На данной стадии программа SwissProt не распознает, что белок связан с мембраной, хотя спирали располагаются в одной стороне модели. В литературе указывается, что белок CsIF6 является связанным с мембраной. Таким образом, для дальнейшей проверки была использована функция QMEANBrane в SwissProt. Данная программа моделирования использует PDB-файл, охватывающий позицию 109-883, созданный во время первого моделирования, и затем создается новая структура, моделирующая вместе мембрану и выбранную часть белка CsIF6. Две пунктирные серые плоскости обозначают двухслойную мембрану. Все три мутации, обеспечивающие низкое содержание (1,3;1,4)-β-глюкоанов, находятся в спиральных структурах, встроенных в мембрану (T709I, G748D, G847E), тогда как мутация, не влияющая на содержание (1,3;1,4)-β-глюкоанов (G732D), находится в линкерной последовательности, обращенной наружу и соединяющей два трансмембранных домена (рис. 3). Локализованные в мембране аминокислоты в CsIF6 указаны в табл. 3.

Таблица 3

Локализация локализованных в мембране аминокислотных последовательностей в белке CsIF6

| Положение AA в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 | Последовательность AA | Функциональность |
|--|------------------------|---|
| 109-128 | RVLIFVRLIAFTLFVIVRIS | Трансмембранный участок (SEQ ID NO:20) |
| 137-158 | LWVTSICGEFWFGFSWLLDQLP | Трансмембранный участок (SEQ ID NO:21) |
| 700-711 | LQRVAYINITY | Часть трансмембранного участка (SEQ ID NO:22) |
| 712-714 | PTF | Спиральный линкер в мембране, дающий перегиб |
| 715-731 | AIFLIFYTTPALSFTV | Часть трансмембранного участка (SEQ ID NO:23) |
| 741-758 | TMFYVYLGIVLSTLLVIA | Трансмембранный участок (SEQ ID NO:24) |
| 835-857 | ITPILIIIFVNIIGSAVAFKVL | Трансмембранный участок (SEQ ID NO:25) |
| 864-882 | LKVAGGVFFNFVLFHLYPF | Трансмембранный участок (SEQ ID NO:26) |

Пример 3.

Содержание (1,3;1,4)-β-глюкоанов и соотношение DP3:DP4 зрелых мутантных зерен мутанты, идентифицированные, как описано в примере 1, выращивали до зрелости, и гомозиготные зерна высевали в ряды. В зрелом возрасте растения собирали, и зерна использовали для размножения на небольших участках в несколько квадратных метров. Мутанты 1, 2, 4 и 5 все хорошо показали себя в полевых условиях, давая выходы, аналогичные эталонам. Соответственно данные мутанты имеют приемлемые агрономические признаки. Эталоном был сорт Paustian для мутантов 1, 2, 3 и 4, и сорт Quench для мутанта 5). Мутант 3 демонстрировал существенно пониженную плодovitость и поэтому не был включен в испытания урожайности.

Табл. 4 показывает среднюю урожайность не менее четырех участков размером 7,5 м². Ячмень высажен в Nr Aaby в 2017 г.

Таблица 4

| Мутант № | Мутант | Выход (кг) | SD |
|----------|----------|------------|-----|
| Мут1 | CW2 | 6,0 | 0,2 |
| Мут2 | CW3 | 6,2 | 0,3 |
| Мут5 | CW4 | 5,9 | 0,2 |
| | Paustian | 6,2 | 0,2 |
| | | | |
| Мут 4 | CW7 | 6,0 | 0,5 |
| | Quench | 6,1 | 0,2 |

Собранные зерна были проанализированы на общее содержание (1,3;1,4)-β-глюканов и было определено соотношение DP3:DP4. Десять мл зерен ячменя были размолоты в циклонной мельнице Retch. Все образцы были проанализированы в трех повторах. 20 мг Муки высыпали в пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл, нагревали в течение 2 ч при 100°C в печи, затем охлаждали до комнатной температуры. Всего добавляли 500 мкл 50% водного метанола и образец встряхивали при 1400 об/мин в течение 1 ч. После центрифугирования при 16000 г в течение 10 мин супернатант отбрасывали и образец сушили в течение ночи. Затем 400 мкл 20 мМ NaHPO₄ при pH 6,5 с Ш/мл лихеназы (Megazyme, International, Ireland) добавляли на 10 мг муки и инкубировали при 50°C в течение 2,5 ч. Образец центрифугировали при 16000 г в течение 10 мин и супернатант фильтровали через фильтры с размером пор 0,45 мкм, и высвобожденные олигомеры Glc-β-(1→4)-Glc-β-(1→3)-Glc (DP3) и Glc-β-(1→4)-Glc-β-(1→4)-Glc-β-(1→3)-Glc (DP4) количественно определяли высокоэффективной анионообменной хроматографией с импульсным амперометрическим обнаружением (HPAEC-PAD). Олигомеры Glc-β-(1→4)-Glc-β-(1→3)-Glc (DP3) и Glc-β-(1→4)-Glc-β-(1→4)-Glc-β-(1→3)-Glc (DP4) количественно определяли с HPAEC-PAD с использованием системы Dionex ICS 5000+ DC, снабженной 4 мкм CA-10 колонкой с размерами 2×250 мм и преколонкой. Условия прогона были 0,4 мл/мин, температура колонки 40°C, изократический элюент 100 мМ NaOH в течение 15 мин. Стандарт для количественного определения производили путем расщепления 1 ед/мл лихеназы (Megazyme International, Ирландия) известных количеств средневязких (1,3;1,4)-β-глюканов (Megazyme International, Ирландия) в 20 мМ NaHPO₄, pH 6,5, предполагая равное молярное соотношение ответов PAD между DP3 и DP4. Общее содержание (1,3;1,4)-β-глюканов рассматривалось как сумма содержания олигомеров DP3 и DP4.

Результаты. Содержание (1,3;1,4)-β-глюканов у мутантов 1, 2 и 5 были все в диапазоне от 1,4 до 2%, тогда как мутант 3 почти не имел (1-3;1-4)-β-глюкана (фиг. 1 и табл. 6). Изучение соотношений DP3:DP4 у мутанта 1 показало более низкое соотношение, чем у эталонов, мутант 2 был аналогичен эталонам, соотношение у мутантов 3 и 4 было немного выше, чем у эталона, и мутант 5 показал намного более высокое соотношение DP3:DP4 (фиг. 2 и табл. 6).

Пример 4.

Содержание (1,3;1,4)-β-глюканов мутантных зерен при ускоренном проращивании зерна мутантов 1, 2 и 4, а также эталона (эталон для сравнения мутантов 1, 2, 3 и 4 был сорт Paustian и сорт Quanch для мутанта 5) подвергались одностадийному замачиванию и проращиванию в резервуаре, по существу, как описано в примере 1 международной заявки на патент PCT/EP2017/065498. Образцы прорастающих зерен отбирали через 24 ч и 48 ч.

Все образцы были проанализированы с использованием способа комплексного микроматричного профилирования полимеров (Comprehensive Microarray Polymer Profiling (CoMPP)) (Moller et al., 2007). Каждый образец анализировали в трех повторах по 20 мг, последовательно экстрагированных 1 мл H₂O при 85°C в течение 1 ч при 1000 об/мин и 1 мл 4 М NaOH с 0,1% по объему NaBH₄ при 20°C в течение 2 ч при 1000 об/мин. Каждую экстракцию проводили в пробирках типа Эппендорф объемом 2 мл со стеклянным шариком 3 мм с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 10000 г и собирали супернатант.

Экстракты смешивали 50/50 с матричным струйным буфером для печати (55,2% глицерина, 44% воды, 0,8% Тритона X-100) и наносили на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм (Whatman, Maidstone, UK) с использованием Arrayjet Sprint (Arrayjet, Roslin, UK). Каждый образец был напечатан с четырьмя техническими повторностями и 3 пятикратными разведениями и исследован, как описано в (Pedersen et al., 2012). Массивы сканировали с использованием планшетного сканера (CanoScan 9000 MarkII, Canon, Søborg, Denmark) с разрешением 2400 dpi и количественно определяли с использованием прибора Array-Pro Analyzer 6.3 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Для каждого образца среднее значение было рассчитано на основе четырех разведений и четырех технических повторов, что привело к 16 измерениям для каждого значения сигнала повторения образца. Наибольшее значение в наборе данных было установлено равным 100, и остальные скорректированы соответствующим образом. Данные представлены в табл. 5 показывают среднее значение из трех повторов образцов.

Таблица 5

Содержание (1,3;1,4)-β-глюканов у мутантов ячменя и эталонов

| | % Глюкана – 24 ч | % Глюкана – 48 ч |
|----------|------------------|------------------|
| Мутант 1 | 59 | 55 |
| Мутант 2 | 84 | 69 |
| Мутант 4 | 100 | 95 |
| Эталон 1 | 98 | 85 |

Наибольшее значение в момент времени 24 ч было установлено на 100, и остальные скорректированы соответствующим образом.

Анализ показывает, что мутанты 1 и 2 имеют более низкое содержание (1,3;1,4)-β-глюканов через 24 и 48 ч во время проращивания в резервуаре, снабженном воздухом, по сравнению с эталоном, и мутант 4 служит для удостоверения присущего мутантам 1 и 2 более низкого содержания (1,3;1,4)-β-глюканов.

Пример 5.

Анализ прочности зерна.

Мутанты 1, 2, 3, 4 и 5, а также эталонные линии сорта Paustian и сорта Quench выращивались в поле на участках размером 7,5 м². Их собирали с помощью селекционного комбайна Wintersteiger Classic (Wintersteiger (WINTERSTEIGER AG, Johann-Michael-Dimmelstrasse 94910 Ried im Innkreis, Austria). Дальнейшую очистку зерна проводили на очистителе для образцов Pfeuffer, модель SLN4 (Pfeuffer GmbH, Flugplatzstraße, 70, 97318, Kitzingen, Germany) с использованием сита в 2,5 мм. Битые зерна подсчитывали в четырех случайным образом выбранных образцах массой приблизительно 10 г и рассчитывали количество битых зерен относительно массы. Количество битых зерен после обмолота (тест Wintersteiger) и перед скринингом является показателем прочности зерна. Уровень битых зерен после обмолота рассчитывали как кратное увеличение битых зерен в мутантных растениях по отношению к эталонным растениям дикого типа (опорные растения указаны в табл. 6а).

Таблица 6а

Сводка характеристик мутантных зерен

| Патентная запись | Бета-глюкан в муке (%) | Масс./масс. соотношение DP3/DP4 | % бета-глюкана от эталона | Битые зерна (%) |
|--------------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------|-----------------|
| Мут 1 | 1,7 | 2,0 | 50 | 4,4 |
| Мут 2 | 1,9 | 3,0 | 54 | 2,7 |
| Мут 3 | 0,1 | 3,7 | 2 | ND |
| Мут 4 | 3,3 | 3,4 | 94 | 1,2 |
| Эталон 1 – Сорт Paustian | 3,5 | 2,9 | 100 | 1,6 |
| Мут 5 | 1,4 | 4,7 | 44 | 3,2 |
| Эталон 2 – Сорт Quench | 3,2 | 2,8 | 100 | 2,1 |

Аналогичное определение процентного содержания битых зерен (уровень повреждения после обмолота) было выполнено на образцах растений ячменя массой 50 г, выращенных в Новой Зеландии в 2016-2017 гг. (Мут1; Мут2; Мут4; Мут5) и в Дании 2018 (Мут2). Частоту битых зерен после обмолота (уровень повреждения после обмолота) определяли, как описано выше, и сравнивали с частотой для эталонных растений ячменя дикого типа (сорт Paustian для Мут1, Мут2 и Мут4 и сорт Quench для Мут5). Кратность увеличения по сравнению с эталонными растениями ячменя дикого типа указана в табл. 6б ниже.

Таблица 6б

| Линия ячменя | Мутация по сравнению с SEQ ID NO: 1 | Кратное увеличение количества битых зерен 2017 | Кратное увеличение количества битых зерен 2018 |
|--------------|-------------------------------------|--|--|
| Мут 1 | G847E | 2,7 | |
| Мут 2 | G748D | 1,7 | 1,9 |
| Мут 4 | G732D | 0,8 | |
| Мут 5 | T709I | 1,5 | |

Интересно, что Hu et al., 2014 раскрывает линию ячменя (m351), несущую мутацию в гене CsIF6, приводящую в результате к мутации A849T белка CsIF6. Указанная линия ячменя имеет превышение в 4,2 раза уровня битых зерен по сравнению с контролем дикого типа.

Пример 6. Гидролитическая ферментативная активность в образцах солода.

Ядра ячменя мутанта 2 и эталона (сорта Paustian) были обработаны в трех повторах по 50 г каждого

образца. Мутант 2 был таким, как описано в примере 2 выше. Сухие ядра ячменя, помещенные в стаканы из нержавеющей стали, микросолодовали в соответствии со стандартными способами. Вкратце ядра ячменя выдерживали с принудительным помещением в пресную воду в пресной воде при 15°C в течение около 7 ч в первый день, 3 ч во второй день и 1 ч в третий день, чтобы достичь содержания воды 35, 40 и 45% соответственно в конце каждого замачивания. После каждого замачивания стаканы из нержавеющей стали, содержащие образцы, перемещали в ящик для проращивания при 15°C и хранили там до следующей стадии процесса. После последнего дренажа замочной воды образцы выдерживали в течение 120 ч (дни от 3 до 7) в ящиках для проращивания, уравновешенных до 45% воды, и опрыскивали водой для преодоления потери воды при дыхании.

В конце процесса проращивания (день 7) образцы высушивали в сушильном шкафу из нержавеющей стали в инкубаторе Tempaks в течение 21 ч, используя следующую программу температурного изменения: 25-55°C (2°C/ч), 55-85°C (4°C/ч), 85°C в течение 1,5 ч.

Стадии проращивания и печной сушки выполняли с рециркуляционным потоком воздуха, составляющим 80% свежего воздуха.

В конце каждого дня микросолодования образцы собирали для анализа в трех повторах и лиофилизировали в течение 48 ч.

Перед анализом ферментативной активности образцы солода размалывали с использованием стандартной мельницы Foss Cyclotech, снабженной шлифовальным кольцом из карбида вольфрама (Foss 10004463), никелированным рабочим колесом (Foss 1000 2666) и выходным ситом 1 мм (Foss 10001989). Все измерения ферментативной активности ячменного солода были выполнены в течение 48 ч после измельчения сухого образца. Анализы активности альфа-амилазы выполняли с использованием набора Ceralpha (K-CERA) от Megazyme с использованием стандартного лабораторного оборудования. Анализы амилазы были сделаны в соответствии с протоколом производителя (K-CERA 01/12). Расчет активности амилазы был основан на формуле в протоколе Megazyme (K-CERA 01/12). Анализы активности бета-амилазы выполняли с использованием набора Betamyl (K-BETA3) от Megazyme с использованием стандартного лабораторного оборудования. Анализы амилазы были сделаны в соответствии с протоколом производителя (K-BETA3 10/10). Расчет активности бета-амилазы основывался на формуле в протоколе Megazyme (K-BETA3 10/10). Анализы предельной активности декстриназы выполняли с использованием набора для анализа пуллулазазы/предельной декстриназы (способ PullG6) (K-PullG6) от Megazyme с использованием стандартного лабораторного оборудования. Анализы предельной декстриназы проводили в соответствии с протоколом производителя (K-PullG6 05/17). Расчет активности предельной декстриназы был основан на формуле в протоколе Megazyme (K-PullG6 05/17).

Результаты.

Суммарные ферментативные активности, измеренные для α -амилазы, β -амилазы и свободной предельной декстриназы следуют одному и тому же паттерну в мутанте 2 и эталонной линии ячменя (фиг. 5). Удивительно, что активность предельной декстриназы, по-видимому, немного выше у мутанта, начиная с 3-го дня, хотя экспрессия гена предельной декстриназы была несколько ниже.

Пример 7. Содержание (1,3;1,4)- β -глюкоанов.

Пророщенные зерна, полученные, как описано в примере 6, анализировали на общее содержание (1,3;1,4)- β -глюкоанов. Десять мл зерна ячменя были размолоты в циклонной мельнице Retch. Все образцы были проанализированы в трех повторах. Двадцать мг муки высыпали в пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл, нагревали в течение 2 ч при 100°C в сушильном шкафу с последующим охлаждением до комнатной температуры. Всего добавляли 500 мкл 50% водного метанола и образцы встряхивали при 1400 об/мин в течение 1 ч. После центрифугирования при 16000 \times g в течение 10 мин супернатант отбрасывали и образцы сушили в течение ночи. Затем 400 мкл 20 мМ NaHPO₄ при pH 6,5 с Ш/мл лихеназы (Megazyme, International, Ireland) добавляли на 10 мг муки и инкубировали при 50°C в течение 2,5 ч. Образец центрифугировали при 16000 \times g в течение 10 мин супернатант фильтровали через фильтры с размером пор 0,45 мкм, и высвобожденные олигомеры Glc- β -(1 \rightarrow 4)-Glc- β -(1 \rightarrow 3)-Glc (DP3) и Glc- β -(1 \rightarrow 4)-Glc- β -(1 \rightarrow 4)-Glc- β -(1 \rightarrow 3)-Glc (DP4) количественно определяли высокоэффективной анионообменной хроматографией с импульсным амперометрическим обнаружением (HPLC-PAD). Олигомеры Glc- β -(1 \rightarrow 4)-Glc- β -(1 \rightarrow 3)-Glc (DP3) и Glc- β -(1 \rightarrow 4)-Glc- β -(1 \rightarrow 4)-Glc- β -(1 \rightarrow 3)-Glc (DP4) количественно определяли с HPLC-PAD с использованием системы Dionex ICS 5000+ DC, снабженной 4 мкм CA-10 колонкой с размерами 2 \times 250 мм и пре-колонкой. Условия прогона были 0,4 мл/мин, температура колонки 40°C, изократический элюент 100 мМ NaOH в течение 15 мин. Стандарт для количественного определения производили путем расщепления 1 ед/мл лихеназы (Megazyme International, Ирландия) известных количеств средневязких (1,3;1,4)- β -глюкоанов (Megazyme International, Ирландия) в 20 мМ NaHPO₄, pH 6,5, предполагая равное молярное соотношение ответов PAD между DP3 и DP4. Общее содержание (1,3;1,4)- β -глюкоанов рассчитывали как сумму олигомеров DP3 и DP4.

Результаты.

Содержание (1,3;1,4)- β -глюкоанов в мутанте 2 (мутант) и в сорте Paustian (эталон) контролировали в ячмене и в зеленом солоде в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6 процедуры солодования (фиг. 6), а также в высушенных в

печи солодах (день 7 на фиг. 6). В течение всего процесса солодования содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в мутанте 2 составляло только 50% от эталонного, и на 5-й день содержание (1,3;1,4)-β-глюканов в мутанте было похоже на эталонный солод, высушенный в печи.

Пример 8. Вязкость.

Солодование.

Образцы ячменя солодовали в двух повторах, используя 50 г ячменя на чашку для образцов. Образцы ячменя замачивали принудительным помещением в воду с температурой 15°C в закрытой камере с решеткой для образцов. Процедуру замачивания выполняли в течение первых трех дней, чтобы в конце каждого замачивания содержание воды составляло соответственно 35, 40 и 45%. Образцы хранили в течение следующих трех дней при 15°C в ящиках для проращивания и уравнивали до 45% воды и корректировали путем опрыскивания водой для преодоления потери воды при дыхании. После данных шести дней образцы подвергали печной сушке в течение 21 ч в инкубаторе Termaks и обрабатывали с использованием ручной системы удаления корней. В течение трех дней получали зеленый солод, после третьего дня солодования образцы подвергали лиофильной сушке до 4%-ного содержания воды.

Затирание.

Перед затиранием образцы измельчали до мелкого порошка. 70 г сухого вещества смешивали в соотношении вода:крупка 5:1 и растирали в затирающем оборудовании Lochner в соответствии со следующей программой затирания: 10 мин при 52°C, 50 мин при 65°C и 5 мин при 78°C, разнесенные температурным изменением на 1°/мин. Образцы были собраны во время выполнения программы затирания.

После затирания сусло фильтруют через бумажный фильтр MN 614 ¹/₄, диаметр 320 мм (Macherey-Nagel). Реологическое поведение отфильтрованного сусла измеряется на ротационном реометре RheolabQC (Anton Paar GmbH) с поддерживающей температурной системой Пельтье (C-PTD 180/AIR/QC) и двухзонными измерительными системами (C-DG42/SS, Anton Paar GmbH).

Результаты.

Вязкость трехдневного сусла (ячмень после 3 дней солодования) подвергнутых микросолодованию мутантов Мут2 и Мут5 определяли и сравнивали с эталоном (3-дневное сусло подвергнутых микросолодованию зерен дикого типа сорта Paustian и сорта Quench). Вязкость значительно ниже у сусла, приготовленного из любого мутанта, по сравнению с эталонами, как показано в табл. 7 и на фиг. 6. Плато (Plato) были сравнимы в суслах, приготовленных из мутантов или эталонов.

Вязкость сусла, приготовленного из стандартного солода, приготовленного путем замачивания в течение от 1 до 2 дней и проращивания в течение от 5 до 7 дней с последующей печной сушкой, составляет около 2 мПа·с.

Таблица 7

| | Мут 2 | Paustian | Мут 5 | Quench |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Плато | 13,1 | 13,3 | 13,3 | 13,3 |
| (1-3;1-4)-β-глюкан (BTG) (мг/л) | 2,44 ± 0,02 | 5,50 ± 0,02 | 2,78 ± 0,01 | 4,91 ± 0,22 |
| Вязкость (мПа*с) | 2,01 ± 0,02 | 2,95 ± 0,01 | 2,15 ± 0,05 | 2,71 ± 0,05 |

Ссылки

Burton RA and Fincher GB (2014). Evolution and development of cell walls in cereal grains. *Front Plant Sci.* 5: 456.

Jobling SA (2015). Membrane pore architecture of the CslF6 protein controls (1,3,1,4)- β -glucan structure. *Sci. Adv.* 1:e1500069.

Holme IB, Wendt T, Gil-Humanes J, Deleuran LC, Staker CG, Voytas DF and Brinch-Pedersen H, (2017). Evaluation of the mature grain phytase candidate *HvPAPhy_a* gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9 and TALENs. *Plant Mol Biol* 95:111-121; (DOI: 10.1007/s11103-017-0640-6).

Hu G, Burton C, Hong Z and Jackson E (2014). A Mytation of the cellulose-synthase-like (CslF6) gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) partially affects the β -glucan content in grains. *Journal of Cereal Science* 59, 189-195.

Lawrenson T, Shorinola O, Stacey N, Li C, Østergaard L, Patron N, Uauy C, Harwood W. Induction of targeted, heritable Mytations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol.* 2015 Nov 30;16:258. doi:10.1186/s13059-015-0826-7. Taketa S, Yuo T, Tonooka T, Tsumuraya Y, Inagaki Y, Haruyama N, Larroque O and Jobling SA (2012). Functional characterization of barley betaglucanless Mytants demonstrates a unique role for CslF6 in (1,3;1,4)- β -D-glucan biosynthesis. *J Exp Bot.* 63(1):381-92.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Растение ячменя или его часть, где указанное растение ячменя несет мутацию в гене CsIF6, где указанный мутированный ген CsIF6 кодирует мутантный полипептид CsIF6, где указанный мутантный CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 748 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 на заряженную аминокислоту, или замену аминокислоты 709 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 на неполярную аминокислоту, или замену аминокислоты 847 из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 на заряженную аминокислоту, где заряженная аминокислота выбрана из группы, состоящей из Arg, His, Lys, Asp и Glu, где ядра указанного растения ячменя имеют пониженное содержание (1,3;1,4)- β -глюканов по сравнению с ядрами ячменя, содержащими CsIF6 ген дикого типа, но в остальном имеющими тот же генотип.

2. Растение ячменя по п.1, где указанное растение ячменя имеет содержание (1,3;1,4)- β -глюканов в диапазоне от 1 до 5% общей массы сухого вещества ядер, например от 1,3 до 3% общей массы сухого вещества ядер, предпочтительно от 1,3 до 2% общей массы сухого вещества ядер.

3. Растение ячменя по любому из пп.1 и 2, где ядра указанного растения ячменя имеют содержание (1,3;1,4)- β -глюканов, составляющее по меньшей мере 30% и не более чем 60%, предпочтительно по меньшей мере 40% и не более чем 60% от содержания (1,3;1,4)- β -глюканов растения ячменя, несущего ген CsIF6 дикого типа, но в остальном имеющего тот же генотип.

4. Растение ячменя по любому из пп.1-3, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 847, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) на глутаминовую кислоту (E).

5. Растение ячменя по любому из пп.1-4, где ядра указанного растения ячменя имеют соотношение DP3:DP4 не более чем 2,5, такое как не более чем 2,1, например, в диапазоне от 1,0 до 2,1.

6. Растение ячменя по любому из предыдущих пунктов, где растение ячменя содержит зерна, имеющие частоту битых зерен после обмолота, которая не более чем в 2 раза превышает частоту битых зерен после обмолота зерен растения ячменя, не несущего мутацию в гене CsIF6, но в остальном имеющего тот же генотип.

7. Растение ячменя по любому из пп.1-3, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 748, где указанная замена представляет собой замещение глицина (G) на аспарагиновую кислоту (D).

8. Растение ячменя по любому из пп.1-3 и 7, где ядра указанного растения ячменя имеют соотношение DP3:DP4 в диапазоне от 2,5 до 4.

9. Растение ячменя по любому из пп.1-3, где указанный мутантный полипептид CsIF6 представляет собой CsIF6 с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 за исключением того, что мутантный CsIF6 содержит замену аминокислоты 709, где указанная замена представляет собой замещение треонина (Т) на изолейцин (I).

10. Растение ячменя по любому из пп.1-3 и 9, где ядра указанного растения ячменя имеют соотношение DP3:DP4, составляющее по меньшей мере 3,5, такое как по меньшей мере 4,0, например по меньшей мере 4,5, такое как в диапазоне от 4 до 6.

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

а) мутация в гене, кодирующем LOX-1, приводящая в результате к полной потере функционального LOX-1;

б) мутация в гене, кодирующем LOX-2, приводящая в результате к полной потере функционального LOX-2;

с) мутация в гене, кодирующем ММТ, приводящая в результате к полной потере функционального ММТ.

12. Растительный продукт, выбранный из группы, состоящей из зеленого солода и высушенного в печи солода, где растительный продукт получен из растения ячменя по любому из пп.1-11 или его части.

13. Способ получения водного экстракта, причем указанный способ включает стадии

а) обеспечения ядер растения ячменя по любому из пп.1-11;

б) подвергания ядер ячменя стадии проращивания с получением при этом пророщенных ядер, причем указанная стадия проращивания включает инкубацию указанных ядер в водном растворе в течение не более чем 72 ч;

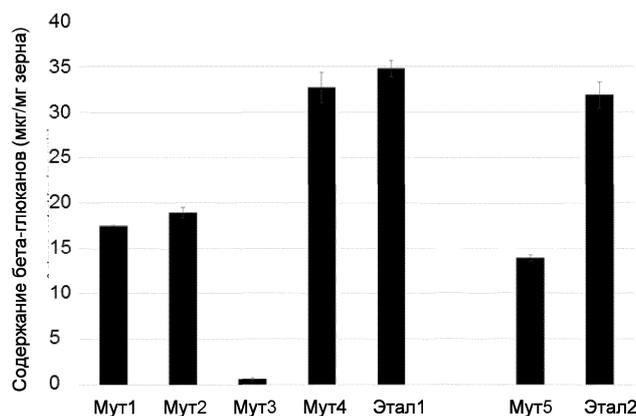
с) мелкого раздробления указанных пророщенных ядер, тогда как указанные пророщенные ядра имеют содержание воды, составляющее по меньшей мере 20%, при условии, что указанные ядра ячменя не имеют содержания воды ниже 20% в любое время после проращивания и до мелкого раздробления пророщенных ядер;

д) приготовления водного экстракта указанных измельченных пророщенных ядер с получением тем самым водного экстракта ячменя.

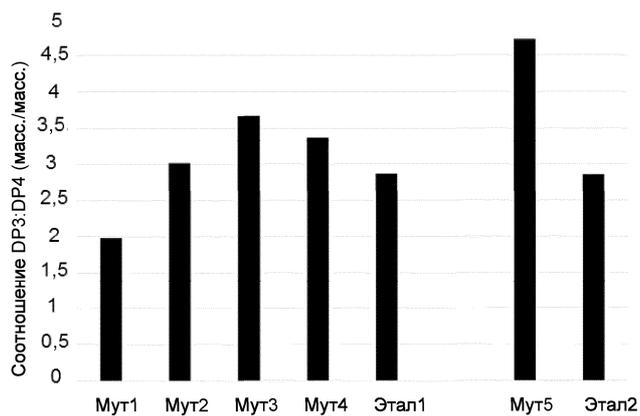
14. Способ производства напитка, причем указанный способ включает стадии

а) приготовления водного экстракта ядер растения ячменя по любому из пп.1-11 и/или солода по п.12 или приготовления водного экстракта с помощью способа по п.13; и

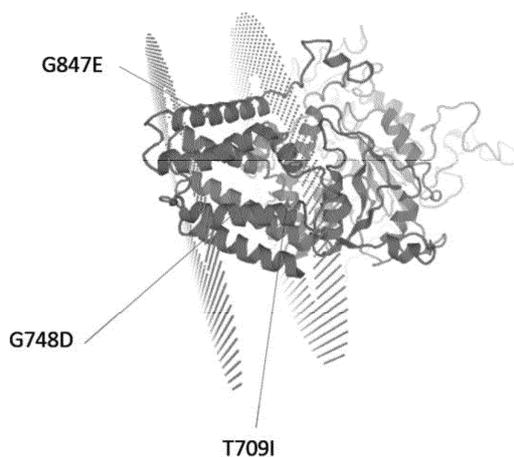
б) обработки указанного водного экстракта с получением напитка.



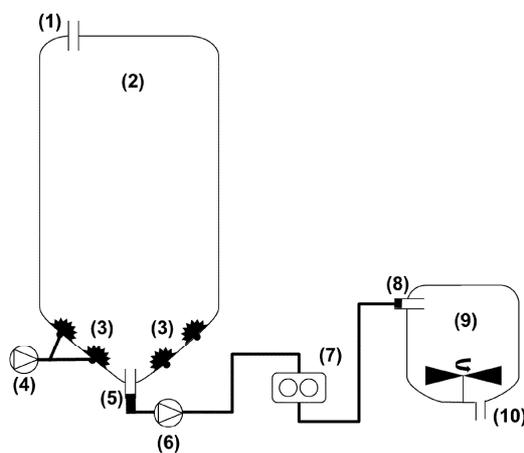
Фиг. 1



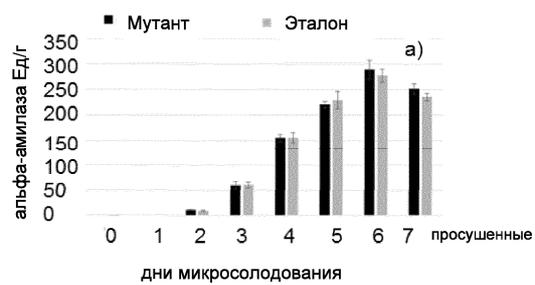
Фиг. 2



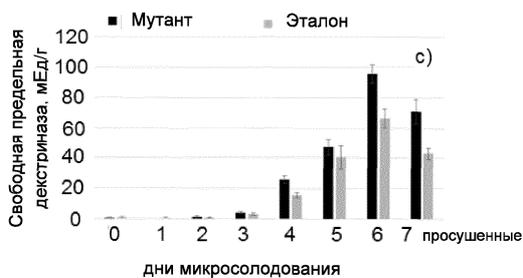
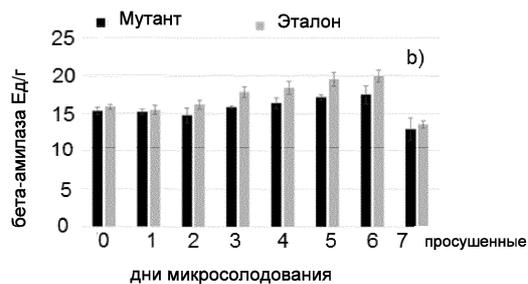
Фиг. 3



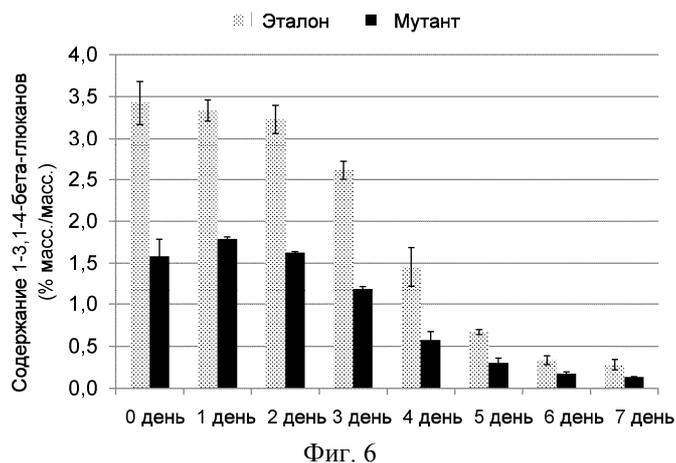
Фиг. 4



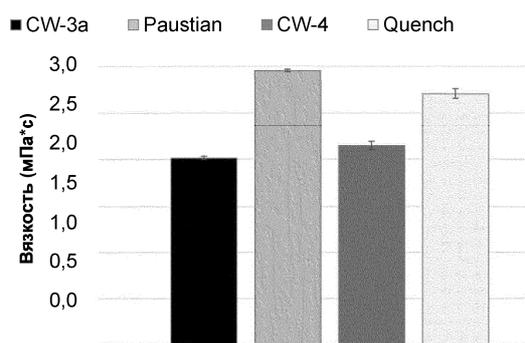
Фиг. 5



Фиг. 5 (продолжение)



Фиг. 6



Фиг. 7

