



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0023548

(51)⁷ A01H 5/10; C12N 15/01; C12C 7/00; (13) B
C12C 1/18; C12C 12/00

-
- (21) 1-2011-02010 (22) 28/12/2009
(86) PCT/DK2009/050355 28/12/2009 (87) WO2010/075860A2 08/07/2010
(30) PA 2008 01851 30/12/2008 DK
(45) 27/04/2020 385 (43) 26/03/2012 288A
(73) 1. Carlsberg Breweries A/S (DK)
Ny Carlsberg Vej 100, DK-1799 Copenhagen V, Denmark
2. Heineken Supply Chain B.V. (NL)
2de Weteringsplantsoen 21, NL-1017 ZD Amsterdam, Netherlands
(72) Birgitte Skadhauge (DK); Finn Lok (DK); Klaus Breddam (DK); Ole Olsen (DK);
Lene Mølskov Bech (DK); Søren Knudsen (DK)
(74) Công ty TNHH Sở hữu công nghiệp Sao Bắc Đẩu (SAO BAC DAU IP CO.,LTD)
-

(54) ĐỒ UỐNG ĐƯỢC TẠO RA TỪ CÂY LÚA MẠCH CÓ HOẠT TÍNH
LIPOXYGENAZA GIẢM, TẾ BÀO CỦA CÂY LÚA MẠCH, BỘ PHẬN CỦA
CÂY LÚA MẠCH, SẢN PHẨM THỰC VẬT CHỨA TẾ BÀO CỦA CÂY LÚA
MẠCH, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT ĐỒ UỐNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN
XUẤT CHẾ PHẨM MẠCH NHA

(57) Sáng chế đề cập đến đồ uống được tạo ra từ cây lúa mạch mất hoàn toàn enzym chức năng lipoxygenaza (LOX)-1 và LOX-2, và sản phẩm thực vật được sản xuất từ cây lúa mạch này, như chế phẩm mạch nha được sản xuất bằng cách sử dụng các hạt lúa mạch có sự thiếu hụt trong khi tổng hợp enzym LOX-1 và LOX-2 bằng cách dioxy hóa axit béo. Các enzym này phá hủy hoạt tính chủ yếu liên quan đến sự dioxy hóa axit linoleic lần lượt thành axit 9-hydroperoxy octadecadienoic và axit 13-hydroperoxy octadecadienoic. Axit 9-hydroperoxy octadecadienoic là chất chuyển hóa do con đường LOX tạo ra, thông qua các phản ứng enzym hoặc tự phát tiếp nữa - có thể dẫn đến sự xuất hiện của trans-2-nonenal (T2N). Sáng chế cũng đề cập đến tế bào của cây lúa mạch, bộ phận của cây lúa mạch, phương pháp sản xuất đồ uống chứa TN2 tiềm năng và phương pháp sản xuất chế phẩm mạch nha.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến những tiến bộ trong công nghệ sinh học thực vật, cho phép phát hiện ra cây lúa mạch, và các sản phẩm của nó có sự thiếu hụt trong tổng hợp hai enzym lipoxygenaza (LOX), LOX-1 và LOX-2 - vì thế đề xuất các vật liệu thô mới dùng cho các ứng dụng khác nhau. Các vật liệu thô này, ví dụ, khi được khai thác trong sản xuất đồ uống, tạo điều kiện thuận lợi cho việc nắm bắt được các khả năng sản xuất mới đối với bia có hương vị ổn định, khác biệt hơn, nhưng tích lũy hợp chất có vị lạ của trans-2-nonenal (T2N) với lượng nhỏ đáng kể - với lợi ích bổ sung là chứa T2N tiềm năng chỉ với lượng nhỏ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Phần lớn bia được sản xuất trên cơ sở lúa mạch (*Hordeum vulgare*, L.) là cây trồng một lá mầm được trồng ở nhiều khu vực trên thế giới. Lúa mạch được phổ biến không chỉ do tầm quan trọng của nó về mặt kinh tế làm nguồn sản phẩm công nghiệp, như bia, mà còn làm nguồn thức ăn cho động vật.

Tiếc rằng, hiện chưa có phương pháp nào tạo ra cây lúa mạch chuyển gen hoàn toàn không có sự biểu hiện của gen nhất định và protein tương ứng. Nói chung, đối với lúa mạch, việc áp dụng kỹ thuật gen đối nghĩa có thể được dùng để tạo ra các cây chuyển gen mà vẫn biểu hiện một số protein (ví dụ, xem ấn phẩm của Robbins và các đồng tác giả, 1998; Stahl và các đồng tác giả, 2004; Hansen và các đồng tác giả, 2007). Ngoài ra, các phương pháp hữu hiệu vẫn chưa được phát triển để tạo ra các đột biến đặc biệt bằng cách sử dụng ARN/ADN thể khảm hoặc thể gây đột biến định hướng điểm ở cây lúa mạch. Trên thực tế, chưa có ví dụ riêng biệt nào về sự định hướng gen oligonucleotit thành công ở cây lúa mạch được công bố. Lida và Terada (2005) đã nhận thấy rằng, sự định hướng gen oligonucleotit đã được tiếp tục nghiên cứu ở cây ngô,

cây thuốc lá và cây lúa, nhưng không được nghiên cứu ở cây lúa mạch – và trong tất cả các trường hợp này đều dùng gen ALS (axetolactate syntase – axetolactat syntaza) làm đích. Một phần kết luận của nghiên cứu này là cần phải xác minh xem liệu có phải phương pháp với các biến đổi thích hợp có thể áp dụng được đối với các gen khác với các gen chọn lọc được một cách trực tiếp, như gen ALS hay không. Sự gây đột biến định hướng bằng cách sử dụng nucleaza có ngón tay kẽm là một công cụ khác có thể được sử dụng trong tương lai để nghiên cứu sinh học thực vật cơ bản của thực vật hoặc biến đổi cây trồng (Durai và các đồng tác giả, 2005; Tzfira và White, 2005; Kumar và các đồng tác giả, 2006). Cũng trong trường hợp này, sự gây đột biến đã không được tiếp tục nghiên cứu hoặc áp dụng một cách thành công ở cây lúa mạch.

Tuy nhiên, các đột biến của cây lúa mạch có thể được tạo ra bằng gây đột biến ngẫu nhiên bằng cách xử lý bằng hóa chất hoặc chiếu xạ, như bằng cách xử lý bằng natri nitrua (NaN_3 ; FIG.1). Một ví dụ là các hạt lúa mạch được gây đột biến bằng NaN_3 , và được sàng lọc để tạo ra lượng lớn phosphat tự do, được định hướng để nhận dạng các đột biến phytat thấp (Rasmussen và Hatzack, 1998); tổng cộng đã nhận dạng được 10 đột biến trong số 2000 hạt được sàng lọc. Tuy nhiên, việc nhận dạng một đột biến cụ thể sau khi xử lý bằng NaN_3 cần đến phương pháp sàng lọc hữu hiệu và không phải lúc nào cũng thành công.

Vào năm 1970, phân tử tạo ra hương vị trong bia giống như mùi bia các-tông đã được phân lập và được nhận dạng là T2N, là một alkenal có 9 nguyên tử cacbon dễ bay hơi (Jamieson và Gheluwe, 1970). Do mức ngưỡng vị đối với T2N ở người là cực kỳ thấp, trước đây đã xác định được là khoảng 0,7nM hoặc 0,1 phần tỷ (ppb) (Meilgaard, 1975), các sản phẩm chứa aldehyt thậm chí với lượng không đáng kể được coi là bị hóa già bia do vị lạ của sản phẩm này. Tuy nhiên, nói chung T2N ở trong bia tươi với lượng rất nhỏ (Lermusieau và các đồng tác giả, 1999), nên nó được tích trữ trong quá trình bảo quản, T2N có thể được giải phóng ra khỏi sản phẩm cộng của T2N (Nyborg và các đồng tác giả, 1999). Quan niệm này được chấp nhận bởi quan sát sau đó là T2N tiềm năng

trong chế phẩm ủ men có liên quan đến sự tạo ra T2N sau khi cất giữ sản phẩm (Kuroda và các đồng tác giả, 2005).

Các hạt lúa mạch chứa ba enzym LOX đã biết là LOX-1, LOX-2 và LOX-3 (van Mechelen và các đồng tác giả, 1999). LOX-1 xúc tác sự tạo ra axit 9-hydroperoxy octadecadienoic (9-HPODE; xem FIG.2 để biết tổng quan một phần về con đường LOX) – tiền chất của cả T2N và axit trihydroxy octadecenoic (được viết tắt là THA) – từ axit linoleic. LOX-2 chủ yếu xúc tác sự chuyển hóa axit linoleic thành 13-HPODE, chất này tiếp tục được chuyển hóa thành hexanal, một aldehyt có 6 nguyên tử cacbon có ngưỡng vị cao ~0,4ppm (phần triệu) (Meilgaard, nêu trên). Sự tác động của LOX-3 có lẽ là không thích hợp đối với sáng chế này vì hai lý do: mức biểu hiện của gen tương ứng trong hạt lúa mạch là rất nhỏ, và sản phẩm đặc hiệu của LOX-3 vẫn khó tả.

Theo sự hỗ trợ của dữ liệu nêu trên, một số thông báo đã cho thấy rằng T2N được tạo ra thông qua phương pháp sinh hoá kèm theo sự chuyển hóa axit linoleic thành 9-HPODE, ban đầu được xúc tác bởi LOX-1, và sau đó phân cắt 9-HPODE thông qua tác động của 9-hydroperoxit lyaza (ví dụ, xem Kuroda và các đồng tác giả, 2003, 2005; Noodermeer và các đồng tác giả, 2001).

Các biểu hiện ở đây không có sự liên hệ giữa hoạt tính chung của LOX trong mạch nha và nonenal tiềm năng trong chế phẩm ủ men. Tuy nhiên, ở đây có sự suy đoán về mối liên hệ quan trọng giữa hoạt tính của LOX-1 và T2N tiềm năng của chế phẩm ủ men, chủ yếu là vì hoạt tính của LOX-2 được xem là nhỏ đối với sự tạo ra T2N tiềm năng trong chế phẩm ủ men (Kuroda và các đồng tác giả, 2005).

Như nêu trên, FIG.2 thể hiện một phần quy trình tạo LOX, ở đây tập trung vào các phản ứng chuyển hóa từ axit linoleic thành T2N. Hoạt tính chủ yếu của enzym LOX-1 liên quan đến sự chuyển hóa axit linoleic thành 9-HPODE, axit này là chất chuyển hóa ban đầu của quy trình sinh hóa dẫn đến sự tạo ra T2N. Trái lại, hoạt tính chủ yếu của LOX-2 lại liên quan đến sự chuyển hóa axit linoleic thành 13-HPODE, axit này được tách ra từ quy trình sinh hóa tạo ra T2N nêu trên. Cần lưu ý rằng, các enzym LOX-1 và LOX-2 có thể dùng axit linolenic

làm chất nền, nhưng hoạt tính này là không nằm trong phạm vi của sáng chế này vì quy trình tương tự không dẫn tới sự tạo ra T2N.

LOX-1 đã được xem là đóng góp bằng hoạt tính chủ yếu của LOX trong mạch nha (ví dụ, xem Kuroda và các đồng tác giả, 2003).

Một số cây lúa mạch khác nhau đã được phát triển, khác biệt ở chỗ, có sự giảm hoặc không có hoạt tính của LOX-1. Ví dụ, các hạt lúa mạch hoặc các cây lúa mạch có hoạt tính của LOX-1 nhỏ được bộc lộ trong WO 02/053721 của Douma A.C. và các đồng tác giả. Và trong WO 2005/087934 của Breddam K. và các đồng tác giả, sự chú ý được tập trung vào hai đột biến khác nhau thiếu hoạt tính của LOX-1 – đột biến tách và đột biến có codon kết thúc dịch mã sớm. Các đột biến này được nhận dạng sau khi nhân giống và sàng lọc các cây được đột biến, như được minh họa trên FIG.1. Trong khi các đột biến nêu trên được nhận dạng bằng cách sàng lọc lúa mạch được gây đột biến bằng NaN_3 , thì Hirota N. và các đồng tác giả lại mô tả cây lúa mạch không có hoạt tính LOX-1 trong EP1609866, được nhận dạng bằng cách sàng lọc bộ sưu tập lúa mạch trồng tự nhiên.

Đã biết một số ví dụ về cây được đột biến tổng hợp được LOX với lượng nhỏ. Tuy nhiên, không cây lúa mạch nào được mô tả là thiếu một trong số hoạt tính của cả LOX-1 và LOX-2. Các phương pháp có khả năng thao tác di truyền cây trồng thường là các phương pháp đặc biệt đặc trưng cho một loại cây trồng, và do đó - mặc dù có một vài giống lúa, đậu tương, hoặc cây *Arabidopsis* đã biết là chứa LOX với lượng nhỏ - nhưng các phương pháp dùng để tạo ra các cây như vậy không thể được sử dụng để tạo ra cây lúa mạch chứa LOX có hoạt tính thấp hoặc không có. Ngoài ra, LOX của các đột biến của một loại cây trồng có thể có các tính chất khác so với LOX của các đột biến của loại cây khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Chế phẩm ủ men là chất lỏng phức hợp quan trọng trong lĩnh vực sản xuất đồ uống có nguồn gốc từ mạch nha như bia (xem FIG.3 thể hiện quy trình tổng thể sản xuất bia). Chế phẩm ủ men được tạo ra từ cây lúa mạch thiếu hoạt tính của LOX-1, thực sự khác biệt ở chỗ, chế phẩm này chứa T2N tiềm năng với

lượng đáng kể, mặc dù lượng nêu trên là nhỏ hơn so với lượng T2N tiềm năng trong chế phẩm ủ men được tạo ra từ lúa mạch kiểu đại. Vì tiềm năng nêu trên trong chế phẩm ủ men liên quan đến T2N được tạo ra trong bia sau khi bảo quản (Kuroda và các đồng tác giả, 2005), do đó có nhu cầu về cây lúa mạch dùng để sản xuất chế phẩm ủ men chứa T2N tiềm năng với lượng giảm đáng kể.

Các phương pháp làm giảm hoạt tính của LOX bằng cách xử lý nhiệt đã được mô tả. Tuy nhiên, việc xử lý nhiệt nói chung được thực hiện trong khi tạo mạch nha và/hoặc sản xuất chế phẩm ủ men, và các sản phẩm có hoạt tính LOX nhờ đó được phép tích lũy trong lúa mạch cho đến khi thực hiện việc xử lý nhiệt. Việc phân tích lúa mạch đã khám phá ra rằng, các sản phẩm có hoạt tính LOX với lượng đáng kể là có chứa trong lúa mạch, thậm chí còn có trước khi tạo mạch nha (Wackerbauer và Meyna, 2002).

Sáng chế đề xuất cây lúa mạch thiếu hoạt tính của LOX-1 và LOX-2 và bộc lộ rằng cây lúa mạch này có một số ưu điểm rất lớn. Như nêu trên, Kuroda và các đồng tác giả (nêu trên) đã mô tả sự thiếu tương quan giữa hoạt tính của LOX trong mạch nha và T2N tiềm năng trong chế phẩm ủ men, và được cho là do sự có mặt hoạt tính của LOX-2. Do đó, Kuroda và các đồng tác giả (2005) đã đề xuất rằng LOX-2 có vai trò không đáng kể đối với sự tạo ra T2N tiềm năng.

Các nhà nghiên cứu công nghệ sản xuất bia đã vật lộn với sự hiểu biết về điều gì chi phối sự tạo ra T2N tự do và T2N tiềm năng. Do đó điều bất ngờ là, có lẽ gây bối rối, khi sáng chế đề xuất bằng chứng thử nghiệm cho thấy tác động có lợi bằng cách sử dụng cây lúa mạch thiếu hoạt tính của cả LOX-1 và LOX-2 để sản xuất chế phẩm ủ men có T2N tiềm năng với lượng rất nhỏ. Và ngoài ra, T2N tự do chứa trong chế phẩm ủ men được tạo ra từ cây lúa mạch thiếu hoạt tính của cả LOX-1 và LOX-2 được phát hiện là với lượng nhỏ hơn so với lượng chứa trong chế phẩm ủ men tạo ra được từ lúa mạch có null-LOX-1.

Do đó, một mục đích của sáng chế là đề xuất đồ uống tạo ra được từ cây lúa mạch, hoặc bộ phận của nó, trong đó đồ uống này chứa T2N tiềm năng với lượng rất nhỏ – và trong đó cây lúa mạch này, và bộ phận của nó chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1, như

mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2, như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2.

Sáng chế cũng nhằm mục đích đề xuất cây lúa mạch dùng để sản xuất đồ uống theo sáng chế. Vì vậy, sáng chế mô tả việc tạo ra cây lúa mạch, hoặc các bộ phận của nó chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1, như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2, như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất các sản phẩm thực vật chứa cây lúa mạch đã được xử lý, bộ phận của nó, trong đó cây này chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1, như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2, như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2. Không giới hạn phạm vi của sáng chế, ví dụ, các sản phẩm chứa thực vật nêu trên có thể là chế phẩm mạch nha, chế phẩm ủ men, hoặc đồ uống (như đồ uống có nguồn gốc từ mạch nha, ví dụ, bia hoặc đồ uống có nguồn gốc từ mạch nha không chứa cồn), hoặc đồ uống có nguồn gốc từ lúa mạch, hoặc đồ uống có nguồn gốc từ hỗn hợp của mạch nha và lúa mạch và tùy ý các thành phần khác. Các sản phẩm chứa thực vật này có thể cũng là xiro lúa mạch, xiro mạch nha, dịch chiết lúa mạch, và dịch chiết mạch nha.

Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất các phương pháp sản xuất đồ uống, khác biệt ở chỗ, đồ uống này chứa T2N tiềm năng với lượng rất nhỏ, các phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) tạo ra chế phẩm chứa cây lúa mạch, hoặc bộ phận của nó chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1, như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2, như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2;
- (ii) xử lý chế phẩm thu được từ bước (i) thành đồ uống;

nhờ đó thu được đồ uống, khác biệt ở chỗ, đồ uống này chứa T2N tiềm năng với lượng rất nhỏ.

Sáng chế cũng liên quan đến cây lúa mạch, cây này – ngoài việc chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1, và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2 – còn có một hoặc nhiều đột biến hữu ích bổ sung.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 là hình vẽ thể hiện một ví dụ về việc làm thế nào có thể nhân giống các hạt lúa mạch được gây đột biến bằng NaN_3 . Các hạt thế hệ M0 phát triển thành cây và cây này phát triển thành hạt thế hệ M1. Các hạt này có thể được gieo để phát triển thành cây thế hệ M1, cây này lại tạo ra các hạt mới thế hệ M2. Tiếp theo, các cây thế hệ M2 phát triển và tạo ra các hạt thế hệ M3. Các hạt thế hệ M3 có thể được cho nảy mầm, ví dụ, để phân tích lá bao mầm của cây thế hệ M3 mới nảy mầm. Ngoài ra, hoa thu được từ các hạt của cây thế hệ M3 có thể được sử dụng để lai giống với dòng hoặc cây lúa mạch để thu được cây thế hệ M4. Hình vẽ tương tự được thể hiện như FIG.1A trong WO 2005/087934 của Breddam K. và các đồng tác giả.

FIG.2 là hình vẽ thể hiện con đường sinh hóa dưới dạng sơ đồ chuyển hóa và phân rã axit linoleic thành T2N. LOX-1 chủ yếu xúc tác cho việc chuyển hóa axit linoleic thành 9-HPODE, axit này bị phân rã bằng enzym trở thành cis-nonenal. Hợp chất này qua đồng phân hoá học tự phát thành T2N. LOX-2 chủ yếu xúc tác cho việc chuyển hóa axit linoleic thành 13-HPODE, axit này có thể được chuyển hóa thành 2-E-hexanal (không được thể hiện).

FIG.3 là hình vẽ thể hiện dưới dạng sơ đồ tổng quan được đơn giản hóa quy trình được ưu tiên để sản xuất bia, bao gồm các bước: ngâm hạt lúa mạch (1), tạo mạch nha (2), sấy khô trong lò (3), nghiền mạch nha đã được sấy khô này (4), ngâm ủ (5), lọc (6), đun sôi chế phẩm ủ men với sự có mặt của cây hoa bia được bổ sung vào (7), lên men với sự có mặt của men (8), oxy hoá bia (9), lọc (10), bao gói, như đóng chai, lon, hoặc đồ chứa tương tự (11), và gắn nhãn (12). Các quy trình riêng lẻ có thể được phân nhóm thành các công đoạn bao

gồm các công đoạn: sản xuất mạch nha (1-3), sản xuất chế phẩm ủ men (4-7), lên men (8-9), và sản xuất bia thành phẩm (10-12). Mặc dù minh họa phương pháp được ưu tiên, nhưng các phương pháp khác có thể được dự tính mà bỏ qua một số bước nêu trên (ví dụ, có thể bỏ qua bước lọc hoặc bước bổ sung cây hoa bia - hoặc có thể bổ sung một số bước, như bước bổ sung chất bổ trợ, đường, xiro hoặc cacbonat).

FIG.4 là hình vẽ thể hiện kết quả so sánh tổng hoạt tính của LOX trong các hạt nảy mầm thể hệ M3 (Fig.4A), thể hệ M4 (Fig.4B), và thể hệ M5 (Fig.4C). Các hoạt tính này đo được trong các dịch chiết của các phôi phân lập được từ các hạt nảy mầm của đột biến A689 có null-LOX kép, đột biến D112 có null-LOX-1 và dòng nhân giống Ca211901 null-LOX-1. Các phân phân ước của sản phẩm chiết từ các mẫu giống nhau bị bất hoạt do nhiệt được dùng làm các mẫu đối chứng thí nghiệm [trên Fig.4C: đột biến thô D112 có null-LOX-1(*), dòng nhân giống Ca211901 null-LOX-1 (**)]. Trên hình vẽ này cũng thể hiện các kiểu gen LOX-1 và LOX-2 của các mẫu thực vật được phân tích (wt: wild-type – kiểu dại).

FIG.5 là hình vẽ thể hiện biểu đồ sắc ký phân tích HPLC dùng để phân tích đối với sự tạo ra 9-HPODE và 13-HPODE trong các phôi của lúa mạch nảy mầm được 48 giờ. Các HPODE này được phát hiện bằng cách đo mức hấp thụ ở bước sóng 234nm, với kết quả nhất định liên quan đến các đơn vị hấp thụ (absorbance units - AU). Các đỉnh của biên dạng rửa giải tương ứng với 9-HPODE và 13-HPODE được biểu thị bằng các mũi tên. Fig.5A thể hiện biểu đồ sắc ký của các mẫu chuẩn 9-HPODE và 13-HPODE. Fig.5B thể hiện biểu đồ sắc ký của HPODE được tạo ra trong các sản phẩm chiết được tạo ra từ các phôi đã nảy mầm của đột biến D112 có null-LOX-1. Fig.5C thể hiện biểu đồ sắc ký của HPODE được tạo ra trong các dịch chiết được tạo ra từ các phôi đã nảy mầm của đột biến A689, thể hệ M4, null-LOX kép.

FIG.6 là hình vẽ thể hiện biểu đồ sắc ký của phân tích HPLC dùng để phân tích đối với sự tạo ra 9-HPODE và 13-HPODE trong các hạt được tạo mạch nha ở quy mô nhỏ nảy mầm được 72 giờ. Các HPODE này được phát hiện bằng cách

đo mức hấp thụ ở bước sóng 234nm, với kết quả nhất định liên quan đến các đơn vị hấp thụ (AU). Các đỉnh của biên dạng rửa giải tương ứng với 9-HPODE và 13-HPODE được biểu thị bằng các mũi tên. Fig.6A thể hiện biểu đồ sắc ký của 9-HPODE và 13-HPODE được tạo ra trong lúa mạch kiểu đại chủng cv. Barke. Fig.6B thể hiện biểu đồ sắc ký của các HPODE được tạo ra trong các dịch chiết của các phôi của đột biến D112 có null-LOX-1. Fig.6C thể hiện biểu đồ sắc ký của các HPODE được tạo ra trong các dịch chiết của đột biến A689 có null-LOX kép, thể hệ M5.

FIG.7 là hình vẽ thể hiện lượng T2N tự do được tạo ra trong lúa mạch kiểu đại chủng cv. Power, đột biến D112 có null-LOX-1, và ba dòng của đột biến A689 có null-LOX kép tiềm năng, thể hệ M5. Trên hình vẽ này cũng biểu thị cả các kiểu gen LOX-1 và LOX-2 của các mẫu lúa mạch được phân tích (wt: wild-type- kiểu đại).

FIG.8 là hình vẽ thể hiện lượng T2N tự do được tạo ra trong các mẫu của chế phẩm ủ men sôi sản xuất được từ các hạt được tạo mạch nha ở quy mô nhỏ của lúa mạch kiểu đại cv. Power, đột biến D112 có null-LOX-1, và đột biến A689 có null-LOX kép, thể hệ M5. Trên hình vẽ này cũng thể hiện các kiểu gen LOX-1 và LOX-2 của các mẫu lúa mạch được phân tích (wt: wild-type-kiểu đại).

FIG.9 là hình vẽ thể hiện lượng của các tiền chất T2N trong các mẫu chế phẩm ủ men sôi sản xuất được từ các hạt được tạo mạch nha ở quy mô nhỏ của lúa mạch kiểu đại cv. Power, đột biến D112 có null-LOX-1 và đột biến A689 có null-LOX kép, thể hệ M5.

FIG.10 là hình vẽ thể hiện lượng tiền chất T2N trong bia được tạo ra trong thử nghiệm sản xuất bia đậm dung tích 200 lít bằng cách sử dụng mạch nha cv. Power, đột biến D112 có null-LOX-1, và đột biến A689 có null-LOX kép. Trên hình vẽ này cũng thể hiện các kiểu gen LOX-1 và LOX-2 của mạch nha được sử dụng (wt: wild-type-kiểu đại).

FIG.11 là hình vẽ thể hiện sự so sánh lượng T2N tự do trong các phần phân ước của các mẫu được chỉ định lấy trong chế phẩm ủ men sôi đậm dung

tích 200 lít, tạo ra được bằng cách sản xuất bia hoặc bằng cách tạo mạch nha hoặc ngâm ủ thông thường. Trên hình vẽ này cũng thể hiện các kiểu gen LOX-1 và LOX-2 của vật liệu thô được sử dụng (wt: wild-type-kiểu đại).

FIG.12 là hình vẽ thể hiện sự so sánh lượng tiền chất T2N trong các phân ước của mẫu được lấy từ chế phẩm ủ men sôi đậm dung tích 200 lít (xem FIG.11), hoặc tạo ra được bằng cách sản xuất bia từ lúa mạch hoặc bằng cách sử dụng bước tạo mạch nha thông thường và bước ngâm ủ. Trên hình vẽ này cũng thể hiện các kiểu gen LOX-1 và LOX-2 của vật liệu thô được sử dụng (wt: wild-type-kiểu đại).

FIG.13 là hình vẽ thể hiện các khía cạnh phát triển của T2N trong bia từ các thử nghiệm sản xuất bia dung tích 200 l, bằng cách sử dụng cây lúa mạch và các đột biến được chỉ định làm nguyên liệu. Fig.13A thể hiện các phân tích của chỉ bia được nấu bằng lúa mạch, dựa trên sự phát triển của T2N tự do trong khi bị ngưng. Mức ngưỡng vị của T2N ở 50ppt được biểu thị bằng đường nét đứt nằm ngang. Trong một thử nghiệm riêng, so sánh các lượng của tiền chất T2N trong bia tươi của bia được nấu bằng lúa mạch và bia bình thường (Fig.13B); Trên Fig.13C thể hiện các lượng T2N tự do trong bia tươi (cột màu trắng) so sánh với các lượng T2N tự do trong bia được cất giữ sau hai tuần ở 37°C (cột màu đen). Trên hình vẽ này cũng thể hiện các kiểu gen LOX-1 và LOX-2 của nguyên liệu được sử dụng (wt: wild-type-kiểu đại).

FIG.14 là hình vẽ thể hiện sự so sánh các lượng THA và các tỷ lệ trong cả bia được nấu bằng lúa mạch (FIG.14A), và trong bia sản xuất được bằng cách sử dụng mạch nha thông thường (FIG.14B). 9,12,13-THA và 9,10,13-THA lần lượt là các chất được sinh ra bởi các phản ứng từng phần chưa biết của phương pháp sử dụng LOX-1 và LOX-2.

FIG.15 là hình vẽ thể hiện sự phát triển vượt quá thời gian của vị lạ "mùi vị giấy" (FIG.15A) và "bị hóa già" (FIG.15B) trong bia được nấu bằng lúa mạch ở quy mô dung tích 200 lít, bằng cách sử dụng nguyên liệu là chủng cv. Power (cột màu đen), đột biến có null-LOX-1 (cột màu nâu xám), và đột biến có null-LOX kép (cột màu trắng). Hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia đánh giá

các bia này bằng cách sử dụng thang điểm từ 0 (không có vị lạ) đến 5 (vị lạ cực nhiều).

FIG.16 là hình vẽ thể hiện làm thế nào bột phát triển trong bia được nấu bằng lúa mạch (FIG.16A), và trong bia có nguồn gốc từ mạch nha (FIG.16B). Trong cả hai thử nghiệm, bia lager thương mại được dùng làm tham chiếu (đường nét đứt đậm), so với bia được tạo ra bằng cách sử dụng vật liệu thô là chủng cv. Power (đường nét đứt mảnh), đột biến có null-LOX-1 (đường nét liền mảnh), và đột biến có null-LOX kép (đường nét liền đậm).

FIG.17 là hình vẽ thể hiện bản đồ về sự tổ chức gen di truyền của lúa mạch đối với LOX-2, dựa trên vùng kéo dài codon khởi đầu (ATG) và codon kết thúc (TAA). Trình tự 3229bp được phát hiện bao gồm 6 exon (các hộp màu đen), và 5 intron (các đường). Sự đột biến này được nhận dạng trong gen đối với LOX-2 có đột biến A689 có null-LOX kép được biểu thị bằng mũi tên thẳng đứng. Điều đáng chú ý là, đột biến A689 có null-LOX kép cũng chứa codon kết thúc dịch mã sớm trong gen đối với LOX-1 (xem đột biến D112 như được minh họa trên FIG.15 của patent Mỹ số 7420105).

FIG.18 là hình vẽ thể hiện làm thế nào phân tích kiểu gen mà có thể được sử dụng để nhận dạng các đột biến có null-LOX. Sự tập trung liên quan đến sự phát hiện cây lúa mạch có null-LOX kép nhờ trợ giúp của SNP, tức là cách để đạt được sự phát hiện tổ hợp của đột biến G→A ở vị trí 3474 của gen LOX-1, và đột biến G→A ở vị trí 2689 của gen LOX-2. FIG.18A thể hiện biểu đồ điện di trên gel agarosa của các đoạn PCR được mở rộng tạo ra khuôn mẫu ADN bằng cách sử dụng các cặp đoạn mồi được chỉ ra, tức là gen LOX-2 kiểu dại có thể được mở rộng bằng cách sử dụng các đoạn mồi FL1035 và FL1039, trong khi gen của đột biến có null-LOX-2 có thể được mở rộng bằng cách sử dụng các đoạn mồi FL1034 và FL1039. FIG.18B thể hiện dưới dạng biểu đồ để minh họa cách các PCR với cặp đoạn mồi FL820 và FL823 (chứa bazơ 3' hỗ trợ cho sự đột biến đặc hiệu null-LOX-1 như được thể hiện bằng dấu hoa thị), và cặp đoạn mồi FL1034 (chứa bazơ 3' hỗ trợ cho sự đột biến có null-LOX-2 như được minh họa bằng dấu hoa thị) và FL1039 lần lượt có thể sinh ra các sản phẩm PCR 166bp và

200bp, được tạo ra với sự có mặt của các thể đột biến có null-LOX nêu trên. FIG.18C thể hiện kết quả sau khi điện di trên gel agarosa của ADN chỉ thị (các làn 1 và 4), và kết quả sau khi điện di trên gel agarosa của ADN được mở rộng bởi PCR của đột biến A689 có null-LOX kép bằng cách sử dụng tổ hợp các đoạn mồi nêu trên để phát hiện các sự đột biến có null-LOX-1 và null-LOX-2 (làn 2). Các phản ứng PCR của lúa mạch kiểu dại không thu được các sản phẩm PCR tương ứng (làn 3).

FIG.19 là hình vẽ thể hiện ví dụ về việc phân tích các cây con cháu thu được từ sự lai chéo với lúa mạch có null-LOX kép nhờ trợ giúp của SNP. FIG.19 A thể hiện dưới dạng sơ đồ bằng cách sử dụng các tổ hợp đoạn mồi được chi tiết hóa trong chú giải theo FIG.18 trên đây, tức là các đoạn mồi để phát hiện các sự đột biến có null-LOX-1 và LOX-2 trên cơ sở PCR. Làn thứ nhất từ bên trái – với mẫu băng "a", như được chú thích dưới làn này – không chứa sản phẩm PCR đặc hiệu với sự có mặt của hai đột biến [tức là cả hai vùng khuôn mẫu có các trình tự kiểu dại (W)], trong khi làn tiếp theo với mẫu băng "b" làm nổi bật sản phẩm PCR thu được từ cây có đột biến có null-LOX-1 (M). Làn thứ ba với mẫu băng "c" thu được từ cây có null-LOX-2, và trong làn thứ tư với mẫu băng "d" là cây có null-LOX kép. FIG.19 B thể hiện kết quả điện di trên gel agarosa của các kiểu gen lúa mạch kiểu dại, null-LOX-1, null-LOX-2, và null-LOX kép. Việc phân tích các mẫu băng được thể hiện trên Fig.19A, đã phát hiện ra rằng các làn 2, 6, 10, 12, 18, và 22 chứa các sản phẩm được khuếch đại từ cây mang đột biến có null-LOX-1 (được đánh dấu bằng chữ "b" bên dưới các làn này), trong khi các làn 1, 3, 9, 11, 19, 21, và 23 chứa các sản phẩm từ cây mang đột biến có null-LOX-2 (được đánh dấu bằng chữ "c" bên dưới các làn này). Các làn 7, 15, và 17 chứa các sản phẩm PCR từ cây có null-LOX kép mang đột biến gen tổ hợp LOX-1 và LOX-2 (được đánh dấu bằng chữ "d" bên dưới các làn này). Và các làn 4, 5, 8, 13, 14, 16, và 20 chứa các sản phẩm không mở rộng từ các cây mang hoặc các alen null-LOX (được đánh dấu bằng chữ "a" bên dưới các làn này), tức các cây hoang đối với các trình tự được thử nghiệm. ADN chỉ thị được tách ra trong làn được đánh dấu bằng chữ "MW".

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Trong phần mô tả, các hình vẽ, và các bảng dưới đây có sử dụng một số thuật ngữ. Để tạo ra các đặc tính kỹ thuật và các điểm yêu cầu bảo hộ, kể cả phạm vi sử dụng các thuật ngữ này, các định nghĩa sau được đưa ra:

Như được sử dụng ở đây, danh từ số ít hoặc số nhiều được sử dụng tùy thuộc vào ngữ cảnh.

Thuật ngữ "tính trạng nông học" mô tả tính trạng di truyền hoặc kiểu hình của cây đóng góp vào giá trị năng suất hoặc kinh tế của cây này. Các dấu hiệu này bao gồm sức đề kháng bệnh, kháng côn trùng, kháng virus, kháng giun tròn, chịu được hạn hán, chịu được độ mặn cao, năng suất, chiều cao của cây, số ngày cho đến khi chín, phân loại hạt (tức là phân đoạn cỡ hạt), hàm lượng nitơ trong hạt và dấu hiệu tương tự.

Thuật ngữ "trình tự nucleotit đối nghĩa" được hiểu là trình tự mà trình tự này định hướng ngược theo hướng mã hóa thông thường từ vị trí 5' đến 3' của trình tự nucleotit này. Nếu có mặt trong tế bào thực vật, thì tốt hơn nếu trình tự ADN đối nghĩa này làm giảm sự biểu hiện bình thường của trình tự nucleotit đối với gen nội sinh, và có thể làm gián đoạn việc sản sinh protein nguyên thể tương ứng. Trong cây lúa mạch, sự biểu hiện của các nucleotit đối nghĩa nói chung chỉ làm giảm sự biểu hiện mà không làm giảm sự có mặt của protein nguyên thể nêu trên.

Thuật ngữ "lúa mạch" khi đề cập đến quy trình sản xuất bia và đồ uống có nguồn gốc từ cây lúa mạch, cụ thể là khi được sử dụng để mô tả quy trình tạo mạch nha, có nghĩa là các hạt lúa mạch. Trong tất cả các trường hợp khác, trừ khi có quy định khác, "lúa mạch" có nghĩa là cây lúa mạch (*Hordeum vulgare*, L.), bao gồm dòng hoặc cây hoặc giống sinh sản bất kỳ, trong khi một bộ phận của cây lúa mạch có thể là bộ phận bất kỳ của cây lúa mạch, ví dụ, mô hoặc tế bào bất kỳ.

Thuật ngữ "kháng bệnh" có nghĩa là các cây tránh được các triệu chứng bệnh lý, các triệu chứng này là do hậu quả tương tác của các tác nhân gây bệnh

thực vật. Theo cách này, các tác nhân gây bệnh được ngăn không cho gây ra các bệnh cho cây trồng và các triệu chứng bệnh lý có liên quan. Theo cách khác, các triệu chứng bệnh lý này do tác nhân gây bệnh gây ra được làm giảm đến mức tối thiểu hoặc được làm giảm hoặc được ngăn chặn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "null-LOX kép" dùng để chỉ sự mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1 và sự mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2. Vì thế, "null-LOX kép" có thể là khác biệt bởi sự mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1 và sự mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2. Vì vậy, thuật ngữ "cây lúa mạch có null-LOX kép", là cây lúa mạch chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1 và sự đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2. Do vậy, "cây lúa mạch có null-LOX kép" có thể là khác biệt ở chỗ, mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1 và mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2. Tương tự, thuật ngữ "các hạt có null-LOX kép", là các hạt chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1 và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2. Do vậy, thuật ngữ "các hạt có null-LOX kép" có thể là khác biệt ở chỗ, mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1 và mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2.

Cây "ngũ cốc" như được xác định ở đây, là chi của họ Graminae, được trồng chủ yếu để lấy hạt chứa tinh bột. Các cây ngũ cốc bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cây lúa mạch (*Hordeum*), cây lúa mì (*Triticum*), cây lúa (*Oryza*), cây ngô (*Zea*), cây lúa mạch đen (*Secale*), cây yến mạch (*Avena*), cây lúa miến (*Sorghum*), và cây Triticale, cây lai lúa mạch-mỳ.

Thuật ngữ "đang mã hóa" hoặc "được mã hóa" trong trường hợp axit nucleic quy định có nghĩa bao gồm thông tin để dịch mã thành protein đặc hiệu. Axit nucleic hoặc polynucleotit mã hóa protein có thể chứa các trình tự không được dịch mã (ví dụ, intron) trong các vùng được dịch mã của axit nucleic này, hoặc có thể không có mặt các trình tự xen kẽ không được dịch mã này (ví dụ, trong ADN bổ trợ). Thông tin để nhờ đó protein được mã hóa được quy định bằng cách sử dụng codon.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "biểu hiện" trong trường hợp axit nucleic được hiểu là phiên mã và tích lũy ARN thông tin có nghĩa hoặc ARN đối nghĩa thu được từ một đoạn axit nucleic. Thuật ngữ "biểu hiện" được sử dụng trong trường hợp protein chỉ việc dịch mã ARN thông tin thành polypeptit.

Thuật ngữ "gen" có nghĩa là đoạn ADN tham gia vào quy trình tạo ra mạch polypeptit; gen bao gồm các vùng nằm trước và nằm sau vùng mã hóa (gen khởi đầu và gen kết thúc). Hơn thế nữa, nói chung các gen của thực vật chứa các exon bị gián đoạn bởi intron. Sau khi phiên mã thành ARN, các intron này bị loại bỏ bằng cách tách intron để tạo ra ARN thông tin trưởng thành. Thuật ngữ "các vị trí tách intron" giữa các exon thường được xác định bởi các trình tự liên ứng hoạt động như các tín hiệu tách intron đối với quy trình tách intron, bao gồm mất intron từ sản phẩm phiên mã ARN chính và nối ghép hoặc dung hợp các đầu của ARN còn lại vào một trong hai phía của intron được kích thích. Trong một số trường hợp, các dạng thay thế hoặc khác nhau của sự tách intron có thể tạo ra các protein khác nhau từ đoạn ADN duy nhất tương tự. Gen nguyên thể có thể được gọi là "gen nội sinh".

Như được sử dụng ở đây, "khác loại" chỉ axit nucleic là axit nucleic khởi nguồn từ các loài ngoại lai, hoặc, nếu từ cùng một loài, thì là loài hầu như được cải biến từ dạng nguyên thể của nó trong thành phần và/hoặc vị trí gen bởi sự can thiệp có tính toán của con người.

Thuật ngữ "sự nảy mầm" như được sử dụng ở đây có nghĩa là bắt đầu hoặc khôi phục sự sinh trưởng nhờ hạt lúa mạch trong các chế phẩm khác nhau, như đất bình thường trong tự nhiên. Vì thế, phôi đang nảy mầm là phôi được làm cho nảy mầm. Sự nảy mầm có thể cũng xảy ra trong đất đặt trong hộp trong các buồng trồng trọt loại cây này, hoặc, ví dụ, xảy ra trên giấy lọc ướt đặt trong các đĩa Petri của phòng thí nghiệm chuẩn hoặc trong khi tạo mạch nha (trong các bể ngâm hoặc hộp nảy mầm của nhà máy tạo mạch nha chẳng hạn). Nói chung, sự nảy mầm được hiểu bao gồm sự hydrat hóa hạt, làm trương nở hạt và tác động đến sự sinh trưởng của phôi. Các yếu tố môi trường tác động đến sự nảy mầm

bao gồm độ ẩm, nhiệt độ và lượng oxy. Sự phát triển của rễ và mầm được quan sát.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "được phân lập" nghĩa là vật liệu được loại ra khỏi môi trường gốc. Ví dụ, polynucleotit xuất hiện trong tự nhiên hoặc polypeptit có mặt trong cơ thể sống không được phân lập, nhưng polynucleotit hoặc polypeptit tương tự tách ra khỏi một số hoặc tất cả các chất cùng tồn tại trong hệ tự nhiên đều được phân lập. Các polynucleotit như vậy có thể là một bộ phận của vật truyền và/hoặc các polynucleotit hoặc polypeptit này có thể là một phần của chế phẩm, và cũng được phân lập vì vật truyền hoặc chế phẩm này không phải là một phần của môi trường tự nhiên.

Thuật ngữ "hạt" được xác định để bao gồm hạt ngũ cốc, cũng có nghĩa là mầm bên trong, mày ngoài và vảy. Trong hầu hết các loại lúa mạch, mày ngoài và vảy bám dính vào hạt và là một bộ phận của hạt sau khi tuốt. Tuy nhiên, các loại lúa mạch trần cũng nằm trong thuật ngữ này. Trong các trường hợp như vậy, hạt không có mày ngoài và vảy và hạt không tuốt có các bộ phận này như trong hạt lúa mì. Thuật ngữ "hạt" và "hạt nhỏ" được sử dụng ở đây có thể thay đổi cho nhau.

Thuật ngữ "sự phát triển của hạt" được dùng để chỉ giai đoạn bắt đầu với sự thụ tinh bởi tế bào phấn hoa. Trong quá trình thụ tinh các nguồn dự trữ chuyển hóa, ví dụ, đường, oligosacarit, tinh bột, nhựa phenol, axit amin, và protein được tích lũy, là có hoặc không đưa không bào đích vào các mô khác nhau trong hạt (hạt giống), nội bào tử, vỏ ngoài của hạt, hạt aloron, và vảy sừng, nhờ vậy dẫn đến sự phát triển của hạt, hạt đầy lên, và kết thúc bằng hạt (hạt giống) trưởng thành.

Thuật ngữ "mất hoàn toàn chức năng" được dùng để chỉ sự thiếu hoạt tính enzym nhất định. Vì vậy cây lúa mạch "mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1 và LOX-2" là cây lúa mạch có các hoạt tính của LOX-1 và LOX-2 không phát hiện được. Trong trường hợp của sáng chế, các hoạt tính của LOX-1 và LOX-2 được xác định bởi quy trình phân tích xác định sự tạo ra 9-HPODE và 13-HPODE từ axit linoleic, thậm chí thông qua LOX-1 và LOX-2 có thể có các

hoạt tính khác. Tốt hơn, nếu sự tạo ra 9-HPODE và 13-HPODE từ axit linoleic được xác định như được mô tả trong ví dụ 4 dưới đây. Hoạt tính này cần được xác định bằng cách sử dụng các dịch chiết protein của phôi đã nảy mầm. Trong trường hợp của sáng chế, sự nảy mầm trên đỉnh biểu đồ sắc ký tương ứng với đỉnh chuẩn của 9-HPODE được thể hiện trên FIG.5A nhưng với lượng nhỏ hơn 5%, tốt hơn là nhỏ hơn 3%, và/hoặc đỉnh tương ứng với đỉnh chuẩn của 13-HPODE được thể hiện trên FIG.5A nhưng với lượng nhỏ hơn 5%, tốt hơn là nhỏ hơn 3%, nếu bằng cách sử dụng axit linoleic làm chất nền, được coi là không phát hiện được hoạt tính của LOX-1 và LOX-2, nếu bằng cách sử dụng phép phân tích được mô tả trong ví dụ 4. Các phương pháp phân tử để có được sự mất hoàn toàn hoạt tính chức năng của LOX bao gồm sự phát sinh các đột biến hoặc gây ra sự thiếu hoàn toàn các bản phiên mã đối với enzym nêu trên, hoặc sự thiếu hoàn toàn enzym đã được mã hóa tương ứng, hoặc các đột biến làm bất hoạt hoàn toàn enzym đã được mã hóa.

Thuật ngữ "hoạt tính của LOX-1" được dùng để chỉ hoạt tính enzym của enzym LOX-1 của lúa mạch. Cụ thể, trong trường hợp của sáng chế, "hoạt tính của LOX-1" là sự dioxy hóa axit linoleic thành 9-HPODE được xúc tác bởi enzym, và thành 13-HPODE với mức độ nhỏ hơn rất nhiều. Mặc dù enzym LOX-1 có khả năng xúc tác các phản ứng khác, nhưng đối với mục đích xác định hoạt tính của LOX-1 theo sáng chế, thì chỉ cần xem xét đến 9- HPODE và 13-HPODE tạo ra các hoạt tính này. FIG.2 phác họa phương pháp sinh hóa trong đó axit linoleic được chuyển hóa thành 9-HPODE.

Thuật ngữ "hoạt tính của LOX-2" được dùng để chỉ hoạt tính enzym của enzym LOX-2 của lúa mạch. Cụ thể, trong trường hợp của sáng chế, "hoạt tính của LOX-2" là sự dioxy hóa axit linoleic thành 13-HPODE được xúc tác bởi enzym, và thành 9-HPODE với mức độ nhỏ hơn rất nhiều. Mặc dù enzym LOX-2 có khả năng xúc tác các phản ứng khác, nhưng đối với mục đích xác định hoạt tính của LOX-2 theo sáng chế, thì chỉ cần xem xét đến 13- HPODE và 9-HPODE tạo ra các hoạt tính này. FIG.2 phác họa phương pháp sinh hóa, trong đó axit linoleic được chuyển hóa thành 13-HPODE.

Thuật ngữ "đồ uống từ mạch nha" hoặc thuật ngữ "đồ uống có nguồn gốc từ mạch nha" được dùng để chỉ đồ uống được tạo ra bằng cách sử dụng mạch nha, tốt hơn nếu đồ uống này được tạo ra bằng phương pháp bao gồm bước ủ mạch nha với nước nóng. Ví dụ, đồ uống sản xuất từ mạch nha có thể là bia hoặc đồ uống từ mạch nha.

Thuật ngữ "đồ uống từ mạch nha được lên men" được dùng để chỉ đồ uống từ mạch nha được lên men, tức là được ủ bằng nấm men.

Thuật ngữ "tạo mạch nha" là dạng đặc biệt của sự nảy mầm hạt lúa mạch xảy ra trong điều kiện môi trường được kiểm soát - bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bể ngâm hoặc hộp nảy mầm của nhà máy tạo mạch nha. Theo quy trình của sáng chế, việc tạo mạch nha bắt đầu xảy ra trong khi và/hoặc sau khi ngâm hạt lúa mạch. Quy trình tạo mạch nha có thể được dừng lại bằng cách sấy khô các hạt lúa mạch, ví dụ, quy trình sấy khô trong lò. Trong trường hợp mạch nha không được sấy khô trong lò, thì có nghĩa là "mạch nha xanh". Chế phẩm mạch nha sản xuất được từ lúa mạch có null-LOX kép được hiểu bao gồm mạch nha chứa null-LOX kép, như mạch nha tinh khiết có null-LOX kép hoặc hỗn hợp mạch nha bất kỳ chứa mạch nha có null-LOX kép. Mạch nha có thể được chế biến, ví dụ, bằng cách nghiền, trong trường hợp đó có thể gọi là "mạch nha bột" hoặc "bột mạch nha".

"Ngâm ủ" là việc ủ mạch nha nghiền trong nước. Tốt hơn, nếu việc ngâm ủ được thực hiện ở nhiệt độ quy định và dung tích nước quy định. Nhiệt độ và dung tích nước là các yếu tố quan trọng vì chúng ảnh hưởng đến mức độ làm giảm hoạt tính của enzym thu được từ mạch nha, và nhờ đó có thể xảy ra quá trình thủy phân tinh bột một cách đặc biệt. Tác động của proteaza có thể cũng là quan trọng. Việc ngâm ủ có thể xảy ra với sự có mặt của chất bổ trợ, chất này được hiểu bao gồm nguồn hydrat cacbon bất kỳ khác với mạch nha, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, lúa mạch (kể cả lúa mạch có null-LOX kép), xiro lúa mạch, hoặc ngô, hoặc lúa - hoặc dưới dạng nguyên hạt hoặc các sản phẩm đã qua xử lý giống như hạt nghiền hoặc tinh bột, về nguyên tắc tất cả các chất bổ trợ nêu trên có thể được sử dụng làm nguồn dịch chiết bổ sung (xiro thường

được định liều trong khi đun sôi chế phẩm ủ men). Các yêu cầu về việc xử lý đối với chất bổ trợ trong nhà ủ bia phụ thuộc vào trạng thái và loại chất bổ trợ được sử dụng và cụ thể là nhiệt độ gelatin hoá hoặc nhiệt độ hóa lỏng của tinh bột. Nếu nhiệt độ gelatin hoá cao hơn nhiệt độ saccharit hóa mạch nha thông thường, thì sau đó tinh bột được gelatin hoá và được hóa lỏng trước khi bổ sung vào chế phẩm ngâm ủ.

"Đột biến" bao gồm đột biến do mất đoạn, thêm đoạn, thay thế đoạn, chuyển đoạn và đột biến điểm trong các vùng mã hóa và không mã hóa của gen. Mất đoạn có thể là toàn bộ gen hoặc chỉ là một phần của gen, trong đó tốt hơn nếu vùng không mã hóa là vùng khởi đầu, hoặc vùng kết thúc hoặc là các intron. Các đột biến điểm có thể liên quan đến các thay đổi của một bazơ hoặc một cặp bazơ và có thể tạo ra các codon kết thúc, đột biến dịch khung hoặc thay thế axit amin. Đột biến soma là đột biến xảy ra chỉ trong các tế bào hoặc mô nhất định của cây và không được di truyền sang thế hệ tiếp theo. Đột biến dòng mầm có thể được phát hiện trong tế bào thực vật bất kỳ và không được di truyền. Theo FIG.1 ở đây - thể hiện một cách khái quát về cách các hạt lúa mạch đột biến có thể được nhân giống trong chương trình nhân giống - các hạt thế hệ M3, và các hạt của chúng được nhân giống một cách trực tiếp, hoặc thế hệ tiếp theo bất kỳ, kể cả các cây của chúng, có thể được gọi là "đột biến thô". Hơn nữa, vẫn theo FIG.1 ở đây, thuật ngữ "dòng nhân giống" được dùng để chỉ các hạt thế hệ M4, và thế hệ tiếp theo bất kỳ, kể cả các cây của chúng, có thể là kết quả của việc lai chéo với cây trồng, hoặc có thể là kết quả của việc lai chéo với dòng nhân giống khác với tính trạng đặc hiệu.

Thuật ngữ "null-LOX" được dùng để chỉ sự có mặt của đột biến trong gen mã hóa LOX, làm mất hoàn toàn chức năng của enzym đã được mã hóa LOX (LOX-1 hoặc LOX-2). Các đột biến tạo ra các codon kết thúc (vô nghĩa) sớm trong gen mã hóa LOX là chỉ một cơ chế mà nhờ đó có thể làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX. Các phương pháp phân tử để làm mất hoàn toàn enzym chức năng của LOX bao gồm sự hình thành các đột biến gây ra sự thiếu hoàn toàn các bản phiên mã đối với enzym nêu trên, hoặc các đột biến gây ra sự

bất hoạt của enzym được mã hóa. Thuật ngữ "null-LOX" liên quan đến thực vật được dùng để chỉ thực vật với sự mất hoàn toàn hoạt tính chức năng của enzym LOX đặc hiệu.

Thuật ngữ "được liên kết linh hoạt" được dùng để chỉ sự liên kết của hai hoặc nhiều đoạn axit nucleic trên một polynucleotit duy nhất, sao cho chức năng của đoạn này bị ảnh hưởng bởi đoạn kia. Ví dụ, đoạn môi được liên kết linh hoạt với trình tự mã hóa khi nó có khả năng tác động đến sự biểu hiện của trình tự mã hóa này, tức là trình tự mã hóa này nằm dưới sự điều khiển phiên mã của đoạn môi. Các trình tự mã hóa có thể được liên kết linh hoạt với trình tự điều khiển theo sự định hướng có nghĩa hoặc đối nghĩa.

"PCR" hoặc "phản ứng tạo mạch polymeraza" được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến là kỹ thuật được sử dụng để mở rộng các đoạn ADN đặc hiệu (patent Mỹ số 4683195 và số 4800159 được cấp cho Mullis K.B. và các đồng tác giả).

Thuật ngữ "thực vật" hoặc "vật liệu thực vật" bao gồm các tế bào thực vật, tế bào thực vật nguyên sinh, và môi trường cấy các mô tế bào thực vật để từ đó có thể tạo lại được cây lúa mạch - bao gồm thể sần thực vật, và tế bào thực vật nguyên vẹn trong cây trồng, hoặc các bộ phận của cây trồng, như phôi, phần hoa, nõn, hoa, hạt, lá, rễ, đầu rễ, bao phấn, hoặc bộ phận hoặc sản phẩm thực vật bất kỳ.

Thuật ngữ "sản phẩm thực vật" có nghĩa là sản phẩm thu được từ việc xử lý cây hoặc một phần của cây. Vì vậy, ví dụ, sản phẩm thực vật này có thể là mạch nha, chế phẩm ủ men, đồ uống được lên men hoặc không được lên men, đồ ăn, hoặc thực phẩm.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tái tổ hợp" liên quan đến một protein là protein có nguồn gốc từ loài khác, hoặc, nếu có nguồn gốc từ cùng một loài, thì là loài được biến đổi một cách đáng kể từ dạng nguyên thể của nó trong thành phần bởi sự can thiệp có tính toán của con người.

"Hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia" theo nghĩa của sáng chế này là hội đồng chuyên gia được đào tạo toàn diện về việc ném thử vị và mô tả

hương vị bia, đặc biệt nhấn mạnh về aldehyt, mùi vị giấy, và vị cũ. Mặc dù hiện có nhiều dụng cụ phân tích để đánh giá các hợp phần vị, nhưng các hợp phần hoạt hóa vị tương đối quan trọng lại khó đánh giá bằng cách phân tích. Tuy nhiên, các tính chất phức hợp này có thể được đánh giá bởi các chuyên gia về mùi vị. Việc đào tạo liên tục họ bao gồm việc nếm thử vị và đánh giá các mẫu bia chuẩn.

Thuật ngữ "vị trí tách intron" có nghĩa là đường ranh giới giữa các exon và intron của gen. Vì vậy, vị trí tách intron có thể là biên đi từ exon đến intron (được gọi là "vị trí của chất cho"), hoặc biên tách intron ra khỏi exon (cũng có nghĩa là "vị trí của chất nhận"). Vị trí tách intron trong cây thường là các trình tự liên ứng. Nói chung, đầu 5' của intron là dinucleotit GT bảo tồn (GU trong ARN thông tin), và đầu 3' của intron thường là dinucleotit AG bảo tồn. Vì vậy, vị trí tách intron 5' intron này là đầu 5' của intron, và vị trí tách intron 3' là đầu 3' của intron. Trong phạm vi của sáng chế, tốt hơn nếu vị trí tách intron của intron là hoặc vị trí tách intron 5' là dinucleotit lớn nhất 5' của intron (nói chung dinucleotit này là GT); hoặc vị trí tách intron 3' là dinucleotit lớn nhất 3' của intron (nói chung dinucleotit này là AG).

Ngoại trừ có chỉ dẫn khác, "T2N" có nghĩa là trans-2-nonenal (T2N) dạng tự do. Đôi khi, T2N cũng được gọi là 2-E-nonenal.

Thuật ngữ "T2N tiềm năng" được mô tả là chất hóa học có khả năng giải phóng T2N, hoặc có thể được chuyển hóa thành T2N, trong một hoặc nhiều phản ứng. Trong trường hợp của sáng chế, T2N tiềm năng được xác định dưới dạng nồng độ của T2N được giải phóng vào dung dịch, ví dụ, chế phẩm ủ men hoặc bia, trong khi ủ trong thời gian 2 giờ ở 100°C, độ pH là 4,0. Trong trường hợp thực tế, nồng độ ban đầu của T2N được xác định, sau đó dung dịch này được ủ trong 2 giờ ở 100°C, độ pH là 4,0, tiếp theo xác định nồng độ của T2N. Mức chênh lệch giữa nồng độ ban đầu và nồng độ cuối của T2N được biểu thị là T2N tiềm năng. Việc xử lý bằng nhiệt, bằng axit tạo ra sự giải phóng

T2N ra khỏi T2N tiềm năng, ví dụ, ra khỏi "sản phẩm cộng T2N", thuật ngữ "sản phẩm cộng T2N" được sử dụng để mô tả T2N liên hợp với một hoặc

nhiều chất nền, kể cả, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein (các protein), sulfite, mảnh vụn tế bào, thành tế bào, hoặc chất tương tự. Nói chung, sản phẩm cộng T2N chỉ là vị lạ mà con người không cảm nhận được. Tuy nhiên, T2N được giải phóng ra khỏi sản phẩm cộng T2N nêu trên có thể làm gia tăng vị lạ hôi.

Thuật ngữ "nuôi cấy mô" chỉ chế phẩm chứa các tế bào được phân lập của cùng một hoặc nhiều kiểu khác nhau, hoặc bộ sưu tập các tế bào này được tổ chức thành các bộ phận của cây – kể cả, ví dụ, tế bào nguyên sinh, thể sần, phôi, phấn hoa, bao phấn, và bộ phận tương tự.

Thuật ngữ "biến nạp" có nghĩa đưa ADN vào cơ thể sao cho ADN được duy trì, hoặc dưới dạng phần tử ngoài nhiễm sắc thể (không có tính di truyền gắn liền và ổn định), hoặc dưới dạng nhiễm sắc thể hòa nhập (tính di truyền ổn định). Trừ khi có chỉ dẫn khác, phương pháp được sử dụng ở đây để biến nạp *E. coli* là phương pháp dựa trên cơ sở CaCl_2 (Sambrook và Russel, nêu trên). Để biến nạp lúa mạch, thì sự biến nạp do *Agrobacterium* gây ra có thể được thực hiện – thì tốt hơn là như được mô tả bởi Tingay và các đồng tác giả (1997), hoặc Wang và các đồng tác giả (2001), ngoại trừ các cây trồng khác có thể được sử dụng làm vật chủ.

Thuật ngữ "chuyển gen" là gen được đưa vào bộ gen theo quy trình biến nạp.

Như được sử dụng ở đây, "chuyển gen" bao gồm đề cập đến tế bào đã được biến đổi bằng cách đưa axit nucleic khác loại vào, hoặc tế bào này thu được từ tế bào đã được biến đổi như vậy. Vì thế, ví dụ, tế bào chuyển gen biểu hiện các gen mà không phát hiện được ở dạng giống nhau trong dạng nguyên thể của tế bào này, hoặc biểu hiện các gen nguyên thể mà theo cách khác được biểu hiện một cách bất thường, biểu hiện dưới mức bình thường, hoặc hoàn toàn không được biểu hiện do sự can thiệp có tính toán của con người. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chuyển gen" đề cập đến cây trồng, cụ thể là cây lúa mạch, không bao hàm sự biến đổi của tế bào theo các phương pháp nhân giống cây trồng truyền thống – ví dụ, gây đột biến trên cơ sở NaN_3 , hoặc bởi các sự kiện xảy ra trong tự nhiên mà không có sự can thiệp có tính toán của con người.

"Lúa mạch đại", *Hordeum vulgare* ssp. spontaneum, được xem là tổ tiên của các dạng lúa mạch được trồng ngày nay. Sự chuyển đổi của lúa mạch từ kiểu đại đến trạng thái được trồng cây được hiểu là trùng khớp với sự thuần dưỡng cây này thành "lúa mạch trồng tự nhiên". Các cây này có sự liên quan mật thiết về mặt di truyền với loài trồng cây hiện đại so với lúa mạch đại.

Thuật ngữ lúa mạch "kiểu đại" được dùng để chỉ cây lúa mạch được sinh trưởng trong điều kiện thông thường. Tốt hơn, nếu thuật ngữ này được dùng để chỉ cây lúa mạch để từ đó thu được cây lúa mạch theo sáng chế, tức là cây bố-mẹ. Nói chung, các hạt lúa mạch kiểu đại được mua từ các công ty giống như "cây trồng" hoặc "giống cây trồng" - tức là các hạt này giống nhau về mặt di truyền được các tổ chức nhân giống quốc gia liệt kê. Mặc dù hiện có một số giống cây lúa mạch có null-LOX-1 (ví dụ, cvs. Chamonix và Charmay), nhưng với mục đích hiểu rõ hơn sáng chế, thì tất cả các cây có null-LOX-1, null-LOX-2, và null-LOX kép ở đây được coi là các cây đột biến, và không là các cây "kiểu đại". Thuật ngữ "cây trồng" và "giống cây trồng" được sử dụng ở đây có thể thay đổi cho nhau.

Thuật ngữ "chế phẩm ủ men" có nghĩa là dịch chiết mạch nha lỏng, ví dụ, chế phẩm mạch nha nghiền hoặc mạch nha xanh hoặc mạch nha xanh nghiền. Khi sản xuất bia bằng lúa mạch, chế phẩm ủ men cũng được tạo ra bằng cách ủ dịch chiết của lúa mạch chưa được tạo mạch nha với hỗn hợp enzym thủy phân các hợp phần của lúa mạch này. Ngoài loại mạch nha hoặc các dịch chiết có nguồn gốc từ mạch nha nêu trên, dịch chiết lỏng có thể được tạo ra từ mạch nha và các thành phần bổ sung, như chất chứa tinh bột bổ sung một phần được chuyển hóa thành đường có thể ủ men. Nói chung, chế phẩm ủ men thu được bằng cách ngâm ủ, tùy ý, tiếp theo là "sục khí", tức là quy trình chiết đường cạn và các hợp chất khác ra khỏi hạt đã sử dụng sau khi ngâm ủ với nước nóng. Việc sục khí thường được thực hiện trong thiết bị tách, bộ lọc ngâm ủ, hoặc thiết bị khác cho phép tách chất lỏng chiết ra khỏi hạt đã sử dụng. Chế phẩm ủ men thu được sau khi ngâm ủ nói chung được gọi là "chế phẩm ủ men thứ nhất", trong khi chế phẩm ủ men thu được sau khi sục khí nói chung được gọi là "chế phẩm ủ

men thứ hai". Nếu không có quy định khác, thuật ngữ chế phẩm ủ men có thể là chế phẩm ủ men thứ nhất, chế phẩm ủ men thứ hai hoặc hỗn hợp của cả hai chế phẩm này. Nói chung, trong sản xuất bia chế phẩm ủ men được đun sôi cùng với cây hoa bia. Chế phẩm ủ men được tạo ra mà không đun sôi cùng với cây hoa bia có thể cũng được gọi là "chế phẩm ủ men ngọt", trong khi chế phẩm ủ men được đun sôi có hoặc không có cây hoa bia có thể được gọi là "chế phẩm ủ men sôi".

Cây lúa mạch

Cây lúa mạch là họ thực vật. “Lúa mạch đại”, *Hordeum vulgare* ssp. spontaneum, được xem là tổ tiên của các dạng lúa mạch được trồng ngày nay. Sự chuyển đổi của lúa mạch từ loài đại đến trạng thái được trồng cấy được hiểu là trùng khớp với sự thay đổi căn bản của các tần suất alen ở rất nhiều vị trí (locus). Các alen hiếm và các trường hợp đột biến mới được chọn dương tính bởi những nông dân nhanh chóng thiết lập các dấu hiệu mới trong quần thể cây được trồng cấy, có nghĩa là "lúa mạch trồng tự nhiên". Các cây này có sự liên quan mật thiết về mặt di truyền với loài trồng cấy hiện đại so với lúa mạch đại. Cho đến cuối thế kỷ 19, cây lúa mạch trồng tự nhiên tồn tại dưới dạng hỗn hợp rất khác kiểu của các dòng nội phối và lai phân ly, kể cả một số cây thu được từ cây lai ngẫu nhiên trong các thế hệ trước. Hầu hết các cây lúa mạch trồng tự nhiên được di chuyển tới các vùng canh tác tiên tiến nhờ cây trồng dòng thuần khiết. Các mức gen đa dạng trung gian hoặc cao đặc trưng cho các cây lúa mạch trồng tự nhiên còn lại. Ban đầu, cây "lúa mạch hiện đại" biểu thị sự chọn lọc từ các cây lúa mạch trồng tự nhiên. Sau đó, cây này thu được từ các chu trình nối tiếp nhau giữa các dòng thuần đã ổn định, như các dòng có nguồn gốc địa lý khác nhau. Cuối cùng, kết quả là sự thu hẹp dễ thấy bazơ của gen trong nhiều, có lẽ là trong tất cả các vùng canh tác tiên tiến. So với các cây lúa mạch trồng tự nhiên, cây lúa mạch hiện đại có một số tính chất được cải thiện (Nevo, 1992; von Bothmer và các đồng tác giả, 1992), ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở:

- (i) hạt có vỏ và hạt trần;
- (ii) trạng thái ngủ của hạt;
- (iii) kháng bệnh;

- (iv) dung nạp môi trường (ví dụ, hạn hán hoặc độ pH của đất);
- (v) tỷ lệ giữa lysin và các axit amin khác;
- (vi) hàm lượng protein;
- (vii) hàm lượng nitơ;
- (viii) thành phần hydrat cacbon;
- (ix) hàm lượng và thành phần horđein;
- (x) hàm lượng (1-3,1-4)- β -Glucan và arabinoxylan;
- (xi) sản lượng;
- (xii) độ bền vững của rơm;
- (xiii) chiều cao của cây.

Theo sáng chế, thuật ngữ "cây lúa mạch" bao gồm cây lúa mạch bất kỳ. Vì vậy, sáng chế đề cập đến cây lúa mạch bất kỳ chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1 và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2. Vì vậy, sáng chế đề cập đến cây lúa mạch bất kỳ chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1 và cây lúa mạch bất kỳ chứa đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2.

Tuy nhiên, cây lúa mạch được ưu tiên sử dụng theo sáng chế là cây lúa mạch hiện đại hoặc thuộc dòng thuần. Ví dụ, cây lúa mạch cần được sử dụng theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm Sebastian, Celeste, Tangent, 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 và Jersey, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm bao gồm Haruna Nijo, Sebastian, Celeste, Lux, Prestige, Saloon, Neruda và Power, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm bao gồm 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 và Jersey, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm bao gồm Haruna Nijo, Sebastian, Tangent, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Power, Quench, NFC Tipple, Barke, Class và Vintage.

Do đó, theo một phương án của sáng chế, cây lúa mạch nêu trên là cây lúa mạch hiện đại (tốt hơn là cây này được chọn từ nhóm bao gồm cây lúa mạch được mô tả trên đây) chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1, như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2, như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2. Theo phương án này, tốt hơn nếu cây lúa mạch này không phải là lúa mạch trồng tự nhiên.

Cây lúa mạch này có thể ở dạng thích hợp bất kỳ. Ví dụ, cây lúa mạch theo sáng chế có thể là cây lúa mạch tươi, khô, cây đồng thể, hoặc hạt lúa mạch nghiền. Cây này có thể là cây trưởng thành, phôi, hạt nảy mầm, hạt được tạo mạch nha, bột hạt mạch nha hoặc dạng tương tự.

Các bộ phận của cây lúa mạch có thể là bộ phận thích hợp bất kỳ của cây, như các hạt, phôi, lá, thân, rễ, hoa hoặc các phần của nó. Ví dụ, phần này có thể là một phần của hạt, phôi, lá, thân, rễ hoặc hoa. Các bộ phận của cây lúa mạch có thể cũng là một phần đồng thể, hoặc một phần của cây hoặc hạt lúa mạch nghiền.

Theo một phương án của sáng chế, các bộ phận của cây lúa mạch có thể là các tế bào của cây lúa mạch nêu trên, tốt hơn là các tế bào sống có thể được nhân giống *in vitro* trong các mô cấy. Cụ thể, theo một phương án các tế bào nêu trên có thể là các tế bào không có khả năng sinh trưởng thành cây lúa mạch hoàn chỉnh, tức là các tế bào này không phải là tế bào sinh sản.

Sự mất chức năng hoạt tính của LOX

Sáng chế đề cập đến cây lúa mạch – hoặc bộ phận của nó, hoặc các sản phẩm thực vật của nó – cây này chứa đột biến thứ nhất và thứ hai, trong đó đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1, và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2. Ví vậy, ví dụ, đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2.

Sự mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-1 (như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, và sự mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của LOX-2 (như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2), độc lập có thể dựa trên các cơ chế khác nhau. Ví dụ, sự mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của một hoặc cả hai LOX-1 và LOX-2 có thể là do các protein làm việc sai chức năng gây ra, tức là protein làm việc sai chức năng LOX-1 và/hoặc LOX-2, như protein LOX-1 được đột biến với hoạt tính tạo ra 9-HPODE không phát hiện được (ví dụ, xác định được như được mô tả trong ví dụ 4), và/hoặc protein LOX-2 được đột biến với hoạt tính tạo ra 13-HPODE không phát hiện được (ví dụ, xác định được như được mô tả trong ví dụ 4).

Sự mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của một hoặc cả hai hoạt tính LOX-1 và LOX-2 có thể là do không có protein LOX-1 và/hoặc LOX-2. Điều rõ ràng là, không có protein LOX-1 sẽ dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, và không có protein LOX-2 sẽ dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2. Vì vậy, tốt hơn là cây lúa mạch không chứa – hoặc chứa chỉ với lượng rất nhỏ, hoặc tốt hơn nữa là không chứa - protein LOX-1 và/hoặc protein LOX-2. Protein LOX-1 và/hoặc protein LOX-2 có thể được phát hiện bằng phương tiện thích hợp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Tuy nhiên, tốt hơn nếu protein (các protein) này được phát hiện bởi các kỹ thuật, trong đó protein LOX-1 được phát hiện bởi các kháng thể đặc thù với LOX-1 và LOX-2, như các kháng thể dòng vô tính đơn đối với LOX-1 và LOX-2. Ví dụ, các kỹ thuật nêu trên có thể là phép lai thấm protein (Western blotting) hoặc ELISA. Các kháng thể nêu trên có thể là kháng thể đơn dòng hoặc

kháng đa dòng. Tuy nhiên, tốt hơn nếu các kháng thể nêu trên là kháng thể có nguồn gốc đa dòng đa nhận biết một số epitop khác nhau lần lượt trong protein LOX-1 và protein LOX-2. Protein LOX-1 và/hoặc protein LOX-2 có thể cũng được phát hiện một cách gián tiếp, ví dụ, bằng các phương pháp xác định hoạt tính LOX-1, hoặc bằng các phương pháp xác định hoạt tính LOX-2. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, protein LOX-1 được phát hiện bằng cách sử dụng các phương pháp nêu trong ví dụ 4 của WO 2005/087934. Protein LOX-2 có thể được phát hiện theo cách tương tự, bằng cách sử dụng các kháng thể liên kết với LOX-2.

Sự mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của một hoặc cả hai hoạt tính LOX-1 và LOX-2 có thể là do không có, hoặc có rất ít, tốt hơn là không có sự biểu hiện của bản phiên mã LOX-1 và/hoặc bản phiên mã LOX-2. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận thấy rằng sự không có bản phiên mã LOX-1 hoặc bản phiên mã LOX-2 cũng sẽ lần lượt dẫn đến sự không có protein LOX-1 hoặc protein LOX-2 được dịch mã. Theo cách khác, sự mất hoàn toàn chức năng hoạt tính của một hoặc cả hai LOX-1 và LOX-2 (ví dụ, mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1 và LOX-2), có thể cũng là do sự biểu hiện của bản phiên mã LOX-1 khác thường và/hoặc bản phiên mã LOX-2 khác thường gây ra. Bản phiên mã LOX-1 và/hoặc bản phiên mã LOX-2 khác thường có thể là do sự tách intron khác thường gây ra, ví dụ, do sự đột biến ở vị trí tách intron. Vì vậy, các cây lúa mạch theo sáng chế có thể mang sự đột biến ở vị trí tách intron, như vị trí tách intron 5' hoặc vị trí tách intron 3', ví dụ, trong một hoặc tối đa hai nucleotit 5' của intron, hoặc trong một hoặc tối đa ba nucleotit 3' của intron. Ví dụ về đột biến có sự tách intron khác thường của bản phiên mã LOX-1 được mô tả là đột biến A618 trong WO 2005/087934. Sự biểu hiện của các bản phiên mã mã hóa LOX-1 hoặc LOX-2 có thể, ví dụ, được phát hiện bởi phép tách Bắc hoặc các thử nghiệm RT-PCR.

Sự mất hoàn toàn các enzym chức năng LOX-1 và LOX-2 của cây lúa mạch theo sáng chế là do các đột biến gây ra. Vì vậy, nói chung cây lúa mạch theo sáng chế có thể mang đột biến trong gen LOX-1. Sự đột biến này có thể ở

trong các vùng điều khiển, ví dụ, trong đoạn mồi hoặc trong các intron, hoặc đột biến này có thể ở trong vùng mã hóa. Tương tự, nói chung cây lúa mạch theo sáng chế có thể mang đột biến trong gen LOX-2. Đột biến này có thể ở trong các vùng điều khiển, ví dụ, trong đoạn mồi hoặc trong các intron, hoặc đột biến này có thể ở trong vùng mã hóa. Vì vậy, nguyên nhân của sự mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1 và/hoặc LOX-2 có thể cũng được phát hiện bằng cách nhận dạng các đột biến trong gen mã hóa LOX-1, hoặc trong gen mã hóa LOX-2. Các đột biến trong gen mã hóa LOX-1 có thể, ví dụ, được phát hiện bằng cách xác định trình tự gen nêu trên. Tốt hơn là, sau khi nhận dạng được sự đột biến, thì sự mất hoàn toàn chức năng được khẳng định bằng cách thử nghiệm về hoạt tính của LOX-1 và/hoặc LOX-2.

Thuật ngữ "protein LOX-1" có nghĩa là bao hàm protein LOX-1 có độ dài đầy đủ của lúa mạch theo SEQ ID NO:3 của WO 2005/087934, hoặc trong SEQ ID NO:7 của WO 2005/087934, hoặc chất đồng đẳng chức năng của nó. Vị trí hoạt tính của LOX-1 được đặt trong phần cuối C của enzym này. Cụ thể, có thể biết trước rằng vùng kéo dài các gốc axit amin 520-862, hoặc các bộ phận của nó, liên quan đến hoạt tính của LOX-1. Do đó, theo một phương án, tốt hơn nếu lúa mạch có null-LOX-1 chứa gen mã hóa dạng được đột biến của LOX-1, không có một số hoặc không có tất cả các axit amin 520-862 của LOX-1. LOX-1 được đột biến nêu trên có thể cũng không có các gốc axit amin khác, các gốc này có trong LOX-1 kiểu dại.

Do đó, lúa mạch có null-LOX kép theo sáng chế có thể chứa dạng bị cắt cụt của LOX-1, là dạng không có chức năng – như dạng bị cắt cụt đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C. Tốt hơn, nếu dạng bị cắt cụt này chứa axit amin nối tiếp nhau của LOX-1 với lượng không nhiều hơn 800, tốt hơn nữa là với lượng không nhiều hơn 750, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng không nhiều hơn 700, còn tốt hơn nữa là với lượng không nhiều hơn 690, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng không nhiều hơn 680, vẫn còn tốt hơn nữa là với lượng không nhiều hơn 670, như với lượng không nhiều hơn 665, ví dụ, với lượng không nhiều hơn 650, như với lượng không nhiều hơn 600, ví dụ, với lượng không nhiều hơn 550, như

với lượng không nhiều hơn 500, ví dụ, với lượng không nhiều hơn 450, như với lượng không nhiều hơn 425, ví dụ, với lượng không nhiều hơn 399 axit amin nối tiếp nhau của LOX-1 của SEQ ID NO:3 của WO 2005/087934. Tốt hơn, nếu dạng bị cắt cụt nêu trên chứa chỉ đầu tận cùng N của LOX-1, tốt hơn là chứa tối đa 800, tốt hơn nữa là chứa tối đa 750, thậm chí tốt hơn nữa là chứa tối đa 700, còn tốt hơn nữa là chứa tối đa 690, thậm chí còn tốt hơn nữa là chứa tối đa 680, vẫn còn tốt hơn nữa là chứa tối đa 670, thậm chí tốt hơn nữa là chứa tối đa 665 axit amin của đầu tận cùng N của SEQ ID NO:3 của WO 2005/087934, như chứa không nhiều hơn 665, ví dụ, chứa không nhiều hơn 650, như chứa không nhiều hơn 600, ví dụ, chứa tối đa 550, như chứa tối đa 500, ví dụ, chứa tối đa 450, như chứa tối đa 425, ví dụ, chứa tối đa 399 axit amin của đầu tận cùng N của SEQ ID NO:3 của WO 2005/087934.

Theo một phương án được ưu tiên, dạng bị cắt cụt có thể chứa axit amin với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 665 axit amin của SEQ ID NO:3 của WO 2005/087934.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, cây lúa mạch theo sáng chế chứa gen mã hóa LOX-1 được phiên mã thành ARN thông tin, gen này chứa codon vô nghĩa hoặc codon kết thúc nằm trước codon kết thúc của ARN thông tin của LOX-1. Codon vô nghĩa này ở đây có nghĩa là codon vô nghĩa sớm. Tốt hơn, nếu tất cả các gen mã hóa LOX-1 được phiên mã thành ARN thông tin của cây lúa mạch nêu trên chứa codon vô nghĩa sớm hoặc codon kết thúc sớm. Tốt hơn, nếu codon vô nghĩa và codon kết thúc này được đặt ở vị trí tối đa là 800, tốt hơn nữa nếu ở vị trí tối đa là 750, thậm chí tốt hơn nữa nếu ở vị trí tối đa là 700, còn tốt hơn nữa nếu ở vị trí tối đa là 690, thậm chí còn tốt hơn nữa nếu ở vị trí tối đa là 680, còn tốt hơn nữa nếu ở vị trí tối đa là 670, thậm chí còn tốt hơn nữa nếu ở vị trí tối đa là 665 codon nằm sau codon bắt đầu. Trình tự bộ gen ADN kiểu đại mã hóa LOX-1 được nêu trong SEQ ID NO:1 của WO 2005/087934 hoặc SEQ ID NO:5 của WO 2005/087934.

Theo một phương án được ưu tiên, cây lúa mạch theo sáng chế chứa gen mã hóa LOX-1, trong đó tiền ARN thông tin được phiên mã từ gen nêu trên chứa trình tự tương ứng với SEQ ID NO:2 của WO 2005/087934.

Theo một phương án rất được ưu tiên của sáng chế, gen mã hóa LOX-1 của đột biến của cây lúa mạch có null-LOX theo sáng chế chứa đột biến vô nghĩa, đột biến này tương ứng với sự thay thế G→A ở vị trí 3574 của SEQ ID NO:1 của WO 2005/087934.

Thuật ngữ "protein LOX-2" có nghĩa là protein LOX-2 có độ dài đầy đủ của lúa mạch theo SEQ ID NO:5 của công bố sáng chế này, hoặc chất đồng đẳng chức năng của nó. Vị trí hoạt tính của LOX-2 được đặt ở đầu tận cùng C của LOX-2. Cụ thể, có thể biết trước được rằng vùng kéo dài các gốc axit amin 515-717, hoặc các bộ phận của nó, liên quan đến hoạt tính của LOX-2. Dựa trên xét nghiệm cấu trúc tinh thể LOX-1 của đậu tương, trình tự biết trước kéo dài khe hở của vị trí hoạt tính của enzym LOX-2 của lúa mạch được biểu hiện bởi các gốc axit amin 515-525 và 707-717. Protein LOX-2 bị đột biến được dịch mã, tức là dạng bị cắt cụt bằng đầu tận cùng C của đột biến A689 có null-LOX của lúa mạch chứa tối đa 684 gốc, và do đó sẽ không có sự kéo dài khe hở của vị trí hoạt tính của trình tự thứ hai – làm cho nó trở nên bất hoạt. Theo một phương án của sáng chế, tốt hơn là lúa mạch có null-LOX kép theo sáng chế chứa gen mã hóa dạng đột biến của LOX-2, gen này không có một số, hoặc không có toàn bộ các axit amin 515-717 của LOX-2, tốt hơn nếu không có một số hoặc hoàn toàn không có các axit amin từ 707 đến 717. Đột biến LOX-2 nêu trên có thể cũng không có các gốc axit amin khác, các gốc này có trong LOX-2 kiểu dại.

Do đó, lúa mạch có null-LOX có thể chứa dạng bị cắt cụt của LOX-2, dạng này không là dạng chức năng, như dạng bị cắt cụt đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C. Tốt hơn, nếu dạng bị cắt cụt nêu trên chứa không nhiều hơn 800, tốt hơn nữa nếu chứa không nhiều hơn 750, thậm chí tốt hơn nữa nếu chứa không nhiều hơn 725, còn tốt hơn nữa nếu chứa không nhiều hơn 700, thậm chí còn tốt hơn nữa nếu chứa không nhiều hơn 690, vẫn tốt hơn nữa nếu chứa không nhiều hơn 684 axit amin nối tiếp nhau của LOX-2 của SEQ ID NO:5 của công bố sáng

chế này. Tốt hơn, nếu dạng bị cắt cụt chứa chỉ đầu tận cùng N của LOX-2. Do đó, tốt hơn nếu dạng bị cắt cụt nêu trên chứa tối đa 800, tốt hơn nữa là chứa tối đa 750, thậm chí tốt hơn nữa là chứa tối đa 725, còn tốt hơn nữa là chứa tối đa 700, thậm chí tốt hơn nữa là chứa tối đa 690, vẫn còn tốt hơn nữa là chứa tối đa 684 axit amin ở đầu tận cùng N của SEQ ID NO:5 của công bố sáng chế này.

Theo một phương án rất được ưu tiên, dạng bị cắt cụt chứa các axit amin nằm trong khoảng từ 1 đến 684 của SEQ ID NO:5 của công bố sáng chế này.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, cây lúa mạch chứa gen được phiên mã thành ARN thông tin đối với LOX-2, trong đó ARN thông tin này chứa codon vô nghĩa hoặc codon kết thúc nằm trước codon kết thúc của ARN thông tin của LOX-2 kiểu đại. Ở đây, codon vô nghĩa được xác định là codon vô nghĩa sớm. Tốt hơn là tất cả các gen được phiên mã thành ARN thông tin mã hóa LOX-2 của cây nêu trên chứa codon vô nghĩa hoặc codon kết thúc sớm. Tốt hơn, nếu codon vô nghĩa hoặc codon được đặt ở vị trí tối đa là 800, tốt hơn nữa nếu được đặt ở vị trí tối đa là 750, thậm chí tốt hơn nữa nếu được đặt ở vị trí tối đa là 725, còn tốt hơn nữa nếu được đặt ở vị trí tối đa là 700, thậm chí còn tốt hơn nữa nếu được đặt ở vị trí tối đa là 690, vẫn tốt hơn nữa nếu được đặt ở vị trí tối đa là 684 codon nằm sau codon bắt đầu. Trình tự của ADN bộ gen kiểu đại mã hóa LOX-2 được xác định trong SEQ ID NO:1 của công bố sáng chế này.

Theo một phương án rất được ưu tiên, gen mã hóa LOX-2 của thể được đột biến của cây lúa mạch có null-LOX chứa đột biến vô nghĩa, đột biến này tương ứng với sự thay thế G→A ở vị trí 2689 của SEQ ID NO:1.

Cây lúa mạch theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp thích hợp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, tốt hơn là bằng một trong số các phương pháp được nêu dưới đây trong phần "Tạo ra lúa mạch có null-LOX".

Theo một phương án của sáng chế, tốt hơn là cây lúa mạch có null-LOX theo sáng chế có sinh lý sinh trưởng và phát triển của hạt thực vật giống như lúa mạch kiểu đại. Do đó, tốt hơn nếu cây lúa mạch có null-LOX-1 giống như lúa

mạch kiểu đại về chiều cao của cây, số lượng nhánh gốc ở mỗi cây, thời gian bắt đầu ra hoa, và/hoặc số lượng hạt của mỗi bông.

Ngoài ra, tốt hơn nếu cây lúa mạch có null-LOX kép theo sáng chế giống như lúa mạch kiểu đại, cụ thể giống như chủng cv. Barke về chiều cao cây, thời gian trổ bông, sức đề kháng bệnh, dùng phát triển, gãy thân cây, thời gian gây ra sự đột biến, và năng suất. Trong trường hợp của sáng chế, thuật ngữ "giống như" được hiểu là sự giống nhau về số lượng $\pm 10\%$. Các thông số này có thể được xác định như được mô tả dưới đây trong ví dụ 5.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, cây lúa mạch này là cây lúa mạch trong đó các hạt của nó được Bảo tàng giống chuẩn Hoa Kỳ (American Type Culture Collection -ATCC), Nộp lưu Sáng chế, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, United States (số hiệu PTA-9640) nộp lưu ngày 4 tháng 12 năm 2008 với tên gọi "Barley, Hordeum vulgare L.; Dòng A689". Vì vậy, cây lúa mạch theo sáng chế có thể là cây lúa mạch dòng A689 (số hiệu ATCC: PTA-9640), hoặc cây lúa mạch con cháu bất kỳ của nó.

Tạo ra các đột biến của cây lúa mạch

Cây lúa mạch theo sáng chế có thể được tạo ra bằng phương pháp thích hợp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Tốt hơn, nếu cây lúa mạch theo sáng chế tạo ra bằng phương pháp bao gồm bước gây đột biến cây lúa mạch hoặc bộ phận của nó, ví dụ, hạt lúa mạch, bước tiếp theo là sàng lọc và chọn cây lúa mạch khác biệt ở chỗ, cây lúa mạch này mất hoàn toàn chức năng hoạt tính LOX-1, như mất hoàn toàn enzym LOX-1 và mất hoàn toàn hoạt tính chức năng LOX-2, như mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2. Theo một phương án được ưu tiên, cây lúa mạch này có thể được sản xuất bằng phương pháp kéo theo sự gây đột biến của cây lúa mạch, hoặc các bộ phận của nó – ví dụ, các hạt lúa mạch, trong đó cây lúa mạch này đã mang sự đột biến gây ra sự mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1. Ví dụ, cây lúa mạch này là cây lúa mạch được mô tả trong WO 2005/087934.

Theo một khía cạnh đáng quan tâm, sáng chế đề cập đến phương pháp sàng lọc mới và rất hữu hiệu cho phép nhận dạng được cây lúa mạch mang sự

đột biến làm mất hoàn toàn hoạt tính chức năng LOX-2. Phương pháp sàng lọc mới lặp lại được cho phép nhận biết cây lúa mạch không có hoặc có rất ít hoạt tính LOX-2. Phương pháp sàng lọc mới này bao gồm việc sử dụng các phôi đã nảy mầm làm vật liệu khởi đầu. Điều đáng ngạc nhiên là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc sử dụng các phôi trưởng thành làm vật liệu khởi đầu cho bước sàng lọc hoạt tính LOX-2 trên cơ sở sàng lọc nhiều tới mức 21000 phôi trưởng thành, là ít được ưa chuộng, và không phát hiện được đột biến duy nhất của lúa mạch có null-LOX-2.

Vì vậy, một dấu hiệu quan trọng của phương pháp sàng lọc mới liên quan đến việc tận dụng các phôi đã nảy mầm làm vật liệu khởi đầu để phát hiện hoạt tính của LOX-2.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất cây lúa mạch có null-LOX kép bao gồm các bước:

- (i) Tạo ra cây lúa mạch, hoặc các bộ phận của nó mất hoàn toàn hoạt tính chức năng LOX-1, như làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1; và
- (ii) Gây đột biến cây lúa mạch nêu trên, và/hoặc tế bào lúa mạch, và/hoặc mô lúa mạch, và/hoặc hạt lúa mạch, và/hoặc phôi của lúa mạch của cây lúa mạch nêu trên, nhờ đó thu được lúa mạch thể hệ M0; và
- (iii) Nhân giống cây, hạt, và/hoặc phôi của lúa mạch đã được gây đột biến nêu trên trong ít nhất 2 thế hệ, nhờ đó thu được cây lúa mạch thể hệ M_x, trong đó x là số nguyên ≥ 2 ; và
- (iv) Thu được các phôi từ các cây lúa mạch thể hệ M_x nêu trên; và
- (v) Cho các phôi này nảy mầm; và
- (vi) Xác định hoạt tính LOX-1 và LOX-2 trong các phôi đã nảy mầm, hoặc các bộ phận của nó; và
- (vii) Chọn các cây có sự mất hoàn toàn hoạt tính chức năng của LOX-1 và LOX-2 trong các phôi đã nảy mầm; và
- (viii) Phân tích về đột biến trong gen LOX-1 và trong gen LOX-2; và
- (ix) Chọn các cây mang đột biến trong gen LOX-1 và trong gen LOX-2;

nhờ đó thu được cây lúa mạch mang các đột biến trong gen đối với LOX-1 và LOX-2, làm mất hoàn toàn hoạt tính chức năng LOX-1 và mất hoàn toàn hoạt tính chức năng LOX-2.

Cây lúa mạch nêu trên có sự mất hoàn toàn hoạt tính chức năng LOX-1 có thể, ví dụ, là cây lúa mạch bất kỳ có sự mất hoàn toàn hoạt tính chức năng LOX-1 được mô tả trong WO 2005/087934, tốt hơn là đột biến D112, hoặc các cây thế hệ sau của nó.

Bước (ii) trong số các bước nêu trên có thể kèm theo bước gây đột biến vật liệu sống được chọn từ nhóm bao gồm cây lúa mạch, tế bào lúa mạch, mô lúa mạch, hạt lúa mạch, và phôi của lúa mạch – tốt hơn là được chọn từ nhóm bao gồm cây lúa mạch, hạt lúa mạch, và phôi của lúa mạch, tốt hơn nữa là hạt lúa mạch.

Việc gây đột biến có thể được thực hiện bằng phương pháp thích hợp bất kỳ. Theo một phương án, việc gây đột biến có thể được thực hiện bằng cách ủ cây lúa mạch, hoặc các bộ phận của nó – ví dụ, hạt lúa mạch, tế bào lúa mạch riêng lẻ từ lúa mạch – với chất gây đột biến. Chất gây đột biến này đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết, bao gồm, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, natri nitrua (NaN_3), etyl metansulfonat (EMS), azidoglyxerol (AG, 3-azido-1,2-propanediol), metyl nitrosoure (MNU), và maleic hydrazit (MH).

Theo một phương án khác, việc gây đột biến được thực hiện bằng cách chiếu xạ, ví dụ, bằng tia cực tím (UV) cây lúa mạch hoặc bộ phận của nó, như hạt chẳng hạn. Theo các phương án được ưu tiên của sáng chế, việc gây đột biến này được thực hiện theo phương pháp bất kỳ nêu dưới đây, trong phần "Gây đột biến bằng phương pháp hóa học". Ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về quy trình gây đột biến thích hợp được nêu trong ví dụ 2.

Tốt hơn, nếu việc gây đột biến được thực hiện theo cách sao cho tần suất kỳ vọng của đột biến mong muốn ít nhất là 0,5, như nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,9 đến 2,3 trong số 10000 hạt khi sàng lọc lúa mạch thế hệ M3. Theo một phương án được ưu tiên, việc gây đột biến được

thực hiện trên hạt lúa mạch. Hạt đã được xử lý bằng chất gây đột biến được ký hiệu là hạt thể hệ M0 (cũng xem FIG.1).

Hoạt tính của LOX có thể được xác định trong mẫu lấy từ phôi của lúa mạch nảy mầm, tốt hơn là trong dịch chiết lỏng lấy từ phôi của lúa mạch nảy mầm. Mẫu nêu trên, như dịch chiết nêu trên có thể được tạo ra từ bộ phận thích hợp bất kỳ của phôi của lúa mạch nảy mầm nêu trên. Nói chung, mẫu lúa mạch này phải được đồng nhất hóa bằng cách sử dụng phương pháp thích hợp bất kỳ trước khi chuẩn bị dịch chiết của mẫu nêu trên và xác định hoạt tính của LOX-2. Cụ thể, tốt hơn là dịch chiết protein được chiết từ phôi của lúa mạch nảy mầm, hoặc bộ phận của nó, và hoạt tính của LOX được xác định bằng cách sử dụng dịch chiết protein nêu trên. Ví dụ, việc làm đồng nhất hóa có thể được thực hiện bằng cách sử dụng lực cơ học, bằng cách lắc hoặc khuấy chẳng hạn, như bằng cách lắc với sự có mặt của hạt, như hạt thủy tinh hoặc hạt cát.

Theo một phương án được ưu tiên, phôi nảy mầm này là phôi thể hệ Mx, trong đó x là số nguyên ≥ 2 ; tốt hơn nếu x là số nguyên nằm trong khoảng từ 2 đến 10, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 8. Theo một phương án được ưu tiên, hoạt tính của LOX được xác định trong phôi của lúa mạch nảy mầm thể hệ M3, hoặc mẫu lấy được từ các phôi này, tốt hơn là các hạt lúa mạch được gây đột biến thể hệ M0 được phát triển để thu được cây lúa mạch và cây lúa mạch này được lai giống để thu được hạt lúa mạch thể hệ M1. Quy trình này được lặp lại cho đến khi thu được các hạt thể hệ M3 (cũng xem FIG.1).

Việc xác định hoạt tính của LOX có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phép phân tích thích hợp bất kỳ, tốt hơn là bằng cách sử dụng một trong số các phương pháp nêu dưới đây. Cụ thể, tốt hơn là phép phân tích đưa ra được số liệu về mức độ dioxy hóa axit linoleic thành 9-HPODE và 13-HPODE bởi LOX-1 và LOX-2. Do vậy, nói chung phép phân tích sẽ bao gồm các bước:

- (i) chuẩn bị dịch chiết protein chiết được từ phôi của lúa mạch nảy mầm hoặc bộ phận của nó; và
- (ii) chuẩn bị axit linoleic; và
- (iii) ủ dịch chiết protein nêu trên với axit linoleic nêu trên; và

(iv) đo mức độ dioxy hóa của axit linoleic thành 9-HPODE và 13-HPODE.

Tốt hơn, nếu bước (iv) của phương pháp này bao gồm việc xác định lượng 9-HPODE và 13-HPODE trong các phôi nảy mầm nêu trên, tốt hơn là trong dịch chiết protein được tạo ra từ các phôi nảy mầm nêu trên. Bước này có thể bao gồm việc xác định trực tiếp hoặc gián tiếp các lượng 9-HPODE và 13-HPODE. Tổng lượng của cả hai HPODE có thể được xác định, trong đó tốt hơn là các số đo đặc thù của 9-HPODE và 13-HPODE được tiến hành để xác nhận. Ví dụ, một phương pháp có thể là phương pháp, trong đó các dịch chiết protein từ các phôi nảy mầm được ủ với axit linoleic làm cơ chất để tạo ra 9-HPODE và 13-HPODE. Sau đó các HPODE nêu trên có thể được phát hiện bằng các phương pháp khác. Một phương pháp có thể kéo theo sự tạo ra hợp chất có thể phát hiện được, như thuốc nhuộm. Ví dụ, phương pháp này có thể là việc liên kết bằng cách oxy hóa axit 3-đimetylaminobenzoic và 3-metyl-2-benzothiazolinon hydrazon với sự có mặt của hemoglobin, được xúc tác bởi các HPODE đã được tạo ra để tạo thành thuốc nhuộm indamin, mà có thể đo được ở A₅₉₅ bằng cách sử dụng quang phổ kế. Ví dụ về phương pháp như vậy được mô tả trong các ví dụ 1 và 2 dưới đây. Bằng cách sử dụng phép phân tích này, chỉ số hấp thụ nhỏ hơn 0,2 đơn vị A₅₉₅ được coi là chỉ báo về sự không có mặt hoạt tính của LOX-1 và sự không có mặt hoạt tính của LOX-2. Tuy nhiên, một phương pháp chính xác hơn để xác định hoạt tính của LOX-1 và LOX-2 là ủ dịch chiết protein thu được từ các phôi của lúa mạch nảy mầm với axit linoleic, tiếp theo xác định hàm lượng của 9-HPODE và của 13-HPODE. Ví dụ, hàm lượng của 9-HPODE và của 13-HPODE có thể được xác định bằng cách sử dụng phép phân tích trên cơ sở HPLC.

Mức độ dioxy hóa axit linoleic thành 9-HPODE và 13-HPODE có thể được đo một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Có thể sử dụng phương pháp phát hiện bất kỳ theo sáng chế. Theo một phương án của sáng chế, các hydroperoxit của axit linoleic được phát hiện. Ví dụ, 9-HPODE và 13-HPODE có thể được

phát hiện một cách trực tiếp bằng các phương pháp sắc ký, như HPLC như được mô tả trong ví dụ 4.

Sáng chế bộc lộ các khía cạnh nhất định của quy trình chiết protein thu được từ phôi nảy mầm là rất quan trọng. Vì vậy, tốt hơn là protein được chiết bằng cách sử dụng dung dịch đệm là dung dịch axit, tốt hơn là dung dịch đệm là dung dịch axit có độ pH nằm trong khoảng từ 2 đến 6, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 5, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 4 đến 5, thậm chí còn tốt hơn nữa là có độ pH là 4,5. Tốt hơn là dung dịch đệm được sử dụng để chiết là trên cơ sở axit hữu cơ, tốt hơn nữa nếu dung dịch đệm này là dung dịch axit lactic. Tốt nhất là, dịch chiết protein được chiết bằng cách sử dụng dung dịch đệm là dung dịch axit lactic 100mM, có độ pH là 4,5.

Theo các phương án nhất định, sáng chế bộc lộ các phương pháp phát hiện cây lúa mạch có null-LOX-1 và null-LOX-2 bao gồm phản ứng của 9-HPODE và 13-HPODE với thuốc nhuộm, ví dụ, 3-metyl-2-benzothiazolinon hydrazon. Tốt hơn, nếu thuốc nhuộm nêu trên, ví dụ, 3-metyl-2-benzothiazolinon hydrazon, được bổ sung vào dịch chiết protein sau khi bổ sung axit linoleic vào. Tốt hơn, nếu thuốc nhuộm này được bổ sung vào thời điểm ít nhất là 1 phút, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 5 phút, thậm chí tốt hơn nữa nếu ít nhất là 10 phút, như từ 1 đến 60 phút, ví dụ, từ 5 đến 30 phút, như từ 10 đến 20 phút sau khi cho dịch chiết protein tiếp xúc với axit linoleic.

Các phương pháp được ưu tiên để chọn cây lúa mạch theo sáng chế được mô tả một cách chi tiết dưới đây trong ví dụ 2.

Quy trình chọn này có thể được điều chỉnh đối với quy trình phân tích trên đĩa vi chuẩn, hoặc định dạng phép phân tích cạnh tranh năng suất cao khác đã biết để cho phép sàng lọc nhanh nhiều mẫu. Tốt hơn là, ít nhất 5000, như ít nhất 7500, ví dụ, ít nhất 10000, như ít nhất 15000, ví dụ, ít nhất 20000, như ít nhất 25000 cây lúa mạch được gây đột biến được phân tích về hoạt tính của LOX-1 và LOX-2.

Việc xác định đột biến trong gen mã hóa LOX-1 có thể được xác định bằng một số phương pháp khác nhau. Ví dụ, gen LOX-1 có thể được giải trình tự hoàn toàn hoặc một phần, và trình tự này được so sánh với SEQ ID NO:1 của WO 2005/087934 hoặc SEQ ID NO:5 của WO 2005/087934. Nếu khảo sát về sự đột biến đặc hiệu, thì phân tích SNP có thể được áp dụng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có khả năng thiết kế các đoạn mồi dùng để phát hiện đột biến đặc hiệu nhất định, như đột biến tạo ra codon kết thúc sớm trong trình tự mã hóa LOX-1 (ví dụ, các codon kết thúc sớm bất kỳ được mô tả trên đây). Một ví dụ về cách thực hiện phân tích SNP được mô tả trong ví dụ 10 dưới đây, với các đoạn mồi dùng để phát hiện đột biến G→A ở vị trí nucleotit 3474 của gen LOX-1.

Việc xác định đột biến trong gen mã hóa LOX-2 có thể được xác định bằng một số phương pháp khác nhau. Ví dụ, gen LOX-2 có thể được xác định trình tự hoàn toàn hoặc một phần, và trình tự này được so sánh với SEQ ID NO:1 của công bố sáng chế này. Nếu khảo sát về đột biến đặc hiệu, thì phân tích SNP có thể được áp dụng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có khả năng thiết kế các đoạn mồi dùng để phát hiện đột biến đặc hiệu nhất định, như đột biến tạo ra codon kết thúc sớm trong trình tự mã hóa LOX-2 (ví dụ, các codon kết thúc sớm bất kỳ được mô tả trên đây). Một ví dụ về cách thực hiện phân tích SNP được mô tả trong ví dụ 10 dưới đây, dưới dạng các đoạn mồi dùng để phát hiện đột biến G→A ở vị trí nucleotit 2689 của gen LOX-2.

Phương pháp sản xuất cây lúa mạch có null-LOX trong phạm vi của sáng chế cũng bao gồm các bước (viii) và (ix), như được nêu một cách chi tiết trên đây, có thể được thực hiện trước khi thực hiện các bước (vi) và (vii), trong đó phương pháp này sẽ bao gồm các bước (i), (ii), (iii), (iv), (v), (viii), (ix), (vi), và (vii) theo thứ tự trên. Cụ thể, quy trình này có thể là trường hợp khi việc khảo sát về đột biến đặc hiệu, ví dụ, trong các cây lúa mạch con cháu của cây lúa mạch có null-LOX kép đã được nhận dạng.

Một khi cây lúa mạch có null-LOX đã được nhận dạng chứa đột biến cụ thể trong gen LOX-1 và đột biến trong gen LOX-2 (như các đột biến bất kỳ nêu

trên), thì các cây lúa mạch bổ sung với các đột biến giống nhau có thể được tạo ra bằng các phương pháp nhân giống thông thường, như các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Ví dụ, cây lúa mạch có null-LOX kép nêu trên có thể được lai ngược với cây lúa mạch khác.

Sau khi chọn cây lúa mạch hữu ích mất hoàn toàn các chức năng của LOX-1 và LOX-2, tùy ý là, một hoặc nhiều phương pháp sàng lọc bổ sung có thể được thực hiện. Ví dụ, các đột biến có thể được nhân giống tiếp theo, và các thế hệ tiếp theo có thể được nhân giống để làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1 và LOX-2.

Tiếp theo việc chọn cây lúa mạch hữu ích, cây lúa mạch này có thể được nhân giống, như nhân giống theo cách thông thường. Các phương pháp nhân giống được mô tả dưới đây trong phần "Nhân giống cây".

Các sản phẩm thực vật

Sáng chế đề cập đến đồ uống, hoặc các sản phẩm thực vật, với lượng T2N tiềm năng rất nhỏ, được tạo ra từ cây lúa mạch có null-LOX kép, hoặc các bộ phận của nó.

Vì vậy, sáng chế đề cập đến các sản phẩm thực vật, có thể là chế phẩm chứa cây lúa mạch nêu trên, hoặc các bộ phận của nó, như các sản phẩm thực vật sản xuất được từ các cây lúa mạch nêu trên, hoặc từ các bộ phận của nó. Vì cây lúa mạch nêu trên thiếu hoạt tính của LOX-1 và LOX-2, nên nói chung các chế phẩm này chứa T2N tiềm năng với lượng rất nhỏ. Các ví dụ về chế phẩm hữu ích chứa, hoặc được tạo ra từ cây lúa mạch chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn hoạt tính chức năng LOX-1 như làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, và mang đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn hoạt tính chức năng của LOX-2, như làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2, được mô tả dưới đây.

Tốt hơn, nếu chế phẩm nêu trên chứa:

- (i) T2N tự do với lượng nhỏ hơn 60%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 50%, còn tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 40%, như nhỏ

hơn 30%, tốt hơn là nhỏ hơn 20%, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10%;
và/hoặc

- (ii) T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 60%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 50%, còn tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 40%, như nhỏ hơn 30%, tốt hơn là nhỏ hơn 25%;

so với chế phẩm tương tự được tạo ra từ cây lúa mạch kiểu đại theo cách tương tự, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Mức độ giảm đặc biệt về T2N có thể khác nhau tùy thuộc vào kiểu chế phẩm. Các mức độ giảm nêu trên về T2N là thích hợp một cách cụ thể đối với các chế phẩm, trong đó chế phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm mạch nha, chế phẩm ủ men và đồ uống ngấu.

Ngoài ra, tốt hơn nếu chế phẩm nêu trên chứa:

- (i) T2N tự do với lượng nhỏ hơn 80%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 70%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 60%, như nhỏ hơn 50%;
và/hoặc
- (ii) T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 80%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 70%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 60%, như với lượng nhỏ hơn 50%;

so với chế phẩm ủ men tương tự được tạo ra từ cây lúa mạch chứa đột biến D112 theo cách tương tự được mô tả trong WO 2005/087934.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các hạt lúa mạch chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn hoạt tính chức năng của LOX-1 (như làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1), và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn hoạt tính chức năng của LOX-2 (như làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2). Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa các hạt nêu trên, và chế phẩm được tạo ra từ các hạt nêu trên, cũng như các sản phẩm thực vật được tạo ra từ các hạt nêu trên.

Đã được mô tả rằng, hoạt tính của lipoxigenaza trong các hạt lúa mạch có thể được làm giảm bởi quá trình ngâm, trong đó lúa mạch có thể được xử lý bằng nhiệt độ cao và/hoặc axit lactic. Việc xử lý này có thể có các ảnh hưởng trái ngược khác, như làm giảm các hoạt tính enzym mong muốn, ví dụ, hoạt tính

phytaza. Ngoài ra, việc xử lý như vậy chỉ làm giảm hoạt tính của lipoxygenaza từ quan điểm nếu việc xử lý bằng nhiệt này được thực hiện và vì vậy không ảnh hưởng trước khi tích lũy các sản phẩm lipoxygenaza.

Do đó, theo một phương án của sáng chế các sản phẩm thực vật được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp, trong đó các hạt lúa mạch không được cho qua bước ngâm ở nhiệt độ ít nhất là 70°C. Cũng tốt hơn, nếu các sản phẩm của sáng chế được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp, trong đó các hạt lúa mạch được cho qua bước ngâm ở nhiệt độ ít nhất là 57°C với sự có mặt của axit lactic.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm mạch nha được tạo ra từ các hạt mạch nha có null-LOX kép bằng cách tạo mạch nha. Thuật ngữ “tạo mạch nha” cần được hiểu là sự nảy mầm của các hạt mạch nha đã được ngâm trong điều kiện môi trường có kiểm soát (ví dụ, như được minh họa trên FIG.3, các bước 2 và 3).

Tốt hơn là chế phẩm mạch nha nêu trên chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 30%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 20%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 10% so với chế phẩm mạch nha sản xuất được theo cách tương tự bằng lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Tốt hơn nữa, nếu chế phẩm mạch nha nêu trên chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 60%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 50% so với chế phẩm mạch nha sản xuất được theo cách tương tự từ đột biến D112 của lúa mạch có null-LOX-1 được mô tả trong WO 2005/087934. Tốt hơn nữa, nếu chế phẩm mạch nha nêu trên chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 60%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 40%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 20%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 10% so với chế phẩm mạch nha sản xuất được theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Tốt hơn, nếu chế phẩm mạch nha nêu trên chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 60%, tốt hơn là với lượng 50% so với chế phẩm mạch nha được tạo ra theo cách tương tự từ đột biến D112 của lúa mạch có null-LOX-1 được mô tả trong WO 2005/087934. Quy trình tạo mạch nha là quy trình ngâm và làm nảy mầm có điều khiển, tiếp theo là bước sấy các hạt lúa

mạch, tốt hơn là sấy hạt lúa mạch này trong lò. Trước khi sấy, các hạt lúa mạch đã được ngâm và làm nảy mầm được gọi là “mạch nha xanh”, mạch nha này cũng là sản phẩm thực vật theo sáng chế. Quy trình này là đặc biệt quan trọng đối với việc tổng hợp rất nhiều enzym gây ra sự biến tính của các hạt, về nguyên tắc, các quy trình này khử trùng hợp các thành tế bào của nội bào tử chết để làm di chuyển các chất dinh dưỡng của các hạt và hoạt tính của các chất khử trùng hợp khác. Trong quy trình sấy tiếp theo, mùi vị và màu sắc được tạo ra là do các phản ứng hóa học nhuộm nâu. Mặc dù để sản xuất đồ uống sử dụng vật liệu khởi đầu là mạch nha, nhưng mạch nha này có thể cũng được sử dụng trong các quy trình công nghiệp khác, ví dụ, làm nguồn enzym trong công nghiệp làm bánh nướng, hoặc làm bột mạch nha, hoặc một cách gián tiếp làm xiro mạch nha, v.v..

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất chế phẩm mạch nha. Tốt hơn là, các phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) tạo ra các hạt lúa mạch có null-LOX kép;
- (ii) ngâm các hạt nêu trên;
- (iii) cho các hạt đã được ngâm nảy mầm trong điều kiện định trước;
- (iv) sấy khô các hạt đã nảy mầm này;

nhờ đó sản xuất ra chế phẩm mạch nha mất hoàn toàn hoạt tính chức năng LOX-1 và LOX-2. Ví dụ, mạch nha có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ được mô tả bởi Briggs và các đồng tác giả (1981) và Hough và các đồng tác giả (1982). Tuy nhiên, phương pháp thích hợp khác bất kỳ để sản xuất mạch nha có thể được sử dụng theo sáng chế, như các phương pháp sản xuất mạch nha đặc thù, kể cả, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phương pháp làm nóng mạch nha. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế được mô tả trong các Ví dụ 6 và 8.

Mạch nha có thể tiếp tục được xử lý, ví dụ, bằng cách nghiền. Vì vậy, sản phẩm thực vật theo sáng chế có thể là mạch nha loại bất kỳ, như mạch nha chưa được xử lý hoặc mạch nha nghiền, hoặc bột mạch nha. Do đó, mạch nha nghiền và bột mạch nha chứa các hợp phần hóa chất của mạch nha và các tế bào chết không có khả năng tái nảy mầm.

Theo một khía cạnh khác, sản phẩm thực vật theo sáng chế chứa hoặc thậm chí bao gồm xiro, như xiro lúa mạch, hoặc xiro mạch nha lúa mạch. Sản phẩm thực vật này có thể cũng là dịch chiết của lúa mạch hoặc mạch nha.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các loại sản phẩm thực vật là các chế phẩm ủ men được tạo ra từ chế phẩm mạch nha thu được từ các hạt có null-LOX kép. Các mạch nha nêu trên có thể được tạo ra từ chỉ các hạt có null-LOX kép hoặc hỗn hợp cũng chứa các hạt khác. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm ủ men được tạo ra bằng cách sử dụng lúa mạch có null-LOX kép, hoặc các bộ phận của nó, riêng lẻ hoặc được trộn với các thành phần khác.

Tốt hơn, nếu các chế phẩm ủ men nêu trên chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 30%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 20%, thậm chí với lượng nhỏ hơn 10% so với chế phẩm ủ men sản xuất được theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Tốt hơn nữa, nếu chế phẩm ủ men nêu trên chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 50% so với chế phẩm ủ men sản xuất được theo cách tương tự từ đột biến D112 của cây lúa mạch được mô tả trong WO 2005/087934. Còn tốt hơn nữa, nếu chế phẩm ủ men nêu trên chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 25% so với chế phẩm ủ men sản xuất được theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Tốt hơn nữa, nếu chế phẩm ủ men nêu trên chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 60%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 50% so với chế phẩm ủ men sản xuất được theo cách tương tự từ đột biến D112 của lúa mạch được mô tả trong WO 2005/087934.

Chế phẩm ủ men nêu trên có thể là chế phẩm ủ men thứ nhất, và/hoặc thứ hai, và/hoặc chế phẩm ủ men tiếp theo. Chế phẩm ủ men này có thể là chế phẩm ủ men ngọt, chế phẩm ủ men sôi, hoặc hỗn hợp của chúng. Chế phẩm ủ men này có thể cũng là chế phẩm ủ men lúa mạch. Nói chung, chế phẩm ủ men chứa nitor amino và hydrat cacbon lên men với hàm lượng cao, hydrat cacbon này chủ yếu là maltoza. Trên FIG.3, các bước từ 4 đến 6 minh họa phương pháp thông thường dùng để sản xuất chế phẩm ủ men từ mạch nha. Nói chung, chế phẩm ủ

men được sản xuất bằng cách tạo hỗn hợp và ủ mạch nha với nước, tức là trong quá trình ngâm ủ. Trong khi ngâm ủ, chế phẩm mạch nha/chế phẩm lỏng có thể được bổ sung vào cùng với chế phẩm bổ trợ giàu hydrat cacbon lỏng bổ sung, ví dụ, lúa mạch nghiền, cây ngô, hoặc lúa. Các chất bổ trợ ngũ cốc chưa được tạo mạch nha thường chứa rất ít hoặc không chứa các enzym hoạt tính làm cho nó trở thành chất bổ trợ quan trọng để bổ sung cùng với mạch nha hoặc các enzym ngoại sinh để tạo ra các enzym cần thiết cho việc chuyển hóa đường.

Nói chung, việc sản xuất chế phẩm ủ men được bắt đầu bằng cách nghiền mạch nha sao cho nước có thể xâm nhập sâu vào các phần tử của hạt trong giai đoạn ngâm ủ. Về cơ bản, bước ngâm ủ nêu trên là sự kéo dài quá trình tạo mạch nha với sự khử trùng hợp của chất nền bởi enzym. Trong quá trình ngâm ủ, mạch nha nghiền được ủ cùng với dịch chiết lỏng, như nước. Nói chung, nhiệt độ ủ hoặc được giữ không đổi (ngâm ủ đẳng nhiệt), hoặc được tăng lên từ từ. Trong mỗi trường hợp, các chất hòa tan được tạo ra trong quá trình tạo mạch nha và ngâm ủ được giải phóng thành dịch chiết lỏng nêu trên. Bước lọc tiếp theo tạo ra sự phân cách giữa chế phẩm ủ men và các hạt rắn còn lại, các hạt rắn cũng có nghĩa là "hạt đã sử dụng". Chế phẩm ủ men nêu trên cũng có nghĩa là "chế phẩm ủ men thứ nhất". Sau khi sục khí và lọc, có thể thu được "chế phẩm ủ men thứ hai". Các chế phẩm ủ men tiếp theo có thể được tạo ra bằng cách lặp lại quy trình này. Ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các quy trình thích hợp để tạo ra chế phẩm ủ men được Briggs và các đồng tác giả (nêu trên) và Hough và các đồng tác giả (nêu trên) mô tả.

Hoạt tính của lipoxygenaza đã được mô tả có thể được làm giảm bằng cách xử lý enzym nhờ nhiệt. Chế phẩm ủ men đã được mô tả có thể được xử lý bằng nhiệt để làm giảm hoạt tính của lipxogenaza và/hoặc bước ngâm ủ được thực hiện ở nhiệt độ cao. Tuy nhiên, ngoài việc làm giảm hoạt tính của lipoxygenaza, việc xử lý nhiệt có thể có các tác động có hại khác, như làm giảm các hoạt tính enzym khác. Ngoài ra, việc xử lý nhiệt chỉ làm giảm hoạt tính lipoxygenaza từ quan điểm nếu việc xử lý bằng nhiệt này được thực hiện và vì thế không ảnh hưởng đến sự tích lũy của các sản phẩm lipoxygenaza.

Do đó, theo một phương án, chế phẩm ủ men theo sáng chế được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp trong đó nhiệt độ ngâm ủ ban đầu không vượt quá 70°C, tốt hơn là không vượt quá 69°C, vì vậy, nhiệt độ ngâm ủ ban đầu có thể nằm trong khoảng từ 50°C đến 69°C chẳng hạn, như nằm trong khoảng từ 55°C đến 69°C, ví dụ, nằm trong khoảng từ 55°C đến 65°C. Cũng tốt hơn là chế phẩm ủ men theo sáng chế không phải chịu nhiệt độ đến 70°C hoặc cao hơn trong thời gian dài hơn 25 phút, tốt hơn là không dài hơn 20 min, tốt hơn nữa là không dài hơn 15 phút ở bước ngâm ủ. Nếu nhiệt độ ngâm ủ quá cao, thì sẽ ảnh hưởng đến hoạt tính enzym ở bước ngâm ủ và có thể làm giảm, hoặc thậm chí phá hủy, các hoạt tính enzym mong muốn, mà kết quả là làm thay đổi chất lượng của chế phẩm ủ men này.

Các chế phẩm ủ men thứ nhất, thứ hai và tiếp theo có thể được tạo hỗn hợp, và sau đó đưa vào đun sôi. Chế phẩm ủ men chưa đun sôi, hoặc chế phẩm ủ men thứ nhất tinh khiết hoặc chế phẩm ủ men hỗn hợp, cũng được gọi là "chế phẩm ủ men ngọt"; mà sau khi đun sôi có thể gọi là "chế phẩm ủ men sôi". Nếu chế phẩm ủ men cần được sử dụng trong sản xuất bia, thì cây hoa bia thường được bổ sung vào trước khi đun sôi.

Chế phẩm ủ men cũng có thể được tạo ra bằng cách ủ cây lúa mạch có null-LOX kép, hoặc các bộ phận của nó, như các hạt có null-LOX chưa được tạo mạch nha, cụ thể là các hạt có null-LOX, hoặc các bộ phận của nó chưa được tạo mạch nha, được nghiền với một hoặc nhiều enzym thích hợp, như chế phẩm enzym hoặc chế phẩm enzym hỗn hợp, ví dụ, Cereflo, Ultraflo, hoặc Ondea Pro (Novozym). Vì vậy, phương pháp sản xuất đồ uống từ chế phẩm ủ men đã được tạo ra theo cách này có thể cũng được gọi "sản xuất bia lúa mạch", và chế phẩm ủ men của nó là "chế phẩm ủ men lúa mạch", hoặc chế phẩm ủ men "được sản xuất bia bằng lúa mạch". Chế phẩm ủ men này có thể cũng được tạo ra bằng cách sử dụng hỗn hợp gồm mạch nha và cây lúa mạch chưa được tạo mạch nha, hoặc bộ phận của nó, hoặc chỉ lúa mạch chưa được tạo mạch nha, tùy ý, bổ sung vào một hoặc nhiều enzym thích hợp trong quy trình sản xuất nêu trên, cụ thể là amylaza, glucanaza [tốt hơn là (1-4)- và/hoặc (1-3,1-4)- β -glucanaza], và/hoặc

xylanaza (như arabinoxylanaza), và/hoặc proteaza, hoặc hỗn hợp enzym gồm một hoặc nhiều enzym nêu trên, ví dụ, bổ sung hỗn hợp enzym Onda Pro (Novozymes).

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, chế phẩm ủ men theo sáng chế là chế phẩm ủ men lúa mạch, như chế phẩm ủ men lúa mạch sôi, tức là chế phẩm ủ men được tạo ra bằng cách ủ các hạt có null-LOX kép chưa được tạo mạch nha (và tốt hơn là đã nghiền) với nước, tốt hơn là bằng cách ngâm ủ và sục khí. Chế phẩm ủ men lúa mạch như vậy khác biệt ở chỗ, chứa T2N và T2N tiềm năng với lượng rất nhỏ. Vì vậy, tốt hơn là chế phẩm ủ men lúa mạch nêu trên chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 40%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30% so với chế phẩm ủ men lúa mạch sản xuất được theo cách tương tự từ cây lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Tốt hơn, nếu các chế phẩm ủ men nêu trên chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 70%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 60% so với chế phẩm ủ men được tạo ra theo cách tương tự từ đột biến D112 của cây lúa mạch được mô tả trong WO 2005/087934. Ngoài ra, tốt hơn nếu chế phẩm ủ men lúa mạch nêu trên chứa T2N tự do với lượng tối đa là 0,15ppb, nếu chế phẩm ủ men nêu trên được điều chỉnh độ °p nằm trong khoảng từ 13 đến 16, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 14 đến 15, tốt hơn nữa là 14,5°p. Tốt hơn nữa, nếu chế phẩm ủ men từ cây lúa mạch nêu trên chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 40%, thậm chí với lượng nhỏ hơn 30% so với chế phẩm ủ men từ cây lúa mạch sản xuất được theo cách tương tự từ cây lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Cũng tốt hơn là, chế phẩm ủ men từ cây lúa mạch nêu trên chứa tiền chất T2N với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 40%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30% so với chế phẩm ủ men từ cây lúa mạch sản xuất được theo cách tương tự từ cây lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power.

Sáng chế cũng đề cập đến các sản phẩm thực vật có thể là thực phẩm, thức ăn, và chế phẩm chứa vật liệu thô thơm chứa cây lúa mạch có null-LOX kép, hoặc các bộ phận của nó. Ví dụ, thực phẩm này có thể là, nhưng không chỉ

giới hạn ở, các hạt lúa mạch đã được tạo mạch nha hoặc chưa được tạo mạch nha, bột lúa mạch, bánh mỳ, cháo đặc, hỗn hợp ngũ cốc chứa lúa mạch, các sản phẩm bồi bổ sức khỏe, như đồ uống lúa mạch, xiro lúa mạch, và các chế phẩm từ cây lúa mạch được tạo thành tấm, nghiền hoặc ép đùn. Các chế phẩm ủ men thức ăn, ví dụ, bao gồm chế phẩm chứa các hạt và/hoặc bột lúa mạch. Các chế phẩm chứa vật liệu thô thơm được mô tả dưới đây.

Sáng chế cũng đề cập đến hỗn hợp của các chế phẩm theo sáng chế. Ví dụ, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm được tạo ra bởi hỗn hợp gồm:

- (i) chế phẩm chứa cây lúa mạch, hoặc bộ phận của nó, chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn hoạt tính chức năng LOX-1, như làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn hoạt tính chức năng LOX-2, như làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2; và
- (ii) chế phẩm mạch nha được tạo ra từ các hạt có null-LOX kép.

Theo một khía cạnh được ưu tiên, sáng chế đề cập đến đồ uống, được ưu tiên hơn là mạch nha, thậm chí được ưu tiên hơn nữa là đồ uống lên men, như đồ uống mạch nha lên men, tốt hơn là đồ uống chứa cồn, như bia có chất lượng tạo cảm giác ổn định, trong đó đồ uống này được tạo ra bằng cách sử dụng lúa mạch có null-LOX kép, hoặc các bộ phận của nó. Do đó, theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, tốt hơn là đồ uống này được tạo ra bằng cách lên men lúa mạch có null-LOX kép, hoặc các bộ phận của nó, hoặc các dịch chiết của nó, ví dụ bằng cách lên men chế phẩm ủ men được tạo mạch nha có null-LOX kép, riêng biệt hoặc kết hợp với các thành phần khác.

Tuy nhiên, theo các phương án khác của sáng chế, đồ uống này là đồ uống không lên men, ví dụ, chế phẩm ủ men, tốt hơn là chế phẩm ủ men này được tạo ra từ mạch nha có null-LOX kép. Cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là đồ uống có thể được tạo ra từ cây lúa mạch chưa được tạo mạch nha, hoặc bộ phận của nó.

Đồ uống này có thể là đồ uống không chứa cồn, như bia không chứa cồn hoặc các loại đồ uống khác không chứa cồn, như đồ uống mạch nha không chứa cồn, như đồ uống mạch nha.

Tuy nhiên, tốt hơn là đồ uống nêu trên được tạo ra từ các hạt lúa mạch có null-LOX kép. Tốt hơn nữa, nếu đồ uống nêu trên là bia. Bia này có thể cũng là loại bia mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Theo một phương án, ví dụ, bia này là bia đậm (bia lager). Tốt hơn là, bia này được nấu bằng cách sử dụng chế phẩm mạch nha chứa lúa mạch có null-LOX kép đã nảy mầm, tốt hơn nữa là bia này dành riêng được tạo ra từ lúa mạch có null-LOX kép đã nảy mầm. Tuy nhiên, chế phẩm mạch nha này có thể cũng chứa các hợp phần khác, ví dụ, các hạt ngũ cốc khác đã nảy mầm hoặc chưa nảy mầm, như lúa mạch kiểu đại, lúa mạch có null-LOX-1, lúa mì và/hoặc lúa mạch đen, hoặc các vật liệu thô khác chưa nảy mầm bao gồm đường, hoặc các chế phẩm thu được từ vật liệu thô đã được tạo mạch nha hoặc chưa được tạo mạch nha, kể cả các chế phẩm xiro. Tuy nhiên, tốt hơn là toàn bộ cây lúa mạch, như toàn bộ lúa mạch đã được tạo mạch nha và/hoặc chưa được tạo mạch nha và/hoặc lúa mạch đã nảy mầm hoặc chưa nảy mầm được sử dụng để sản xuất bia nêu trên mà tốt hơn là cây lúa mạch có null-LOX kép.

Theo một phương án được ưu tiên, đồ uống theo sáng chế là bia sản xuất được từ chế phẩm ủ men được tạo ra từ mạch nha đã được sấy khô, tốt hơn là bằng cách ngâm ủ và tùy ý, bằng cách sục khí. Bia này ở đây có thể cũng được gọi là "bia được tạo mạch nha". Tuy nhiên, đồ uống theo sáng chế có thể cũng là bia được tạo ra từ chế phẩm ủ men từ lúa mạch. Bia này cũng được gọi là "bia lúa mạch".

Theo một phương án được ưu tiên, đồ uống theo sáng chế chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 35%, như nhỏ hơn 30% so với lượng T2N tiềm năng của đồ uống sản xuất được theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Cũng tốt hơn là, đồ uống theo sáng chế chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 70%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 60%, như nhỏ hơn 50% so với

đồ uống sản xuất được theo cách tương tự từ đột biến D112 của lúa mạch có null-LOX-1 được mô tả trong WO 2005/087934. Cũng tốt hơn là, các đồ uống theo sáng chế chứa T2N tiềm năng với lượng tối đa là 2ppb, tốt hơn nữa nếu với lượng tối đa là 1,5ppb, như tối đa là 1ppb nếu độ °p trong dịch chiết ban đầu, trong đó đồ uống này trên cơ sở được điều chỉnh để độ °p nằm trong khoảng từ 10 đến 12°p, tốt hơn nữa là 11°p.

Theo một phương án được ưu tiên, đồ uống theo sáng chế chứa tiền chất T2N với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 35%, như với lượng nhỏ hơn 30% so với lượng tiền chất T2N của đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Cũng tốt hơn là đồ uống theo sáng chế chứa tiền chất T2N với lượng nhỏ hơn 70%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 60%, như nhỏ hơn 50% so với đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ đột biến D112 của lúa mạch được mô tả trong WO 2005/087934. Cũng tốt hơn là đồ uống theo sáng chế chứa tiền chất T2N với lượng tối đa là 2ppb, tốt hơn nữa nếu với lượng tối đa là 1,5 ppb, như tối đa là 1 ppb nếu độ °p trong dịch chiết ban đầu, trong đó đồ uống này trên cơ sở được điều chỉnh để độ °p nằm trong khoảng từ 10 đến 12°p, tốt hơn nữa là đến 11°p.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, đồ uống này là bia chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 35% so với T2N tiềm năng của bia lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Theo phương án này, cũng tốt hơn là bia lúa mạch nêu trên chứa tiền chất T2N với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 35% so với tiền chất T2N của bia lúa mạch sản xuất được theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Theo phương án này, cũng tốt hơn là bia lúa mạch theo sáng chế chứa T2N tiềm năng với lượng tối đa là 2 ppb, tốt hơn nữa là với lượng tối đa 1,5 ppb, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng tối đa 1,2 ppb. Theo phương án này, tốt hơn nữa là bia lúa mạch theo sáng chế chứa tiền chất T2N với lượng tối đa là 2 ppb, tốt hơn nữa là với lượng tối đa 1,5 ppb, thậm chí tốt hơn nữa là với

lượng tối đa 1,2 ppb nếu độ °p trong dịch chiết ban đầu, trong đó đồ uống này trên cơ sở được điều chỉnh để độ °p nằm trong khoảng từ 10 đến 12°p, tốt hơn nữa là đến 11°p.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, đồ uống này là bia được tạo ra từ mạch nha, trong đó bia này chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30% so với T2N tiềm năng được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Theo phương án này, cũng tốt hơn là bia nêu trên chứa tiền chất T2N với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30% so với tiền chất T2N của bia được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Theo phương án này, cũng tốt hơn là bia theo sáng chế chứa T2N tiềm năng với lượng tối đa là 2 ppb, tốt hơn nữa là với lượng tối đa 1,5 ppb, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng tối đa 1 ppb. Theo phương án này, được ưu tiên hơn nữa là bia theo sáng chế chứa tiền chất T2N với lượng tối đa là 2 ppb, tốt hơn nữa là với lượng tối đa 1,5 ppb, tốt hơn nữa là với lượng tối đa 1 ppb nếu độ °p trong dịch chiết ban đầu, trong đó đồ uống này trên cơ sở được điều chỉnh để độ °p nằm trong khoảng từ 10 đến 12°p, tốt hơn nữa là đến 11°p.

"Chất lượng tạo cảm giác" có nghĩa là chất lượng thỉnh cầu cảm nhận về khứu giác và vị giác của con người. Ví dụ, chất lượng này được phân tích bởi Hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia được đào tạo. Tốt hơn là, Hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia được đào tạo một cách đặc biệt để nhận dạng vị lạ của aldehyt, như T2N. Nói chung, Hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia sẽ bao gồm từ 3 đến 30 thành viên, ví dụ, từ 5 đến 15 thành viên, tốt hơn là từ 8 đến 12 thành viên. Hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia có thể đánh giá các mùi vị hiện có khác nhau, như vị lạ do giấy, vị lạ do oxy hóa, do ngấu, và nhiều vị lạ. Liên quan đến sáng chế này, tốt hơn là vị lạ do giấy và/hoặc do ngấu được giảm một cách đặc biệt. Phương pháp xác định "chất lượng tạo cảm giác" của đồ uống được mô tả trong ví dụ 6 trong WO 2005/087934. Một phương pháp được ưu tiên khác xác định "chất lượng tạo cảm giác" của đồ uống

được mô tả trong các ví dụ 8 và 9 dưới đây. Theo các phương án được ưu tiên, chất lượng tạo cảm giác ổn định, ít nhất một phần, là do T2N hoặc T2N tiềm năng với lượng nhỏ.

Tốt hơn là, đồ uống theo sáng chế khác biệt ở chỗ, có mùi vị giấy ít hơn so với đồ uống tương tự được tạo ra theo cách tương tự từ cây lúa mạch chứa hoạt tính LOX-1 và LOX-2 sau khi bảo quản ít nhất 10 tháng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15 đến 25°C, như khoảng 20°C. Tốt hơn là, mùi vị giấy nêu trên như được Hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia đánh giá là nhỏ hơn 90%, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 80%, như nhỏ hơn 70%.

Cũng tốt hơn là, đồ uống theo sáng chế có mùi vị giấy giảm so với đồ uống tương tự sản xuất được từ lúa mạch kiểu đại sau khi cất giữ ở nhiệt độ cao. Nếu tính chất "mùi vị giấy" được Hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia được đào tạo xác định – như được mô tả trên đây, và cho điểm theo thang điểm từ 0 đến 5, trong đó 0 là không có và 5 là cực nhiều – thì tốt hơn là đồ uống theo sáng chế có một hoặc nhiều, tốt hơn là ít nhất có hai, như ít nhất có ba, ví dụ, tất cả các điểm số về mùi vị giấy sau:

- (i) Điểm số về mùi vị giấy ít nhất là 0,5, tốt hơn nếu ít nhất là 0,7, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 1,0 thấp hơn điểm số về mùi vị giấy của đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power sau khi ủ ở 37°C trong một tuần;
- (ii) Điểm số về mùi vị giấy ít nhất là 0,5, tốt hơn nếu ít nhất là 0,7, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 1,0 thấp hơn điểm số về mùi vị giấy của đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power sau khi ủ ở 37°C trong hai tuần;
- (iii) Điểm số về mùi vị giấy ít nhất là 0,5, tốt hơn nếu ít nhất là 0,7, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 1,0 thấp hơn điểm số về mùi vị giấy của đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power sau khi ủ ở 37°C trong ba tuần;
- (iv) Điểm số về mùi vị giấy tối đa bằng 90%, tốt hơn nếu tối đa bằng 80%, tốt hơn nữa nếu tối đa bằng 70%, thậm chí tốt hơn nữa nếu tối đa bằng

60%, còn tốt hơn nữa nếu tối đa bằng 50% điểm số về mùi vị giấy của đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power sau khi ủ ở 37°C trong một tuần;

(v) Điểm số về mùi vị giấy tối đa bằng 90%, tốt hơn nếu tối đa bằng 80%, tốt hơn nữa nếu tối đa bằng 70%, thậm chí tốt hơn nữa nếu tối đa bằng 60% điểm số về mùi vị giấy của đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power sau khi ủ ở 37°C trong hai tuần;

(vi) Điểm số về mùi vị giấy tối đa bằng 90%, tốt hơn nếu tối đa bằng 80% điểm số về mùi vị giấy của đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power sau khi ủ ở 37°C trong ba tuần;

Đồ uống là đồ uống nêu trên có "chất lượng tạo cảm giác ổn định", nếu đồ uống nêu trên chứa T2N tự do với lượng rất nhỏ, ngay cả sau khi bảo quản. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất đồ uống (như bia với chất lượng tạo cảm giác ổn định), được sản xuất bằng cách sử dụng cây lúa mạch có null-LOX kép. Tốt hơn là, đồ uống này chứa T2N với lượng rất nhỏ - tốt hơn là chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 35%, như nhỏ hơn 30%, ví dụ, nhỏ hơn 20%, như nhỏ hơn 10% so với đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power – sau khi cất giữ ít nhất 1 tuần, tốt hơn là ít nhất 2 tuần, tốt hơn nữa là ít nhất 3 tuần, thậm chí tốt hơn nữa nếu ít nhất là 4 tuần, như từ 1 đến 3 tháng, ví dụ từ 3 đến 6 tháng, như từ 6 đến 12 tháng, ví dụ, dài hơn một năm.

Ngoài ra, tốt hơn là đồ uống theo sáng chế chứa T2N với lượng rất nhỏ – tốt hơn là chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 35%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30%, ví dụ, với lượng nhỏ hơn 25% so với đồ uống được tạo ra được theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power – sau khi bảo quản ít nhất 1 tuần, tốt hơn nếu ít nhất là 2 tuần, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 3

tuần, thậm chí tốt hơn nữa nếu ít nhất là 4 tuần ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C, tốt hơn là ở 37°C, trong thời gian từ 1 đến 3 tháng, ví dụ, từ 3 đến 6 tháng, như từ 6 đến 12 tháng, ví dụ, dài hơn một năm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C.

Cụ thể, tốt hơn là đồ uống theo sáng chế chứa T2N với lượng rất nhỏ – tốt hơn là chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 35% so với đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu dài, tốt hơn là từ chủng cv. Power – sau khi bảo quản trong 2 tuần ở 37°C. Cũng tốt hơn là đồ uống theo sáng chế chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 50 ppt, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 40 ppt, thậm chí còn tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30 ppt sau khi cất giữ trong 2 tuần ở 37°C. Tốt hơn, nếu việc bảo quản nêu trên được thực hiện với sự có mặt của sulfit với lượng không vượt quá 10ppm, tốt hơn là chứa sulfit với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10ppm, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 8ppm, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 6ppm, còn tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 3 đến 5ppm, như với lượng sulfit là 4ppm.

Cũng tốt hơn là, đồ uống theo sáng chế chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 80%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 75%, như với lượng nhỏ hơn 60% so với đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch có null-LOX-1, tốt hơn là từ đột biến D112 của lúa mạch được mô tả trong WO 2005/087934 - sau khi cất giữ trong 2 tuần ở 37°C. Tốt hơn, nếu việc bảo quản này được thực hiện với sự có mặt của sulfit với lượng không vượt quá 10 ppm, tốt hơn là với lượng sulfit nằm trong khoảng từ 1 đến 10ppm, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 8ppm, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 6ppm, còn tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 4 ppm.

Cũng đặc biệt tốt hơn là, đồ uống (như bia, ví dụ, bia lúa mạch) theo sáng chế chứa T2N với lượng rất nhỏ - tốt hơn là chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 35%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30%, còn tốt hơn là với lượng nhỏ

hơn 25% so với đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power - sau khi bảo quản trong 8 tuần ở 37°C. Được tốt hơn nữa là, đồ uống này (như bia, ví dụ, bia lúa mạch) chứa T2N tự do với lượng tối đa là 50 ppt, thậm chí tốt hơn nữa nếu với lượng tối đa là 40 ppt, còn tốt hơn nữa nếu với lượng tối đa là 30ppt, thậm chí còn tốt hơn nữa nếu với lượng tối đa là 20ppt sau khi bảo quản trong 8 tuần ở 37°C. Tốt hơn, nếu việc bảo quản nêu trên được thực hiện với sự có mặt của sulfit với lượng không vượt quá 10 ppm, tốt hơn là chứa sulfit với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10ppm, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 8ppm, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 6ppm, còn tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 4ppm, như với lượng sulfit là 3ppm.

Cũng tốt hơn là, đồ uống theo sáng chế chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 70%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 60%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 55% so với đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch có null-LOX-1, tốt hơn là từ đột biến D112 của cây lúa mạch được mô tả trong WO 2005/087934 – sau khi bảo quản trong 8 tuần ở 37°C. Tốt hơn là, việc bảo quản này được thực hiện với sự có mặt của sulfit với lượng không vượt quá 10ppm, tốt hơn là với lượng sulfit nằm trong khoảng từ 1 đến 10ppm, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 8ppm, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 6ppm, còn tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 4ppm.

Hơn thế nữa, mục đích của sáng chế là đề xuất đồ uống, như bia sản xuất được bằng cách sử dụng cây lúa mạch có null-LOX kép - tốt hơn là chứa T2N và/hoặc chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 70%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 60%, như với lượng nhỏ hơn 50%, tốt hơn nữa là chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 70%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 60%, như với lượng nhỏ hơn 50% so với đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ đột biến D112 của cây lúa mạch như được mô tả trong WO 2005/087934, sau khi bảo quản trong ít nhất 1 tuần, tốt hơn nếu trong ít nhất 2 tuần, tốt hơn nữa nếu trong ít nhất 3 tuần, thậm chí tốt hơn nữa nếu trong ít nhất 4 tuần ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 40°C,

tốt hơn là ở 37°C, như trong thời gian từ 1 đến 3 tháng, ví dụ, từ 3 đến 6 tháng, như từ 6 đến 12 tháng, ví dụ, bảo quản dài hơn một năm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20 đến 30°C.

Cụ thể, tốt hơn là đồ uống (như bia, ví dụ, bia lúa mạch) theo sáng chế chứa T2N với lượng rất nhỏ - tốt hơn là chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 70%, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 60%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 55%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 52% - so với đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power, sau khi bảo quản trong 8 tuần ở 37°C. Tốt hơn là, việc bảo quản này được thực hiện với sự có mặt của sulfite với lượng không vượt quá 10ppm, tốt hơn là với lượng sulfite nằm trong khoảng từ 1 đến 10ppm, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 8ppm, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 6ppm, còn tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 4ppm, như với lượng sulfite là 3ppm.

Tốt hơn, nếu đồ uống theo sáng chế cũng chứa sulfite với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10 phần triệu (ppm), tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 8ppm, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 7ppm, còn tốt hơn nữa là với lượng sulfite nằm trong khoảng từ 4 đến 6ppm. Tốt hơn, nếu đồ uống theo sáng chế chứa T2N tự do với lượng tối đa là 0,07ppb (phần tỷ), tốt hơn nếu với lượng tối đa là 0,06 ppb, tốt hơn nữa nếu với lượng tối đa là 0,05ppb, thậm chí tốt hơn nữa nếu với lượng tối đa là 0,04 ppb, như với lượng tối đa là 0,03 ppb sau khi bảo quản trong thời gian ít nhất 1 tuần, tốt hơn là trong ít nhất 2 tuần, tốt hơn nữa là trong ít nhất 3 tuần, thậm chí tốt hơn nữa là trong ít nhất 4 tuần, như trong thời gian từ 1 đến 3 tháng, ví dụ, từ 3 đến 6 tháng, như từ 6 đến 12 tháng, ví dụ, trong thời gian một năm sau khi bảo quản ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 15°C đến 40°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30°C đến 37°C, tốt hơn nữa là ở 37°C. Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, đồ uống theo sáng chế chứa T2N tự do với lượng tối đa là 0,03 ppb, tốt hơn nếu với lượng tối đa là 0,025 ppb, tốt hơn nữa nếu với lượng tối đa là 0,02 ppb (phần tỷ)

sau khi bảo quản trong 4 tuần ở 37°C với sự có mặt của sulfit với lượng nằm trong khoảng từ 4 đến 6 ppm.

Tốt hơn là, đồ uống theo sáng chế với chất lượng tạo cảm giác ổn định chứa T2N tiềm năng với lượng rất nhỏ, tốt hơn là chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 25% so với đồ uống tương tự được tạo ra theo cách tương tự từ cây lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power.

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến đồ uống, như bia, chứa axit trihydroxy octadexenoic nhất định với lượng rất nhỏ (cũng được ký hiệu là THA), cụ thể liên quan đến đồ uống chứa 9,12,13-THA và 9,10,13-THA với lượng rất nhỏ. Các THA khác biệt ở chỗ, có vị đắng hơn (Baur và Grosch, 1977; Baur và các đồng tác giả, 1977), và do đó được coi là không mong muốn.

Vì vậy, điều mong muốn là đồ uống theo sáng chế chứa 9,12,13-THA và 9,10,13-THA với lượng càng nhỏ càng tốt, mà tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 1,3 ppm, như với lượng nhỏ hơn 1 ppm. Tuy nhiên, tổng hàm lượng của 9,12,13-THA và 9,10,13-THA trong đồ uống thu được từ mạch nha – như bia – cũng phụ thuộc vào lượng mạch nha để sản xuất đồ uống đặc biệt này. Vì vậy, nói chung bia mạnh sẽ chứa 9,12,13-THA và 9,10,13-THA với lượng nhiều hơn so với bia nhẹ hơn, làm cho tổng lượng 9,12,13-THA và 9,10,13-THA trong bia mạnh hơn cao hơn nhưng chấp nhận được. Do đó, tốt hơn là đồ uống theo sáng chế chứa 9,12,13-THA và 9,10,13-THA với lượng nhỏ hơn so với đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, tốt hơn là từ chủng cv. Power. Cụ thể, đồ uống theo sáng chế chứa 9,12,13 THA với lượng tối đa bằng 50%, tốt hơn là với lượng tối đa bằng 40%, tốt hơn nữa là với lượng tối đa bằng 30% so với lượng này trong đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, mà tốt hơn là từ chủng cv. Power. Tốt hơn nữa là, đồ uống theo sáng chế chứa 9,10,13 THA với lượng tối đa là 70%, tốt hơn là với lượng tối đa bằng 60% so với lượng này trong đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại, mà tốt hơn là từ chủng cv. Power. Đồ uống này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng lúa mạch có null-LOX kép.

Theo một phương án, đồ uống theo sáng chế có chất lượng bột được cải thiện. Điều này là đặc biệt thích hợp nếu đồ uống này là bia. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất đồ uống, như bia, có chất lượng bột tốt hơn. Tốt hơn là đồ uống theo sáng chế tạo ra lượng bột ít nhất 10% cao hơn, tốt hơn nếu ít nhất là 20% cao hơn, còn tốt hơn nữa nếu ít nhất là 25% cao hơn trong thời gian từ 60 đến 80 phút, tốt hơn là trong 80 phút so với đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ lúa mạch kiều đại, mà tốt hơn là từ chủng cv. Power. Việc tạo ra bột nêu trên được xác định như được mô tả trong ví dụ 9 dưới đây.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất đồ uống nêu trên. Tốt hơn là các phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) tạo ra chế phẩm mạch nha chứa các hạt có null-LOX kép đã nảy mầm;
- (ii) xử lý chế phẩm mạch nha nêu trên thành đồ uống;

nhờ đó thu được đồ uống với chất lượng tạo cảm giác ổn định hơn.

Theo một phương án được ưu tiên, đồ uống này là bia. Trong trường hợp này, tốt hơn là bước xử lý bao gồm việc tạo ra chế phẩm ủ men từ chế phẩm mạch nha nêu trên, ví dụ, bằng phương pháp bất kỳ đã được mô tả trên đây, và lên men chế phẩm ủ men này.

Theo quan niệm chung, đồ uống có cồn - như bia - có thể sản xuất được từ các hạt lúa mạch đã được tạo mạch nha và/hoặc chưa được tạo mạch nha. Ngoài cây hoa bia và nấm men, mạch nha đóng góp vào vị và màu của bia. Hơn thế nữa, chức năng của mạch nha là làm nguồn đường lên men được và enzym. Quy trình chung để sản xuất bia dạng sơ đồ được thể hiện trên FIG.3, trong khi phần mô tả chi tiết các ví dụ về các phương pháp thích hợp để tạo mạch nha và để sản xuất bia có thể được tìm thấy, ví dụ, trong các ấn phẩm của Briggs và các đồng tác giả (1981) và Hough và các đồng tác giả (1982). Hiện có rất nhiều phương pháp được cập nhật một cách thường xuyên để phân tích các sản phẩm lúa mạch, mạch nha và bia, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, American Association of Cereal Chemists (1995), American Society of Brewing Chemists (1992), European Brewery Convention (1998), và Institute of Brewing (1997). Đã thừa nhận rằng nhiều quy trình đặc biệt được sử dụng cho việc sản xuất bia nhất định,

với những phương án khác nhau đáng kể nhất liên quan đến sở thích của người tiêu thụ địa phương. Phương pháp để sản xuất bia bất kỳ này có thể được sử dụng theo sáng chế. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế được mô tả trong các ví dụ 8 và 9.

Chế phẩm mạch nha của đồ uống nêu trên - như bia, đồ uống mạch nha, hoặc chế phẩm ủ men không lên men, ví dụ, có thể thu được bằng phương pháp bất kỳ mô tả trên đây. Chế phẩm ủ men có thể được tạo ra từ chế phẩm mạch nha như được mô tả trên đây.

Tốt hơn là, bước thứ nhất của quy trình sản xuất bia bao gồm việc đun sôi chế phẩm ủ men nêu trên. Trong quá trình đun sôi, các thành phần khác có thể được bổ sung vào, ví dụ, cây hoa bia làm cho bia có vị đắng và thơm thông thường. Việc đun sôi chế phẩm ủ men cũng gây ra sự kết tụ giữa các polyphenol và các protein biến tính, mà chủ yếu là kết tụ trong giai đoạn làm nguội chế phẩm ủ men tiếp theo. Sau khi được làm nguội, chế phẩm ủ men được chuyển tới thùng lên men chứa nấm men. Tốt hơn, nếu nấm men này là nấm men sản xuất bia, *Saccharomyces carlsbergensis*. Chế phẩm ủ men này sẽ được lên men trong khoảng thời gian thích hợp bất kỳ, nói chung là từ 1 đến 100 ngày. Trong quá trình lên men nhiều ngày, đường chuyển hóa thành rượu và CO₂ đồng thời với sự phát triển của một vài hương liệu.

Tiếp theo, bia có thể tiếp tục được xử lý, được làm lạnh chẳng hạn. Nó cũng có thể được lọc và/hoặc làm nhẹ – quá trình phát triển hương thơm dễ chịu và không có vị men. Ngoài ra, các chất phụ gia có thể được bổ sung vào. Hơn thế nữa, CO₂ có thể được bổ sung vào. Cuối cùng, bia có thể được thanh trùng và/hoặc lọc, trước khi được bao gói (ví dụ, đóng chai hoặc lon).

Mặc dù có nhiều ưu điểm trong lĩnh vực sản xuất bia, nhưng có lợi nếu làm giảm lượng T2N và T2N tiềm năng trong bia. Do đó, vẫn còn có nhu cầu về nguyên liệu mới, đặc biệt là lúa mạch và mạch nha đóng góp làm mất vị lạ trong bia thành phẩm. Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất cây lúa mạch và mạch nha này.

Hiện có các phương pháp khác nhau để xác định xem liệu có phải cây lúa mạch, hoặc sản phẩm thực vật của nó được tạo ra từ cây lúa mạch mang các đột biến trong gen đối với LOX-1 và LOX-2, mà gây ra sự làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1 và làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2 hay không. Nói chung, các sản phẩm thực vật này sẽ chứa ít nhất một vài ADN bộ gen từ cây dùng để sản xuất chúng. Vì vậy, mạch nha sẽ chứa ADN bộ gen với lượng lớn, nhưng thậm chí lúa mạch hoặc các dịch chiết mạch nha, như chế phẩm ủ men, có thể chứa ADN bộ gen hoặc các đoạn của nó từ cây lúa mạch hoặc mạch nha này. Ngoài ra, đồ uống có nguồn gốc từ lúa mạch, như bia, có thể chứa ADN bộ gen hoặc các đoạn của nó từ cây nêu trên. Bằng cách phân tích ADN trong sản phẩm thực vật, có thể xác định được liệu có phải cây này, mà từ đó sản phẩm thực vật được tạo ra, mang các đột biến trong các gen LOX-1 và LOX-2, có làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1 và làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2 hay không. Các đột biến có thể, ví dụ, là đột biến bất kỳ trong số các đột biến trong các gen LOX-1 và LOX-2 được mô tả trên đây trong phần "Mất hoàn toàn hoạt tính chức năng của LOX". ADN bộ gen có thể được phân tích bởi phương pháp hữu ích bất kỳ, như phương pháp xác định trình tự hoặc phương pháp trên cơ sở mở rộng, kể cả các phương pháp trên cơ sở PCR. Nếu các đột biến cụ thể trong gen LOX-1 và/hoặc gen LOX-2 được giả định, thì sau đó có thể sử dụng phép phân tích hiện tượng đa hình, ví dụ, phân tích SNP. Phân tích này có thể được thực hiện như được mô tả ở đây trong ví dụ 10. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ có khả năng thích ứng với phân tích SNP đặc thù được mô tả trong các ví dụ này để sử dụng cùng với các đột biến khác hoặc vật liệu khởi đầu khác.

Nếu các sản phẩm thực vật nêu trên chỉ được tạo ra từ các cây lúa mạch mang các đột biến trong gen đối với LOX-1 và LOX-2, làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1 và làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2, thì với sự có mặt so với sự vắng mặt của ARN thông tin của LOX-1 và/hoặc ARN thông tin của LOX-2 và/hoặc protein LOX-1 và protein LOX-2 có thể cũng là chỉ báo xem liệu có phải sản phẩm thực vật nêu trên được tạo ra từ cây lúa mạch có null-

LOX kép hay không. Việc xét nghiệm sản phẩm thực vật này có thể cũng được thực hiện nhờ phân tích phép thấm tách Tây, hoặc phương pháp phân tích protein khác, hoặc bởi RT-PCR, hoặc bởi phân tích phép thấm tách Bắc, hoặc bởi phân tích ARN thông tin khác. Các thử nghiệm như vậy là đặc biệt hữu ích nếu sản phẩm thực vật này là mạch nha.

Gây đột biến bằng phương pháp hóa học

Để tạo ra cây lúa mạch có null-LOX kép theo sáng chế – tức là cây chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1 và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2 – một số lượng lớn các đột biến của lúa mạch được tạo ra bởi phương pháp gây đột biến bất kỳ, ví dụ, bằng cách sử dụng sự gây đột biến các hạt lúa mạch bằng phương pháp hóa học. Phương pháp này là đã biết để tạo ra đột biến ngẫu nhiên. Việc gây đột biến lúa mạch có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hóa chất gây đột biến bất kỳ. Tuy nhiên, tốt hơn là việc gây đột biến này được thực hiện bằng cách xử lý các hạt bằng NaN_3 , cho phép các hạt còn sống sót nảy mầm, tiếp theo phân tích các cây con cháu. Cây hình thành này sinh trưởng từ các hạt được gây đột biến được gọi là thế hệ M0, chứa các thể khảm dị hợp tử đối với sự đột biến bất kỳ nhất định. Các cây con cháu được chọn lọc sau khi tự thụ phấn được gọi là thế hệ M1, trong đó đột biến nhất định này phân ly thành các dị hợp tử và các đồng hợp tử tương ứng (xem FIG.1).

Việc xử lý các hạt bằng NaN_3 là không tương đương với việc xử lý một tế bào đơn lẻ, vì các hạt sau khi xử lý sẽ chứa một số tế bào không chứa đột biến và nhiều tế bào chứa đột biến ADN khác nhau. Vì các đột biến trong các dòng tế bào mà không tạo ra dòng tế bào mầm, nên mục tiêu là đưa chất gây đột biến vào một số tế bào để phát triển thành các mô có thể sinh sản, góp phần vào sự phát triển thế hệ M1.

Để đánh giá tổng thể hiệu quả đột biến, các thể ghép bạch tạng và cây bạch tạng có thể được tính đến ở các thế hệ M0 và M1. Điểm số của chất gây đột biến là hàm số của các cây sống sót đưa ra sự dự đoán về hiệu quả gây đột

biến, trong khi điểm số của chất gây đột biến là hàm số của các hạt được xử lý lại cung cấp số đo tổng hợp về cả hiệu quả gây đột biến và làm chết hạt.

Điều đáng lưu ý là, các tế bào có các cơ chế đảm bảo chất lượng hầu như ở mỗi bước biểu hiện gen, có khả năng điều tiết ảnh hưởng của các đột biến gây tổn thương. Một ví dụ đã được nghiên cứu kỹ trong sinh vật có nhân thực là sự thoái hóa ARN thông tin do vô nghĩa ra, được ký hiệu là NMD, mà cản trở sự tổng hợp của các protein bị cắt cụt sớm gây hại (Maquat và Carmichael, 2001; Wu và các đồng tác giả, 2007). Trong NMD, codon tận cùng được nhận dạng dưới dạng sớm bởi vị trí của nó tương ứng với các phần tử làm mất ổn định cuối. Các đột biến mà tạo ra các codon tận cùng sớm (vô nghĩa), được ký hiệu là PTC, đôi khi làm gia tăng lượng các sản phẩm phiên mã được tách intron luân phiên mà bỏ qua các đột biến tấn công, nhờ đó về tiềm năng tiết kiệm chức năng của protein (Mendell và Dietz, 2001).

Nhân giống cây

Theo một phương án, mục đích của sáng chế là đề xuất cây lúa mạch hữu ích về tính trạng nông học có null-LOX kép. Sự phát triển của cây trồng thường được thấy như là quá trình kéo dài bắt đầu với việc đưa vào dấu hiệu mới. Tuy nhiên, từ quan điểm của người nhân giống cây, đôi khi bước này có thể làm cho cây có biên dạng tổng thể ít mong muốn hơn về các tính trạng nông học so với các loại hiện có bán trên thị trường.

Ngoài tính trạng có null-LOX kép, các yếu tố bổ sung cũng có thể được cân nhắc trong lĩnh vực này để tạo giống lúa mạch tạo mạch nha có bán trên thị trường, ví dụ, năng suất hạt và kích thước hạt, và các thông số khác liên quan đến hiệu quả tạo mạch nha hoặc hiệu quả sản xuất bia. Vì có nhiều, nếu không nói phải là tất cả, các tính trạng thích hợp đã được thể hiện đang trong quá trình kiểm soát về mặt di truyền, sáng chế cũng đề xuất cây lúa mạch hiện đại, đồng hợp tử, năng suất cao có thể sản xuất được từ việc lai chéo với cây lúa mạch có null-LOX kép, mà được nêu trong công bố này. Các hạt của cây lúa mạch này tạo ra nguyên liệu mới ít có khả năng tạo ra T2N tiềm năng, tức là tốt hơn nếu mạch nha sản xuất được từ các hạt như vậy chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ

hơn 50% so với mạch nha được tạo ra theo cách tương tự từ đột biến D112 của lúa mạch có null-LOX kép được mô tả trong WO 2005/087934. Nhà nhân giống cây lúa mạch sẽ có khả năng chọn và phát triển cây lúa mạch này – tiếp tục lai giống với cây lúa mạch có null-LOX kép – sẽ tạo ra cây trồng tốt hơn. Theo cách khác, nhà nhân giống lúa mạch này có thể dùng cây lúa mạch theo sáng chế để tiếp tục gây đột biến nhằm tạo ra cây trồng mới thu được từ lúa mạch có null-LOX kép.

Một phương pháp đảm bảo rằng tính trạng có null-LOX kép được duy trì trong các dòng con cháu có liên quan đến việc phân tích SNP của gen LOX-1 và gen LOX-2. Tốt hơn, nếu các hoạt tính LOX-1 và LOX-2 cũng được xác định.

Cây lúa mạch theo sáng chế có thể cũng được đưa vào sơ đồ nhân giống thích hợp bất kỳ.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất cây lúa mạch có tính ưu việt về mặt nông học có tính trạng null-LOX kép. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất cây lúa mạch mới có null-LOX kép bằng cách lai giống cây lúa mạch bố-mẹ thế hệ thứ nhất với cây lúa mạch bố-mẹ thế hệ thứ hai, trong đó cây lúa mạch thế hệ thứ nhất và thứ hai này là lúa mạch có null-LOX kép. Ngoài ra, cả cây lúa mạch thế hệ thứ nhất và thứ hai có thể được tạo ra từ giống lúa mạch có null-LOX kép. Vì vậy, bằng cách sử dụng giống lúa mạch có null-LOX kép phương pháp bất kỳ này là một phần của sáng chế: thụ phấn, lai ngược, lai quần thể, và lai tương tự. Tất cả các cây được sản xuất bằng cách sử dụng giống lúa mạch có null-LOX kép làm cây bố-mẹ đều nằm trong phạm vi của sáng chế, kể cả các cây lúa mạch được phát triển từ giống thu được từ giống lúa mạch có null-LOX kép. Lúa mạch có null-LOX kép có thể cũng được sử dụng để biến nạp gen trong các trường hợp nếu AND ngoại sinh được đưa vào và được biểu hiện trong cây hoặc mô thực vật có null-LOX kép này.

Các phương pháp lai ngược có thể được sử dụng theo sáng chế để đưa tính trạng null-LOX kép của cây lúa mạch được đột biến vào cây trồng khác, ví dụ, chủng cv. Scarlett hoặc chủng cv. Jersey, cả hai đều là các chủng lúa mạch tạo mạch nha hiện nay, có năng suất cao. Theo quy trình lai ngược chuẩn, giống gốc

đáng quan tâm, tức là cây bố-mẹ truy hồi, được lai chéo với giống thứ hai (tức là cây bố mẹ không truy hồi), mang các gen LOX của đột biến đáng quan tâm cần được chuyển. Sau đó, cây thế hệ sau thu được null-LOX kép từ việc lai chéo này được lai chéo với cây bố mẹ truy hồi, với quy trình này được lặp lại cho đến khi thu được cây lúa mạch, trong đó chủ yếu là tất cả các đặc tính được quy định bởi cây bố mẹ không truy hồi được khôi phục trong cây sản xuất được, ngoài sự thiết lập di truyền được chuyển cho cây bố mẹ không truy hồi với dấu hiệu có null-LOX kép. Cuối cùng, cây lai ngược sinh ra sau cùng là cây được tự phối để thu được cây thế hệ sau bằng cách nhân giống thuần khiết, có null-LOX kép.

Một cách để tăng tốc quy trình nhân giống cây trồng bao gồm bước nhân giống ban đầu các đột biến đã được tạo ra bằng cách ứng dụng việc cấy mô và kỹ thuật tái sinh. Vì vậy, theo một khía cạnh khác sáng chế đề xuất các tế bào, là các tế bào mà khi sinh trưởng và phân hóa tạo ra cây lúa mạch với dấu hiệu có null-LOX kép. Ví dụ, việc nhân giống có thể kèm theo sự lai giống truyền thống, sản xuất ra cây thu được từ bao phấn hữu thụ hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp cấy tiểu bào tử.

Các sản phẩm của quy trình LOX

Theo các phương án khác nhau, sáng chế đề cập đến cây lúa mạch, và các bộ phận của nó, chứa T2N tiềm năng với lượng rất nhỏ. Các enzym LOX xúc tác sự dioxy hóa axit béo đa bất bão hoà bằng hệ cis-1,cis-4 pentadien. Trong lúa mạch, các axit béo đa bất bão hoà có 18 nguyên tử cacbon như axit linoleic ($18:2^{\Delta 9,12}$) axit α -linolenic ($18:3^{\Delta 9,12,15}$) là các chất nền LOX chủ yếu. Quy trình chuyển hóa axit béo chứa lipoxygenaza được bắt đầu bằng cách bổ sung oxy phân tử ở vị trí C-9 (chủ yếu được xúc tác bởi LOX-1) hoặc ở vị trí C-13 (chủ yếu được xúc tác bởi LOX-2) của mạch axyl, tạo ra các axit 9-HPODE và 13-HPODE [axit 9-hydroperoxy octadecatrienoic và axit 13-hydroperoxy octadecatrienoic (HPOTE) tương ứng là các sản phẩm nếu cơ chất là axit α -linolenic, nhưng các axit HPOTE này không thực hiện chức năng làm tiền chất đối với T2N]. Trong các nhánh hydroperoxit lyaza của quy trình LOX, cả 9-HPODE và 13-HPODE có thể bị phân cắt thành các axit oxo và aldehyt mạch

ngắn (xem FIG.2). Cụ thể, 9-HPODE có thể bị phân cắt để tạo ra cis-nonenal mà được chuyển hóa thành T2N, trong khi 13-HPODE là tiền chất của 2-E-hexenal. Vì vậy, 13-HPODE, sản phẩm chính của quá trình dioxy hóa axit linoleic được xúc tác bởi LOX-2 không được đoán trước để được là thành phần nằm trước của quy trình này dẫn đến sự tạo ra vị hôi của T2N.

Đã được thừa nhận rằng sáng chế bao hàm việc sản xuất ảnh hưởng đến các chất chuyển hóa nằm sau của chất xúc tác LOX-1 và LOX-2, không được tạo ra làm sản phẩm trực tiếp của phản ứng được xúc tác bởi LOX-1 hoặc LOX-2, mà do hàng loạt phản ứng tiếp theo. Các phản ứng này bao gồm các chất đồng phân hóa và các sự chuyển hóa tự phát, do yếu tố gây ra, hoặc được xúc tác nhờ enzym. Vì vậy, việc sản xuất các chất trao đổi chất nằm sau có thể bị ảnh hưởng bằng cách điều biến sự biểu hiện của các hợp phần khác của quy trình này, ví dụ, hydroperoxid lyaza (HPL).

T2N tiềm năng

Mục đích quan trọng của sáng chế là làm giảm hoặc loại bỏ T2N tiềm năng. Vì vậy, mục đích của sáng chế là làm giảm sự tạo ra tiền chất T2N và các sản phẩm cộng aldehyt. Mặc dù một số phản ứng hóa học liên quan đến bia có mùi ôi khó tả, nhưng sự tạo ra T2N tự do từ T2N tiềm năng được thừa nhận là nguyên nhân chính của sự phát triển vị hôi trong các sản phẩm bia (Kuroda và các đồng tác giả, nêu trên). Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất đồ uống chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ cũng như đồ uống chứa tiền chất T2N với lượng nhỏ.

Hầu hết T2N tiềm năng được chuyển từ chế phẩm ủ men vào bia thành phẩm, trong đó T2N tự do có thể được giải phóng (Liégeois và các đồng tác giả, 2002), với điều kiện độ axit và nhiệt độ là các yếu tố quan trọng trong quy trình này. Theo sáng chế, T2N tiềm năng được xác định như được mô tả trên đây trong phần “các định nghĩa”. Hiện cũng có các phương pháp khác để xác định lượng T2N tiềm năng. Để tránh rối loạn, nghĩa của thuật ngữ "T2N tiềm năng" trong trường hợp sáng chế được mô tả trên đây trong phần “các định nghĩa”. Các chất hóa học có khả năng giải phóng T2N hoặc chuyển hóa thành T2N ở đây có

nghĩa là "tiền chất T2N", và tiền chất T2N xác định được hoặc đo được bằng các phương pháp khác mà không phải là phương pháp xác định T2N tiềm năng có tên gọi là "tiền chất T2N". Cụ thể, tiền chất T2N có thể được xác định bằng cách xử lý mẫu ở bước thứ nhất sao cho chủ yếu là tất cả (tốt hơn là tất cả) các hóa chất có khả năng giải phóng T2N hoặc chuyển hóa thành T2N một cách thực sự để lần lượt giải phóng T2N và/hoặc chuyển hóa thành T2N. Sau đó, xác định lượng T2N.

Các hạt lúa mạch theo sáng chế không chứa hoạt tính LOX-1 và LOX-2. Điều đáng ngạc nhiên là, các hạt lúa mạch này chứa T2N tiềm năng với lượng rất nhỏ.

Do đó, bia được sản xuất bằng cách sử dụng các hạt lúa mạch có null-LOX kép sẽ không chỉ chứa T2N với lượng rất nhỏ, mà còn chứa T2N tiềm năng với lượng rất nhỏ. Các hạt lúa mạch có null-LOX kép đều nằm trong phạm vi của sáng chế mà thu được các sản phẩm bia chứa T2N tiềm năng với lượng rất nhỏ, tốt hơn là với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 25% lượng T2N tiềm năng của sản phẩm bia tương tự sản xuất được theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại (tốt hơn là chủng cv. Power). Vì vậy, tốt hơn nếu sản phẩm bia nêu trên chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 60%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 50% lượng T2N tiềm năng của bia tương tự sản xuất được theo cách tương tự từ đột biến D112 của lúa mạch được mô tả trong WO 2005/087934.

Ngoài ra, tốt hơn là các sản phẩm thực vật thu được từ các hạt lúa mạch có null-LOX kép có tiền chất T2N với lượng rất nhỏ. Các sản phẩm thực vật sản xuất được từ các hạt lúa mạch có null-LOX kép đều nằm trong phạm vi của sáng chế, các sản phẩm thực vật này chứa tiền chất T2N với lượng nhỏ hơn 40%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 30%, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 25% lượng tiền chất T2N của sản phẩm thực vật tương tự sản xuất được theo cách tương tự từ lúa mạch kiểu đại (tốt hơn là chủng cv. Power). Vì vậy, tốt hơn nếu sản phẩm bia nêu trên chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 60%, tốt hơn nữa là với lượng nhỏ hơn 50% lượng T2N tiềm năng của bia tương tự sản xuất

được theo cách tương tự từ đột biến D112 của lúa mạch được mô tả trong WO 2005/087934.

Điều đáng chú ý là, các trị số T2N đo được trong các mẫu chứa, và trong các sản phẩm thu được từ vật liệu thô được tạo mạch nha ở quy mô cực nhỏ thường cao hơn so với các trị số đo được từ vật liệu thô sản xuất được ở quy mô lớn hơn, ví dụ, từ mẫu thử nghiệm được tạo mạch nha ở quy mô lớn 30 kg. Tuy nhiên, trị số T2N tương đối đo được trong các thử nghiệm ở quy mô lớn và quy mô nhỏ nói chung là như nhau.

Tương tự, điều đáng chú ý là các trị số T2N tiềm năng (và tiền chất T2N) đo được trong các mẫu, và trong các sản phẩm từ vật liệu thô được tạo mạch nha ở quy mô cực nhỏ thường cao hơn so với các trị số đo được từ vật liệu thô sản xuất được ở quy mô lớn hơn, ví dụ, từ mẫu thử nghiệm được tạo mạch nha ở quy mô lớn 30 kg. Tuy nhiên, các trị số T2N tiềm năng tương đối đo được trong thử nghiệm ở quy mô lớn và quy mô nhỏ nói chung là như nhau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ ở đây minh họa các phương án được ưu tiên của sáng chế và không được coi là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Trừ khi có chỉ dẫn khác, các kỹ thuật sinh học phân tử cơ bản được thực hiện để xử lý các axit nucleic và vi khuẩn như được mô tả trong ấn phẩm của Sambrook và Russel (2001).

Ví dụ 1

Sàng lọc hoạt tính LOX-2 thấp trong phôi trưởng thành được gây đột biến của quần thể lúa mạch có null-LOX-1 được gây đột biến, thể hệ M3

Cả hai LOX-1 và LOX-2 được tổng hợp trong phôi của lúa mạch trưởng thành (với LOX-1 là enzym mạnh hơn), và cũng trong cả phôi đang nảy mầm (cả hai enzym với hàm lượng bằng nhau). Để xác định hoạt tính LOX trong hàng nghìn mẫu, các phân tích sử dụng các dịch chiết của phôi của lúa mạch phải hầu như là thích hợp. Và trong các phân tích mức hoạt tính của LOX-2, sẽ có lợi hơn nếu các hạt được sàng lọc là các hạt lúa mạch có null-LOX-1 được gây đột biến, xem WO 2005/087934.

Các hạt được thu gom từ cây lúa mạch đột biến D112 có null-LOX-1 (được mô tả trong WO 2005/087934 và được mua từ ATCC với số hiệu là PTA-5487), và được ủ với chất gây đột biến NaN_3 để tạo ra các đột biến điểm trong ADN bộ gen của lúa mạch. Các thiết lập thử nghiệm là theo các khuyến cáo được Kleinhofs và các đồng tác giả đề xuất (nêu trên).

Tiếp theo, các hạt được gây đột biến thế hệ M1 được nhân giống trong các khoảnh đất ở thực địa qua hai thế hệ tiếp theo, cuối cùng tạo ra các cây đồng hợp tử thế hệ M3 với tỷ lệ cao cho mục đích sàng lọc (về quy trình tổng thể xem FIG.1). Các hạt được gây đột biến thế hệ M3 được kỳ vọng là chứa các đột biến gen với tần suất là từ 0,9 đến 2,3 trong số 10000 hạt (Kleinhofs và các đồng tác giả, nêu trên).

Hoạt tính LOX-2 trong các phôi trưởng thành của đột biến có null-LOX-1 được phát hiện dưới đây, đo được nhờ phân tích LOX-1 thông thường. Ở đây, dung dịch gốc của hỗn hợp phản ứng được tổng hợp đồng thời với dịch chiết (như được mô tả trong WO 2005/087934). Trong đơn này mô tả một cách chi tiết phương pháp cải thiện độ nhạy của phép phân tích, trong đó cả hai điều kiện chiết enzyme cũng như việc trộn hỗn hợp phản ứng được thay đổi.

Đối với dịch chiết LOX, điều ngạc nhiên là các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng bằng cách sử dụng dung dịch đệm là dung dịch axit lactic 100mM, với độ pH là 4,5, đã làm giảm một cách đáng kể mức hoạt tính tiêu thụ HPODE nền, cho phép tích lũy các HPODE trong dung dịch đệm phân tích. Ngoài ra, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng thử nghiệm này có thể tiếp tục được cải thiện bằng cách cho phép dịch chiết phụ của các HPODE được tạo ra kích hoạt LOX-2 thông qua sự oxy hóa $\text{Fe}^{++} \rightarrow \text{Fe}^{+++}$ của các nguyên tử sắt liên kết với chúng trước khi bổ sung các chất phản ứng còn lại, cuối cùng tạo ra thuốc nhuộm indamin màu xanh.

Nói một cách ngắn gọn, enzyme LOX-2 được chiết từ các phôi trưởng thành phân lập được bằng cách sử dụng 200 μl dung dịch đệm chiết (100mM axit lactic, độ pH là 4,5). Việc chiết được thực hiện trong các đĩa 96 lỗ, trong đó mỗi đĩa dung tích 1,2ml chứa hạt thủy tinh tròn đường kính 5mm. Các đĩa này

được ủ trên nước đá trong 10 phút trước khi chuyển tới máy nghiền phòng thí nghiệm MM 300 (Retsch), được điều chỉnh bằng điện để rung lắc với tần số 27 sec⁻¹ trong 35 giây. Sau đó, đĩa này được ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút trong máy ly tâm Allegra 6R Centrifuge (Beckman-Coulter) trong 10 phút ở 4°C để làm kết tủa chất không hòa tan, và sau đó giữ trên nước đá trong thời gian tối đa 2 giờ trước khi xử lý tiếp theo. Đĩa 96 lỗ được chuyển tới Biomek 2000 Laboratory Automation Workstation (Beckman-Coulter) để tiếp tục nhỏ giọt. Ban đầu, các dịch chiết của phôi 96×40 µl được chuyển tới đĩa vi chuẩn 96 lỗ tiêu chuẩn (Nunc), sau đó bổ sung 90 µl chất phản ứng A [12,5 mM axit 3-(đimethylamino)benzoic, 0,625 mM axit linoleic], được tạo ra bằng cách tạo hỗn hợp lần thứ nhất 155µl axit linoleic, tương ứng với 134mg axit tự do (Sigma, L-1376) và 257µl dung dịch Tween-20; tiếp theo bổ sung H₂O vào đến dung tích 5ml, sau đó bổ sung 600µl dung dịch NaOH 1M vào. Dung dịch đã làm sạch được điều chỉnh đến dung tích 20ml bằng H₂O. Hỗn hợp này được ủ trong 10 phút trước khi bổ sung 90 µl chất phản ứng B (0,25mM 3-metyl-2-benzothiazolin hydrazon, 0,125 mg/ml hemoglobin) vào. Sau khi tiếp tục ủ trong 5 phút, đo được phổ A₅₉₅ trong mỗi lỗ của đĩa 96 lỗ bằng cách sử dụng quang phổ kế Flourostar Galaxy (BMG Labtechnologies), với sự tạo ra màu phản ánh sự có mặt của các HPODE sinh ra do sự dioxy hóa được xúc tác bởi LOX-2 (do đó các hoạt tính này được thể hiện theo đơn vị phổ A₅₉₅).

Bằng cách sử dụng quy trình nêu trên, tổng cộng có 21000 dòng đột biến lúa mạch được phân tích về hoạt tính của LOX-2, và có 1550 dòng trong số này được chọn trên cơ sở có hoạt tính LOX-2 thấp. Các dòng này tiếp tục được nhân giống trên thực địa, với hoạt tính LOX-2 sau đó đo được trong các hạt trưởng thành. Tuy nhiên, không có hạt nào được phát hiện là đã chuyển dấu hiệu LOX-2 với lượng nhỏ sang thế hệ tiếp theo.

Ví dụ 2

Sàng lọc hoạt tính LOX-2 với lượng nhỏ trong phôi của lúa mạch đang nảy mầm

Vật liệu sàng lọc được cải thiện: Các hạt được chọn từ cây lúa mạch dòng Ca211901 có null-LOX-1 - được tạo ra bằng cách lai chéo (đột biến D112 có

null-LOX-1 × Jersey) × Sebastian - được ủ cùng với chất gây đột biến NaN_3 theo các chi tiết của quy trình được Kleinhofs và các đồng tác giả (nêu trên) cung cấp. Quy trình này được chọn vì nó đã được biết là gây ra sự đột biến điểm trong ADN bộ gen của lúa mạch, cuối cùng tạo ra sự thay thế hoặc cắt đứt axit amin trong các protein được mã hóa bởi ADN được gây đột biến. Trong các thử nghiệm gây đột biến của công bố này, chọn các hạt thể hệ M1 được gây đột biến để nhân giống trên thực địa thông qua hai thế hệ tiếp theo, cuối cùng tạo ra các cây đồng hợp tử với tỷ lệ cao cho mục đích sàng lọc (xem FIG.1). Trong khi các hạt thể hệ M2 không được sàng lọc, chủ yếu là vì các hạt này được kỳ vọng là chứa đột biến điểm dị hợp tử với tỷ lệ cao, thì các hạt của đột biến thể hệ M3 được sử dụng làm chất liệu sàng lọc, kỳ vọng là 0,9–2,3 đột biến trong mỗi 10000 hạt (Kleinhofs và các đồng tác giả, nêu trên).

Đáng ngạc nhiên là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc phân tích các phôi đang nảy mầm đã đưa ra các kết quả phân tích rất được cải thiện so với kết quả phân tích dịch chiết của các phôi trưởng thành (như được mô tả trên đây trong ví dụ 1). Do đó, quy trình sàng lọc năng suất cao được thiết lập để đo hoạt tính LOX-2 trong phôi đang nảy mầm, kể cả mô cụt của nó.

Hai phôi được phân lập từ các hạt trưởng thành trong số 35125 bông lúa mạch (20977 dòng đột biến D112 của lúa mạch có null-LOX-1 thể hệ M4, và 14148 dòng của các dòng Ca211901 lúa mạch có null-LOX-1 thể hệ M3, và được chuyển tới các đĩa chứa 96 lỗ (ABgene). Sự nảy mầm của phôi được bắt đầu sau khi bổ sung 20 μl nước vào mỗi lỗ, được phủ bằng mô ướt Kimnett và có nắp bằng chất dẻo. Các đĩa này được ủ trong các túi lọc ở 20°C trong 48 giờ. Sau khi ủ, enzym LOX-2 được chiết; bổ sung vào mỗi đĩa thủy tinh hạt đường kính 5 mm và 200 μl dung dịch đệm chiết (dung dịch axit lactic 100 mM, độ pH = 4,5), tiếp theo nghiền trong 35 giây với tần số 27 sec^{-1} trong máy nghiền phòng thí nghiệm MM 300 (Retsch). Sau đó, đĩa này được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C trong máy ly tâm Allegra 6R (Beckman-Coulter), để làm kết tủa chất không hòa tan. Hoạt tính LOX-2 về cơ bản được xác định để phân tích

hoạt tính LOX-2 của các dịch chiết của phôi (ví dụ 1), chỉ khác là sử dụng chỉ 30 μ l dịch chiết trong mỗi lần thử nghiệm thay vì sử dụng 40 μ l.

Nhận dạng các đột biến tiềm năng: Như được mô tả trên đây, hai hạt của mỗi trong số 35125 dòng lúa mạch nêu trên được phân tích về hoạt tính LOX-2, với mục đích nhận dạng các hạt có sự giảm mạnh về hoạt tính nêu trên khi so sánh với các hạt có null-LOX-1 và các hạt lúa mạch kiểu dại. Tổng cộng có 7 đột biến tiềm năng được nhận dạng trong thế hệ M3 của dòng Ca211901. Các đột biến này tiếp tục được nhân giống trong nhà kính, thu hoạch, sau đó được sàng lọc lại về dấu hiệu liên quan đến hoạt tính LOX ở mức rất thấp. Cuối cùng, chỉ một đột biến của dòng Ca211901, có nghĩa là đột biến A689 (và ở đây cũng được ký hiệu là đột biến A689 của lúa mạch có null-LOX kép), được thể hiện chủ yếu để bộc lộ về cơ bản không có hoạt tính LOX-2. Các số đo được chi tiết hóa về tổng hoạt tính LOX được thực hiện với các dịch chiết các phôi đã nảy mầm, trong đó hoạt tính LOX hầu như là bị loại bỏ bởi LOX-2 (Schmitt và van Mechelen, 1997). Đối với các phôi đã nảy mầm từ các hạt thể của đột biến A689 thế hệ M3, tổng hoạt tính của LOX – như xác định được nhờ phép phân tích LOX màu (ví dụ 1; bảng 1) – là $0,163 \pm 5.5\%$ A_{595} U/phôi đã nảy mầm, trong khi hoạt tính này đối với dòng Ca211901 giống mẹ có null-LOX-1 là $1,224 \pm 3,8\%$ A_{595} U/phôi đã nảy mầm (trị số tương ứng với đột biến thô D112 của lúa mạch có null-LOX-1 là $1,215 \pm 6,0\%$ A_{595} U/phôi đã nảy mầm).

Ví dụ 3

Đột biến A689 của lúa mạch

Các phân tích được thực hiện để thiết lập xem liệu có phải các cây lúa mạch có null-LOX-2 các thế hệ M4 và M5 có phải là đồng hợp tử với kiểu hình đột biến tương ứng hay không. Kiểu phân tích này sẽ trợ giúp cho việc xác định xem liệu có phải sự đột biến này là gen lặn hoặc là gen trội. Ngoài ra, nếu cây thế hệ M3 là dị hợp tử về đột biến gen trội, thì sau đó các cá thể của các thế hệ kế tiếp sẽ phân tách về kiểu hình này.

Tổng hoạt tính LOX đo được trong các phôi của lúa mạch các thế hệ M3, M4, và M5 có đột biến A689, và các hoạt tính này không chỉ được so sánh với

hoạt tính của phôi dòng mẹ Ca211901, mà còn được so sánh với đột biến D112 của lúa mạch có null-LOX-1. Việc xác định hoạt tính của LOX như được mô tả trong ví dụ 1 của sáng chế này. Trong tất cả các thử nghiệm, các mẫu đối chứng bao gồm các dịch chiết chuẩn từ các phôi đang nảy mầm của dòng mẹ, cũng như các dịch chiết chuẩn, bị bất hoạt do nhiệt ra khỏi các phôi đột biến dòng Ca211901 và đột biến D112 có null-LOX-1. Đối với các phôi thể hệ M4, các hạt có đột biến A689, tổng hoạt tính trung bình của LOX là $0,151 \pm 2,6\%$ A_{595} U ($n=24$), và đối với phôi đang nảy mầm thể hệ M5 có đột biến A689 là $0,16 \pm 2,3\%$ A_{595} U ($n=90$). Để so sánh, các phôi đang nảy mầm dòng Ca211901 và đột biến D112 có null-LOX-1 có hiệu suất lần lượt là $1,210 \pm 3,0\%$ A_{595} U ($n=90$; thể hệ M4) và $1,199 \pm 4,6\%$ A_{595} U ($n=90$; thể hệ M5). Kết quả được ghi tóm tắt trong Bảng 1, và trên các hình vẽ từ FIG.4A đến FIG.4C. Tóm lại, số liệu thử nghiệm này khẳng định rằng các hạt thể hệ M4 và M5 có đột biến D112 là đồng hợp tử đối với tính trạng di truyền chỉ rõ tổng hoạt tính LOX rất thấp, phản ánh kiểu hình có null-LOX kép.

Bảng 1. Tổng hoạt tính LOX (trung bình) trong các dịch chiết tạo ra được từ các phôi của lúa mạch đã nảy mầm của đột biến thô (thể hệ M3), và các thể hệ tiếp theo (thể hệ M4 và thể hệ M5).

Dịch chiết	Tổng hoạt tính của LOX	Các dòng được thử nghiệm	Độ lệch chuẩn
	Đơn vị A_{595}	No.	%
Thể hệ M3			
Đột biến A689	0,163	8	5,5
Ca211901	1,224	6	3,8
D112	1,215	6	6,0
Ca211901 (bị bất hoạt do nhiệt)	0,099	10	1,3
D112 (bị bất hoạt do nhiệt)	0,096	10	1,1

Thế hệ M4 (thế hệ tiếp theo)

Đột biến A689	0,151	24	2,6
Ca211901	1,223	6	2,3
D112	1,209	6	5,6
Ca211901 (bị bất hoạt do nhiệt)	0,096	10	1,7
D112 (bị bất hoạt do nhiệt)	0,101	10	1,0

Thế hệ M5 (thế hệ tiếp theo)

Đột biến A689	0,160	90	2,3
Ca211901	1,210	90	3,0
D112	1,199	90	4,6
Ca211901 (bị bất hoạt do nhiệt)	0,103	10	2,0
D112 (bị bất hoạt do nhiệt)	0,097	10	1,2

Ví dụ 4

Phân tích HPODE trên cơ sở HPLC trong lúa mạch đã nảy mầm và được tạo mạch nha ở quy mô nhỏ

Việc phân tích về HPODE của lúa mạch được thực hiện chủ yếu như được mô tả trong WO 2005/087934, ngoại trừ việc sử dụng phôi đang nảy mầm thay vì phôi trưởng thành. Các hạt thế hệ M4 được cho nảy mầm trong 48 giờ như được mô tả trong ví dụ 2. Các hạt thế hệ M5 được đưa qua quy trình tạo mạch nha ở quy mô nhỏ chủ yếu được thực hiện như được mô tả trong ví dụ 6 dưới đây, nhưng các hàm lượng HPODE đặc biệt được xác định sau khi nảy mầm được 72 giờ, và bỏ qua quy trình sấy khô trong lò. Các hàm lượng 9-HPODE và 13-HPODE được xác định bằng cách cho phép dịch chiết protein thô chiết ra khỏi các phôi đang nảy mầm của các thế hệ M4 và M5 có đột biến A689 và các mẫu đối chứng được ủ với axit linoleic cơ chất. Các sản phẩm phản ứng được phân tích bằng HPLC.

Các phôi đã nảy mầm được phẫu tích ra khỏi các hạt lúa mạch bằng cách sử dụng dao mổ để cắt giữa vảy nhỏ và nội bào tử. Sau đó, mỗi mẫu 4 phôi lớn

được đặt vào giữa hai mẫu giấy cân, và được đập nhẹ nhàng để tạo ra bột đồng nhất. Mẫu này được chuyển tới ống vi ly tâm dung tích 1,5ml; bổ sung 600 μ l dung dịch đệm axit lactic 200mM, độ pH là 4,5 vào, và ống này được đặt trên nước đá trong 10 phút trước khi đồng nhất hoá tiếp theo bằng cách sử dụng chày chất dẻo (Kontes). Sau đó, bổ sung 600 μ l H₂O vào mỗi ống, và các mẫu này được ly tâm trong 2 phút ở tốc độ 20000 $\times$ g (200000m/s²). Phần phân ước 100 μ l của chất nổi trên bề mặt được chuyển tới ống ly tâm dung tích 15ml (Cellstar; cat. no.188271), chuẩn bị để phân tích các sản phẩm phản ứng tiếp theo tác động của LOX. 2 ml dung dịch đệm natri phosphat 100mM, độ pH là 6,5, chứa 260 μ M axit linoleic [cơ chất này được chuẩn bị bằng cách trộn 10ml dung dịch đệm natri phosphat 100mM, độ pH là 6,5, với 100 μ l dung dịch gốc 24mM axit linoleic]. Dung dịch đệm này được tạo ra bằng cách trước hết trộn 155 μ l axit linoleic (tương ứng với 134mg axit tự do; L-1376, Sigma) và 257 μ l Tween-20, sau đó bổ sung H₂O vào đến dung tích 5ml, tiếp theo đó bổ sung 600 μ l dung dịch NaOH 1M vào, và khi dung dịch này trở nên trong, thì điều chỉnh dung tích này tới 20ml bằng H₂O. Sau khi ủ được 15 phút ở tốc độ ~30 vòng/phút trên bộ quay ống máu, bổ sung 2ml etyl axetat vào, và mẫu được khuấy bằng cách lắc mạnh trong 5 giây để chiết 9-HPODE và 13-HPODE. Sau đó, mẫu này được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 800 $\times$ g (8000 m/s²), và chuyển 1ml etyl axetat vào ống vi ly tâm dung tích 1,5ml, trong đó etyl axetat được làm bay hơi dưới dòng khí nitơ. Tiếp theo, HPODE được tạo huyền phù trong 300 μ l metanol, và được lọc qua màng 0,45 μ m (Millex-HN filter, Millipore). Việc phân tích hàm lượng HPODE được thực hiện nhờ HPLC. Tổng lượng 15 μ l từ mỗi mẫu được tiêm vào thiết bị HPLC (HP 1100 Series, Hewlett Packard), được trang bị cột đối xứng C18 kích thước 4,6 $\times$ 250mm (Waters). Pha động được sử dụng là hỗn hợp gồm nước:metanol:axetonitril:tetra hydrofuran:axit trifloaxetic = 16:12:12:10:0,5 (theo thể tích). Lưu lượng pha động là 1ml/phút, và áp suất đo được ở trước cột là 140ba (14MPa). Việc tách được thực hiện ở 30°C. Việc phát hiện hydroperoxit của axit bằng các liên kết đôi tiếp hợp được thực hiện ở 234nm.

Trên FIG.5 thể hiện sự so sánh các profin HPODE thu được. Biểu đồ sắc ký của mẫu chuẩn bao gồm hỗn hợp của 9-HPODE và 13-HPODE được thể hiện trên FIG.5A. Việc so sánh biểu đồ sắc ký của dịch chiết chiết được từ các hạt thể hệ M4 của đột biến D112 có null-LOX đã nảy mầm được 48 giờ (FIG. 5B), với biểu đồ sắc ký của dịch chiết được chiết ra khỏi các hạt thể hệ M4 của đột biến A689 có null-LOX kép (FIG. 5C), đã cho thấy rõ ràng sự tạo ra 13-HPODE bởi các LOX chiết được từ các phôi đã nảy mầm của đột biến D112 có null-LOX-1, trong khi chỉ không chứa hoặc chứa lượng cực kỳ nhỏ 9-HPODE và 13-HPODE quan sát được trong các dịch chiết của đột biến A689 có null-LOX kép.

Các đặc tính giống nhau được quan sát khi phân tích các phôi kiểu đại chủng cv. Barke được tạo mạch nha ở quy mô nhỏ trong 72 giờ (FIG. 6A), đột biến D112 có null-LOX-1 (FIG.6B), và đột biến A689 có null-LOX kép (FIG.6C). Lại lần nữa, cả hai 9-HPODE và 13-HPODE với lượng đáng kể được tạo ra trong các dịch chiết của phôi trưởng thành kiểu đại chủng cv. Barke (FIG.6A). Các dịch chiết của phôi đột biến D112 có null-LOX-1 được tạo ra với lượng rất nhỏ 9-HPODE, nhưng với lượng lớn 13-HPODE (FIG.6B), vì thế kiểm chứng được sự thiếu hoạt tính của LOX-1. Và lại lần nữa, các dịch chiết ra khỏi phôi của đột biến A689 có null-LOX kép được tạo ra với lượng không đáng kể 9-HPODE và 13-HPODE (FIG.6C), xác nhận sự không có tổng hoạt tính của cả LOX-1 và LOX-2.

Ví dụ 5

Đặc tính của đột biến A689 của lúa mạch có null-LOX kép, giống mẹ có null-LOX-1 Ca211901 của nó, và đột biến D112 có null-LOX-1

Nhân giống cây trồng trong nhà kính: Các hạt thể hệ M4 và M5 của đột biến A689 có null-LOX kép và dòng mẹ Ca211901 của nó được cho nảy mầm trong nhà kính, và được sinh trưởng trong các chu kỳ hằng ngày với 20 giờ có ánh sáng ở 12°C và độ ẩm tương đối là 65%. Các đặc điểm sinh trưởng của các cây dòng Ca211901 và đột biến A689 có null-LOX kép là giống nhau về chiều cao của cây, số lượng nhánh gốc ở mỗi cây, thời gian bắt đầu ra hoa, và số lượng

hạt ở mỗi bông - làm nổi bật rằng sinh lý học của sự phát triển và sinh trưởng của hạt đột biến A689 là giống lúa mạch kiểu đại.

Đặc trưng nông học của đột biến A689 trong điều kiện trên cánh đồng: Các cây đột biến A689 có null-LOX kép và đột biến D112 có null-LOX-1, cũng như các cây dòng Ca211901, được so sánh với các tính trạng chuẩn trên cánh đồng - nhằm mục đích nhận dạng sự khác nhau có thể về chiều cao của cây, thời gian trổ bông, sự đề kháng bệnh tật, dừng phát triển, gãy thân cây, thời gian trưởng thành, và năng suất (xem bảng 2). Do đó, các hạt nêu trên với số lượng bằng nhau được gieo trên các mảnh đất diện tích 7,88m² ở một vị trí, mỗi mảnh đất có hai bản sao chép. Các đặc tính nông học, một lần nữa nhấn mạnh về các tính chất nêu trên, được quan sát một cách kỹ lưỡng trong toàn bộ thời kỳ sinh trưởng. Không có sự khác nhau về dấu hiệu nông học quan sát được đối với cây bất kỳ được thử nghiệm.

Bảng 2. So sánh về đặc trưng nông học

Tính chất	Đột biến A689	Dòng mẹ Ca211901	Đột biến D112
Kiểu hình LOX	null-LOX-1, null-LOX-2	null-LOX-1, LOX-2 kiểu đại	null-LOX-1, LOX-2 kiểu đại
ngày gieo năm 2007	29 tháng ba	29 tháng ba	29 tháng ba
chiều cao lúc chín (cm)	68	69	74
thời gian trổ bông (2007)	14 tháng 6	14 tháng 6	12 tháng 6
nấm mốc bột *	0	0	0
đốm vết điểm *	3	3	2
đốm vết lưới *	1	1	1
nhánh*	3	3	2
bệnh gỉ sắt*	1	1	2
dừng phát triển*	2	2	4

ngày chín năm 2007	1 tháng tám	1 tháng tám	1 tháng tám
năng suất tương đối			
năm 2007**	107	108	100
năng suất tương đối			
năm 2008**	104	103	99

* Trên thang điểm từ 0 đến 9, trong đó 0 biểu thị không bị nhiễm bệnh hoặc dừng phát triển, và 9 biểu thị nhiễm bệnh nặng hoặc dừng phát triển.

** Đặc trưng năng suất tương đối so sánh với chủng cv. Barke, giống mẹ của đột biến D112 có null-LOX-1.

Ví dụ 6

Phân tích mạch nha ở quy mô nhỏ và các chế phẩm ủ men của nó

Việc tạo mạch nha ở quy mô nhỏ được thực hiện với các mẫu với lượng 100g từ các đột biến A689 và D112 của lúa mạch, cũng như các chủng cvs. Barke và Power. Các dòng đột biến này được nhân giống trên thực địa trong một vài mùa để thu được chất liệu hạt đủ dấu hiệu về sự tạo mạch nha và sản xuất bia.

Ngâm: Điều kiện ngâm là: 8 giờ ướt; 14 giờ khô; 8 giờ ướt; 10 giờ khô; 4 giờ ướt trong nước ngâm ở 16°C.

Tạo mạch nha: Điều kiện là: 12 giờ ở 18°C; 24 giờ ở 16°C; 24 giờ ở 14°C; 60 giờ ở 12°C. Điều kiện sấy trong lò là: 12 giờ ở 60°C; 3 giờ ở 68°C; 4 giờ ở 74°C; 3 giờ ở 80°C. Mạch nha thành phẩm được đưa qua đo lượng T2N.

Ngoài ra, các mẫu lúa mạch và mạch nha của các đột biến A689 và D112, cũng như các mẫu lúa mạch và mạch nha của các chủng Barke và Power được đưa qua phân tích bằng các phương pháp EBC chuẩn (xem Bảng 3).

Chuẩn bị chế phẩm ủ men: Để thử nghiệm các đặc tính của các đột biến A689 và D112 so với chủng cv. Power, các mẫu mạch nha với lượng 25-225g được chuẩn bị, và được sử dụng trong thiết bị ngâm ủ phòng thí nghiệm bao gồm một máy khuấy ngoài và một bể nước được trang bị bộ điều chỉnh nhiệt độ có khả năng thay đổi nhiệt độ trong một mẫu xác định. Việc ngâm ủ được thực

hiện ở quy mô nhỏ, với mạch nha thành phẩm được tách ra thông qua một bộ lọc giấy để thu được chế phẩm ủ men ngọt. Chế phẩm ủ men sôi được thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm bằng cách sử dụng lò sưởi bằng nhiệt và bình đáy tròn được kết nối với bộ làm mát hồi lưu.

Cả hai chế phẩm ủ men ngọt và sôi được đo lượng T2N (xem các hình vẽ từ FIG.7 đến FIG.9). Đối với các mẫu thu được từ các hạt thể hệ M5 của đột biến A689 có null-LOX kép, quan sát được mức giảm rõ rệt ~75% lượng T2N (số liệu trung bình từ ba dòng của đột biến A689). Ngoài ra, mức giảm đáng kể về lượng được ghi đối với cả T2N tự do và tiền chất T2N trong chế phẩm ủ men sản xuất được từ các mẫu được tạo mạch nha ở quy mô nhỏ (các hình vẽ từ FIG.8 đến FIG.9).

Lượng T2N được xác định nhờ sắc ký khí với bộ dò phổ khối (GC-MS), sau đó tạo dẫn xuất carbonyl với O-(2,3,4,5,6-pentaflorobenzyl)-hydroxylamin, chủ yếu như được mô tả bởi Groenqvist và các đồng tác giả (1993).

Bảng 3. Phân tích mạch nha ở quy mô nhỏ.

Mẫu		cv. Power	Đột biến A689	Đột biến D112
Kiểu gen LOX		LOX-1 kiểu dại, LOX-2 kiểu dại	null-LOX-1, null-LOX-2	null-LOX-1, LOX-2 kiểu dại
Lúa mạch				
Độ ẩm	%*	9,3	9,5	10,5
Protein	%*	12	10,6	10,9
Tinh bột	%*	61,7	63,0	62,4
Nảy mầm, 72 giờ	%	100	95	95
Chỉ số nảy mầm		9,9	6,6	8,3
	>2,5			
Sàng lọc	mm	97	98,8	91,6

TKW	G	48,6	55,8	37,5
β -Glucan	%, dry	4,0	3,6	3,3
β -Amylaza**	U/g	1039	1458	1027
dự báo DP	WK	385	538	381

Mạch nha

Thời gian tạo mạch nha	H	124	148	124
Hiệu suất mạch nha	%	95,1	95,9	95,3
Độ ẩm	%*	4,8	5,6	4,6
Protein, khô	%*	11,2	10,3	9,9
Nitơ khô	%*	1,72	1,65	1,58
Nitơ hòa tan	%*	0,67	0,62	0,64

Chế phẩm ủ men

Dịch chiết	%*	81,0	81,0	80,9
	%*,			
β -Glucan	dry	0,2	0,3	0,26
Mức biến tính mạch nha	%	95	95	96
Mức đồng thể mạch nha	%	81	70	71
β -Amylaza**	U/g	956	1235	937
Dự báo DP	WK	385	478	379
α -Amylaza***	U/g	242	234	264

* đo được nhờ phổ truyền gần hồng ngoại chuẩn.

** hoạt tính β -Amylaza được đo bằng cách sử dụng kit Megazym (mã sản phẩm K-BETA).

*** hoạt tính α -Amylaza được đo bằng cách sử dụng kit Megazym (mã sản phẩm K-CERA).

Ví dụ 7

THA trong bia sản xuất được từ mạch nha của đợt biến A689 có null-LOX kép

Các THA đặc thù trong bia có thể thu được từ axit linoleic (Drost và các đồng tác giả, 1974). Một số thông báo đã kiểm chứng rằng tổng hàm lượng THA trong bia nằm trong khoảng từ 5,7 đến 11,4 μ g/ml (Hamberg, 1991; và các tài liệu được trích dẫn trong đó). Trong khi 9,12,13-THA thường cấu thành 75-85% THA trong bia, thì hàm lượng của 9,10,13-THA thường chiếm chỉ 15-25%. Các isome khác được phát hiện ở dạng lượng vết.

Trong bia sản xuất được từ chế phẩm ủ men tạo ra được từ mạch nha của đột biến A689 lúa mạch có null-LOX kép (xem ví dụ 8, ngoại trừ việc sử dụng bước ngâm ủ ở nhiệt độ 60°C), nồng độ của 9,12,13-THA giảm 75% so với bia đối chứng sản xuất được từ mạch nha chủng cv. Power, và giảm 45% so với đột biến thô D112 có null-LOX-1 (Bảng 4). Những khác biệt tương tự cũng quan sát thấy đối với isome 9,10,13-THA. Các số đo này được thực hiện bằng cách sử dụng phép phân tích phổ khối HPLC chuẩn (Hamberg, nêu trên).

Bảng 4. THA trong bia sản xuất được từ mạch nha chủng cv. Power, đột biến D112 có null-LOX-1, và đột biến A689 có null-LOX kép (trị số trung bình của 3 số đo).

Loại mạch nha	THA		
	9,12,13-	9,10,13-	9,12,13- : 9,10,13-
	<i>ppm</i>		<i>Tỷ lệ</i>
Chủng cv. Power	3,76	1,12	3,35
Đột biến D112	1,72	0,94	1,80
Đột biến A689	0,94	0,50	1,88

Ví dụ 8

Tạo mạch nha và sản xuất bia thử nghiệm

Tạo mạch nha: Các thử nghiệm này được thực hiện với các hạt của đột biến A689 có null-LOX kép, đột biến D112 có null-LOX-1, và chủng cv. Power (trong tất cả các trường hợp đều thu hoạch trong năm 2007). Việc tạo mạch nha được thực hiện ở quy mô lớn 30 kg trong nhà tạo mạch nha như sau:

- (i) Ngâm ở 16°C: 8 giờ ướt; 14 giờ khô; 8 giờ ướt; 10 giờ khô; 4 giờ ướt;

(ii) Tạo mạch nha: 12 giờ ở 18°C; 24 giờ ở 16°C; 24 giờ ở 14°C; 60 giờ ở 12°C;

(iii) Sấy khô: 12 giờ ở 60°C; 3 giờ ở 68°C; 4 giờ ở 74°C; 3 giờ ở 80°C.

Các tính chất của lúa mạch và mạch nha được liệt kê trong Bảng 5. Việc xét nghiệm các kết quả đã khám phá ra rằng các mẫu này làm đầy các đặc tính của mạch nha để sử dụng làm nguyên liệu sản xuất bia.

Bảng 5. Số liệu thử nghiệm

		Chủng cv.	Đột biến	Đột biến	Chủng cv.
Mẫu		Power	A689	D112	Barke
Kiểu gen LOX		LOX-1	null-	null-	LOX-1
		kiểu đại,	LOX-1	LOX-1	kiểu đại
		LOX-2	null-	LOX-2	LOX-2
		kiểu đại	LOX-2	kiểu đại	kiểu đại
Lúa mạch					
Protein	%*	12,0	10,6	10,9	10,6
Tinh bột	%*	61,7	63,0	62,5	64,2
Nảy mầm, 72 giờ	%	100	95	85	100,0
Chỉ số nảy mầm	1–10	9,9	6,6	8,3	9,6
Độ nảy nước	%	1	78	45	14
Loại hạt >2,5 mm	%	97,0	98,8	91,6	88,3
TKW	g	48,6	55,8	37,5	49,5
	%,				
β -Glucan	khô	4,0	3,6	3,3	3,6
β -Amylaza**	U/g	1039	1458	1027	1093
Mạch nha					
Thời gian ngâm					
và nảy mầm	h	124	148	124	124,0

Dịch chiết	%*	81,0	80,7	80,9	82,5
Chỉ số Kolbach	%	37,5	37,1	40,2	42,0
Mức biến tính	%	95	94	97	96
Mức đồng nhất hóa	%	81	61	81	83
	%,				
β -Glucan	khô	0,2	0,3	0,2	0,1
β -Amylaza**	U/g	956	1261	928	985
α -Amylaza***	U/g	242	222	262	201

* đo được nhờ phổ truyền gần hồng ngoại chuẩn.

** hoạt tính β -Amylaza được đo bằng cách sử dụng kit Megazym (mã sản phẩm K-BETA).

*** hoạt tính α -Amylaza được đo bằng cách sử dụng kit Megazym (mã sản phẩm K-CERA).

Sản xuất bia thử nghiệm bằng mạch nha: Thử nghiệm ban đầu 200 lít, với các kết quả quan trọng của nó được minh họa trên FIG.10A, FIG.B, bao gồm các bước sau:

- (i) sản xuất chế phẩm ủ men;
- (ii) đun sôi chế phẩm ủ men;
- (iii) lên men;
- (iv) tàng trữ bia;
- (v) lọc bia sáng; và
- (vi) đóng chai.

Các chế phẩm ủ men sản xuất được bằng cách sử dụng các mẫu mạch nha với lượng lớn là 30kg chủng cv. Power, đột biến D112 có null-LOX-1, và null-LOX kép. Ngâm ủ ở 48°C trong 20 phút, sau đó đun nóng trong 18 phút để nâng nhiệt độ từ 48°C đến 67°C. Việc tạo đường tạm ngừng ở 67°C trong 30 phút, sau đó là bước nâng nhiệt độ đến 72°C trong 5 phút, và nghỉ 15 phút trước khi

ngừng ngâm ủ ở 78°C. Các bước sản xuất bia như được nêu trên - tức là đun sôi và lọc chế phẩm ủ men, tách bằng cách xoáy nước, lên men, tàng trữ bia, và đóng chai vào các chai thủy tinh màu xanh – theo yêu cầu về thực tế sản xuất bia tiêu chuẩn.

Lượng tiền chất T2N của bia thành phẩm được xác định (FIG.10) bằng cách sử dụng trạm thử nghiệm tương tự như được mô tả trong ví dụ 6. Các kết quả thử nghiệm ở quy mô lớn này thể hiện xu hướng tương tự về lượng tiền chất T2N có liên quan như trong chế phẩm ủ men sôi được tạo mạch nha từ các hạt ở quy mô nhỏ (so sánh các hình vẽ FIG.9 và FIG.10), lại lần nữa cho thấy một cách đáng lưu ý là các lượng này ở cả hai đột biến D112 có null-LOX-1 và đột biến A876 có null-LOX kép đều nhỏ hơn so với các lượng ở chủng cv. Power. Đặc biệt hơn, lượng các tiền chất T2N lần lượt giảm ~40% và ~70% trong các mẫu bia có null-LOX-1 và null-LOX kép, so sánh với bia được nấu bằng mạch nha kiểu đại chủng cv. Power.

Ngoài ra, lượng T2N tự do đo được trong bia được nấu thử nghiệm nêu trên, lại lần nữa thể hiện xu hướng tương tự như quan sát được đối với T2N tiềm năng – cụ thể là các bia sản xuất được từ mạch nha có null-LOX-1 và mạch nha có null-LOX kép là với lượng nhỏ hơn đáng kể so với T2N trong bia sản xuất được từ mạch nha chủng cv. Power. Do đó lại lần nữa, về lượng T2N, bia sản xuất được bằng mạch nha có null-LOX kép được minh chứng là tốt hơn so với bia được nấu bằng mạch nha có null-LOX-1.

Một mục đích riêng được thiết lập là liệu có phải về chất lượng vị các bia sau khi được cất giữ cưỡng bức kéo dài là tốt hơn khi chúng sản xuất được ở quy mô 200 lít bằng cách sử dụng nguyên liệu null-LOX kép hay không. Do đó, Hội đồng chuyên ga đánh giá hương vị bia như được mô tả trong ví dụ 9 đã được chất vấn để đánh giá bia thông thường được sản xuất thử nghiệm về hương vị vị lạ do giấy sau khi được cất giữ cưỡng bức kéo dài ở 37°C trong một tuần, bằng cách sử dụng điểm số từ 0 (không có) đến 5 (cực nhiều). Trong khi bia sản xuất được bằng chủng cv. Power được phát hiện để đạt được điểm số vị giấy là 1,6, thì điểm số này đối với bia sản xuất được bằng mạch nha có null-LOX-1 và null-

LOX kép lần lượt là 1,2 và 0,6. Kết quả này đánh giá đúng thực chất cao hơn hẳn của nguyên liệu null-LOX kép để sản xuất bia có mùi vị ổn định.

Ví dụ 9

So sánh bia thông thường và bia sản xuất được bằng lúa mạch

Các hạt lúa mạch của đột biến A689 có null-LOX kép, đột biến D112 có null-LOX-1, và lúa mạch kiểu đại chủng cv. Power được xử lý sản xuất bia giống như nhau, mỗi loại sử dụng 25 kg lúa mạch nghiền chưa được tạo mạch nha làm vật liệu thô để sản xuất 200 lít bia (để so sánh, sử dụng 30 kg mạch nha nghiền để sản xuất 200 lít bia thông thường trong thử nghiệm được thực hiện song song). Mục đích không chỉ là so sánh các tính chất của chế phẩm ủ men và bia sản xuất được bằng lúa mạch và từ mạch nha, mà còn nhằm xác định xem liệu có phải các đột biến nêu trên có thể cải thiện được các đặc tính vị lạ trong cả hai bia thành phẩm thông thường và bia được nấu bằng lúa mạch hay không. Các thử nghiệm sản xuất bia ở quy mô lớn 200 lít bao gồm các bước sản xuất tương tự như được liệt kê trong ví dụ 8, với các chi tiết đặc thù được mô tả dưới đây.

Ngâm ủ và sản xuất bia bằng lúa mạch: Trong thử nghiệm này, chế phẩm ủ men sản xuất được với sự có mặt của hỗn hợp enzyme Ondea Pro (Novozymes; mẻ No. NFNG0005), được bổ sung vào bước ngâm ủ theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tức là 87,5 g hỗn hợp enzyme cho mỗi 80 lít H₂O). Các điều kiện ngâm ủ là: ngâm ủ ở 54°C trong 30 phút; đun nóng trong 10 phút để nâng nhiệt độ lên đến 64°C; ủ trong 45 phút ở 64°C; đun nóng tiếp đến 78°C trong 13 phút; tạm ngừng 10 phút ở 78°C. Các bước sản xuất bia bao gồm bước lọc và đun sôi chế phẩm ủ men, tách bằng cách xoáy nước, lên men, làm đậm bia, và đóng chai vào các chai thủy tinh màu xanh theo yêu cầu kỹ thuật về thực tế sản xuất bia tiêu chuẩn.

Tạo mạch nha, ngâm ủ, và sản xuất bia chuẩn: Việc tạo mạch nha dùng các hạt lúa mạch của đột biến A689 có null-LOX kép, đột biến D112 có null-LOX-1, và lúa mạch kiểu đại chủng cv. Power (tất cả đều thu hoạch trong năm 2009). Thời gian ngâm ủ ở 16°C là: 8 giờ ướt; 14 giờ khô; 8 giờ ướt; 10 giờ khô;

4 giờ ướn. Các điều kiện tạo mạch nha là: 12 giờ ở 18°C; 24 giờ ở 16°C; 24 giờ ở 14°C; 60 giờ ở 12°C. Các điều kiện sấy trong lò là: 12 giờ ở 60°C; 3 giờ ở 68°C; 4 giờ ở 74°C; 3 giờ ở 80°C. Việc phân tích nguyên liệu lúa mạch và mạch nha nêu trên được thực hiện theo các phương pháp tiêu chuẩn EBC, với các kết quả được liệt kê trong bảng 6. Tất cả mạch nha đều được coi là thích hợp để sản xuất bia.

Các điều kiện ngâm ủ là: ủ ban đầu ở 48°C trong 20 phút; đun nóng kéo dài trong 18 phút đến nhiệt độ 67°C; ủ 30 phút ở 67°C; sau đó đun nóng tiếp đến 72°C trong 5 phút; ủ 15 phút ở 72°C; đun nóng tiếp đến 78°C trong 6 phút; kết thúc bằng cách ủ trong 5 phút ở 78°C. Các bước sản xuất bia bao gồm bước lọc và đun sôi chế phẩm ủ men, tách bằng cách xoáy nước, lên men, tàng trữ bia, và đóng chai vào các chai thủy tinh màu xanh là theo yêu cầu kỹ thuật về thực tế sản xuất bia tiêu chuẩn.

Phân tích chế phẩm ủ men sôi về T2N tự do: Lượng T2N trong các dịch chiết được xác định nhờ sắc ký khí bằng phổ khối (GC-MS) sau khi chiết pha rắn trên cột C18, và tạo dẫn xuất carbonyl với O-(2,3,4,5,6-pentaflorobenzyl)-hydroxylamin, về cơ bản như được mô tả bởi Groenqvist và các đồng tác giả (1993); cũng xem ví dụ 5.

Khi so sánh trực tiếp với các mẫu chủng cv. Power và đột biến D112 có null-LOX-1, quan sát thấy mức giảm đáng kể về lượng T2N tự do trong chế phẩm ủ men sôi sản xuất được từ cả hai loại mạch nha của đột biến A689 có null-LOX kép để sản xuất bia lúa mạch và bia thông thường (FIG.11). Khi so sánh với chế phẩm ủ men sôi để sản xuất bia lúa mạch được tạo ra từ đột biến LOX-1, thì T2N tự do của đột biến A689 có null-LOX kép cho thấy giảm ~45% về lượng (đối với các mẫu được tạo mạch nha tương ứng, mức giảm này là ~15%).

Tương tự, lượng T2N tự do trong bia sản xuất được từ đột biến A689 có null-LOX kép giảm ~72% được ghi nhận so với lượng này trong bia sản xuất được từ chủng cv. Power (đối với các mẫu được tạo mạch nha tương ứng, mức giảm này là ~45%).

Phân tích chế phẩm ủ men sôi về tiền chất T2N: Tiền chất T2N trong các mẫu chế phẩm ủ men sôi để sản xuất bia từ lúa mạch và và bia thông thường sản xuất được từ chủng cv. Power, đột biến D112 có null-LOX-1, và đột biến A689 có null-LOX kép được xác định nhờ GC-MS sau khi tạo dẫn xuất carbonyl với O-(2,3,4,5,6-pentaflorobenzyl)-hydroxylamin, về cơ bản như được mô tả bởi Groenqvist và các đồng tác giả (nêu trên).

Như được minh họa trên FIG.12, tiền chất T2N của chế phẩm ủ men sôi để sản xuất bia từ lúa mạch và và bia thông thường với lượng nhỏ một cách rõ rệt trong các mẫu từ đột biến A689 có null-LOX kép giảm tới ~70% so với lượng này của chế phẩm ủ men sản xuất được từ lúa mạch kiểu đại chủng cv. Power (các lượng giảm cũng được ghi lại khi so sánh với các mẫu từ đột biến D112 có null-LOX).

Phân tích bia lúa mạch được cất giữ cường bức kéo dài chỉ về lượng T2N tự do: Bia đóng chai thu được từ chế phẩm lên men của các mẫu chế phẩm ủ men để sản xuất bia từ lúa mạch – và chứa sulfite với lượng tương tự - được phân tích về lượng T2N được tạo ra trong thời gian một tháng trước khi đưa vào sản xuất.

Bia lúa mạch nêu trên được cất giữ cường bức kéo dài ở 37°C để tiếp tục tạo ra T2N tự do, như được mô tả trên đây.

Như được minh họa trên FIG.13A, ba loại bia sản xuất được bằng lúa mạch được phân biệt một cách dễ dàng do những khác biệt rõ rệt về động học phát triển của T2N. Trong khi bia so sánh sản xuất được từ lúa mạch chủng cv. Power được tạo ra bia kỳ vọng (T2N với lượng 64 ppt sau khi cất giữ 8 tuần ở 37°C) – với lượng T2N từ 10 đến 20% cao hơn so với bia tương tự sản xuất được từ mạch nha (không được thể hiện) – sự phát triển của T2N quan sát được trong bia sản xuất được từ lúa mạch thu được từ đột biến có null-LOX kép là rất yếu và không được kỳ vọng (T2N với lượng 16 ppt sau khi cất giữ 8 tuần ở 37°C), tương ứng với mức giảm 75% về T2N tự do của bia thành phẩm. Đối với bia sản xuất được từ đột biến D112 của lúa mạch có null-LOX-1 khi được so

sánh với bia loại tương tự từ các hạt kiểu đại, thì lượng T2N tự do nhỏ hơn 52% sau khi cất giữ 8 tuần.

Thử nghiệm về việc cất giữ cường bức kéo dài làm nổi bật sự khác biệt đáng kể trong số các bia được phân tích. Sau 1,5 tuần, lượng T2N của bia so sánh, sản xuất được từ lúa mạch chủng cv. Power vượt quá mức ngưỡng vị là ~50 ppt, trong khi lượng T2N này là không tới ~16 ppt trong bia sản xuất được từ đột biến 689 có null-LOX kép, vì thế đối với đột biến D112 có null-LOX-1 lượng T2N là tốt hơn nhiều so với 32 ppt.

So sánh về lượng tiền chất T2N của bia sản xuất được từ lúa mạch và bia thông thường: Trên FIG. 13B giới thiệu tóm tắt dữ liệu về lượng tiền chất T2N quy định trong bia tươi thu được từ nguyên liệu để sản xuất bia từ lúa mạch và nguyên liệu được tạo mạch nha, cả hai loại này được sản xuất với dung tích 200 lít. Lại lần nữa, vật liệu thô có null-LOX kép là tốt hơn về các tính chất đo được, thực tế là T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn trong bia sản xuất được từ lúa mạch (1,2 ppb), so với trong bia được sản xuất từ mạch nha có null-LOX-1 (1,5 ppb).

So sánh bia được sản xuất từ lúa mạch và bia thông thường về sự phát triển cường bức của T2N: Cũng trong trường hợp này, tức là cất giữ cường bức kéo dài bia ở 37°C, có sự khác biệt đáng kể giữa bia sản xuất được từ vật liệu thô kiểu đại và vật liệu thô có đột biến (FIG.13C). Trong khi cả bia sản xuất được từ lúa mạch và bia thông thường sản xuất được từ các hạt kiểu đại chủng cv. Barke biểu hiện T2N với lượng ~50 ppt sau hai tuần, thì các trị số tương ứng lần lượt giảm ~50% và ~75% đối với vật liệu thô từ đột biến D112 có null-LOX-1 và đột biến A876 có null-LOX kép. Xu hướng tương tự được quan sát thấy sau khi cất giữ cường bức kéo dài ba tuần. Do đó, thực chất là việc sử dụng nguyên liệu để sản xuất bia làm thiếu enzym LOX biểu thị phương pháp tốt hơn nhằm làm giảm đáng kể sự phát triển của T2N trong khi cất giữ kéo dài. Và tiếp theo về vấn đề này, vật liệu thô từ đột biến A876 có null-LOX kép là tốt hơn so với vật liệu thô của đột biến D112 có null-LOX-1.

So sánh bia sản xuất được từ lúa mạch và bia thông thường về THA: Các THA đặc thù của bia sản xuất được từ axit linoleic đã được mô tả trong thời gian

mấy thập kỉ trước (Drost và các đồng tác giả, 1974). Sau đó, các thông báo khác nhau đã khẳng định rằng tổng lượng THA trong bia nằm trong khoảng từ ~5 đến 12 ppm (Hamberg, 1991; và các tài liệu được trích dẫn trong đó). Trong khi 9,12,13-THA thường cấu thành 75-85% các THA trong bia, thì lượng 9,10,13-THA chiếm từ 15 đến 25%; các chất đồng phân khác được phát hiện là các lượng vết.

Trong bia thử nghiệm ở quy mô 200 lít sản xuất được từ lúa mạch tươi với vật liệu thô là đột biến D112 có null-LOX-1 và đột biến A689 có null-LOX kép, lượng 9,12,13-THA và 9,10,13-THA thu được từ con đường LOX-1 và LOX-2 lần lượt được phát hiện là giảm ~60% và ~80%, so với lượng này trong chủng cv. Power đối chứng (FIG.14A). Điều ngạc nhiên là sản phẩm THA chính thu được từ nhánh LOX-2 của con đường LOX chứa 9,10,13-THA với lượng lớn, đo được trong bia sản xuất được từ lúa mạch chứa đột biến D112 có null-LOX-1, cụ thể là +47% so với lượng này trong bia sản xuất được từ chủng cv. Power. Kết quả trái ngược thu được là, với đột biến A689 có null-LOX kép, lượng đo được giảm 60%, lại lần nữa so sánh với chủng cv. Power. Các kết quả của thử nghiệm riêng đã xác nhận kết luận nêu trên. Cơ sở phân tử để theo dõi là khó nắm được, nhưng một số cơ chế tế bào có thể được nghiên cứu để đạt được sự cân bằng đối với sự vắng mặt của LOX-1 trong đột biến D112 bằng cách tăng cường sự tổng hợp enzyme kèm theo khi tạo ra 9,10,13-THA.

Với lý do đó, bia lúa mạch được sản xuất từ đột biến A689 có null-LOX kép tạo ra tỷ lệ 9,12,13-THA:9,10,13-THA nhỏ hơn so với từ chủng cv. Power.

Việc xác định lượng 9,12,13-THA và 9,10,13-THA, kết hợp với việc xác định tỷ lệ giữa chúng, là yếu tố ban đầu tiện lợi để chỉ báo xem liệu có phải là bia sản xuất được bằng cách sử dụng lúa mạch chứa đột biến A689 có null-LOX kép hay không. Tuy nhiên, sự đánh giá vững chắc về điều này cho thấy có thể kèm theo các xét nghiệm bổ sung như được mô tả trong đơn này.

Trong bia được sản xuất từ mạch nha chứa đột biến A689 có null-LOX kép, nồng độ của 9,12,13-THA và 9,10,13-THA thu được từ con đường LOX lần lượt được phát hiện là giảm ~75% và ~40%, so với bia đối chứng được sản

xuất từ chủng cv. Power được tạo mạch nha (FIG.14B). Trong bia này, tỷ lệ 9,12,13-THA:9,10,13-THA có thể cũng được coi là rất nhỏ so với bia được sản xuất từ chủng cv. Power. Nói chung, nhưng không chỉ trong tất cả các trường hợp, lượng THA trong bia sản xuất được từ mạch nha là hơi nhỏ hơn so với trong bia sản xuất được từ lúa mạch (so sánh FIG.14A và FIG.14B).

Phân tích bia sản xuất được từ lúa mạch chỉ về tính ổn định vị và mùi thơm: Hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia nêu trên đánh giá bia sản xuất được từ lúa mạch chủng cv. Power, đột biến D112 có null-LOX-1 và đột biến A689 có null-LOX kép được cất giữ cưỡng bức kéo dài.

Nói chung, hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia đã phát hiện biên dạng vị đáp ứng yêu cầu đối với tất cả các loại bia tươi và bia được cất giữ cưỡng bức kéo dài sau 1 tuần ở 37°C. Tuy nhiên, điểm số vị "giấy" là cao hơn đáng kể đối với bia so sánh so với bia sản xuất được bằng cách sử dụng mạch nha chứa đột biến A689 có null-LOX kép và đột biến D112 có null-LOX-1 (FIG.15A), tức là bia đối chứng khác biệt ở chỗ, có vị hôi do giấy nêu trên mạnh hơn. Nói chung, hội đồng chuyên gia đánh giá hương vị bia ưa chuộng hơn so với bia được sản xuất từ lúa mạch chứa đột biến A689 có null-LOX kép.

Hội đồng chuyên gia vị cũng đánh giá vị "ngấu" nói chung hơn sau khi cất giữ bia trong thời gian từ 1 đến 3 tháng ở 30°C, lại lần nữa chứng minh rằng điểm số vị nêu trên là cao hơn đáng kể đối với bia sản xuất được từ chủng cv. Power và có null-LOX-1 so với điểm số vị bia được sản xuất từ lúa mạch chứa đột biến A689 có null-LOX kép (FIG. 15B).

Tóm lại, tính ổn định vị được cải thiện của bia được sản xuất từ lúa mạch và bia thông thường được sản xuất từ đột biến 689 có null-LOX kép là đáng kể - đơn giản là vì lượng T2N nhỏ sau khi bảo quản, cụ thể là bảo quản ở nhiệt độ cao. Do đó, các tác động của LOX-1 và LOX-2 trong các quy trình sản xuất bia là các quyết định quan trọng để biểu hiện T2N, một hợp chất tạo vị lạ trong bia ngấu.

So sánh bia sản xuất được từ lúa mạch và bia thông thường về bọt bia: Bia được sản xuất từ lúa mạch và bia đối chứng được khử khí trong 20 phút trong bể

siêu âm trước khi bổ sung 50ml H₂O vào 150ml bia. Hỗn hợp này được rót chậm vào tháp bọt bao gồm ống bằng thủy tinh dài 16 cm, rộng 7 cm (với bộ lọc thủy tinh và đầu nổi lần lượt trên và dưới). Khí N₂, với tốc độ nhỏ 400 ml/phút, được sục qua hỗn hợp nêu trên từ phía dưới để tạo ra bọt bia. Khí này được dẫn qua ống, và được thu gom vào phễu lắng kiểu bậc được bố trí trên quả cân.

Tổng lượng bọt được ghi ở các khoảng thời gian là 5 phút cho đến khi ngừng sự phát triển của bọt cả đối với bia sản xuất được từ lúa mạch (FIG.16A) và bia sản xuất được từ mạch nha (FIG.16B). Trong mỗi trường hợp, vật liệu thô để sản xuất bia là từ đột biến A689 có null-LOX kép tạo ra nhiều bọt nhất. Thực tế, sự phát triển của bọt trong bia sản xuất được từ lúa mạch là tốt hơn so với bia sản xuất được từ mạch nha.

Bảng 6. Phân tích lúa mạch, mạch nha, chế phẩm ủ men, và bia

Mẫu		Chủng cv. Power	Đột biến D112	Đột biến A689
Phân tích lúa mạch				
Protein	%*	11,7	11,2	10,1
Tinh bột	%*	63,3	62,9	62,7
Nảy mầm ở 72 giờ	%	98	99	99
Chỉ số nảy mầm	1–10	8,4	7,8	7,8
Độ nảy nước	%	9	17	24
Loại hạt >2,5 mm	%	96,2	98,9	98,0
TKW	g	48,2	54,2	47,7
β-Amylaza (lúa mạch)*	U/g	1039	979	1491
trans-2-Nonenal [†]	ppb	270	190	150
Phân tích mạch nha, chế phẩm ủ		men, và bia		
Ngâm và làm nảy mầm	h	120	120	120

Dịch chiết	%*	81,5	81,2	81,4
N hòa tan	%, NIT*	0,67	0,63	0,64
Mức biến tính	%	96	97	97
Mức đồng nhất hóa	%	88	86	81
β -Amylaza**	U/g	768	865	1007
α -Amylaza***	U/g	175	172	200
trans-2-Nonenal [†]	ppb	1100	470	390
Độ rượu	%	3,94	3,87	3,80
Dịch chiết thực	% Plato	3,76	3,80	3,30
Độ pH		4,3	4,2	4,2
Màu	EBC U	7,1	8,2	5,2
Dịch chiết ban đầu	% Plato	11,42	11,33	10,72
Mức độ lên men thực tế	%	68,4	67,8	70,4
Độ rượu	% (thể tích)	4	3	4
Hàm lượng CO ₂	g/l	5,6	6,1	5,9
Hàm lượng SO ₂	ppm	4	4	5
Hàm lượng diacetyl	ppm	23	21	10

* đo được nhờ phổ truyền gần hồng ngoại chuẩn.

** hoạt tính β -Amylaza được đo bằng cách sử dụng kit Megazym (mã sản phẩm K-BETA).

*** hoạt tính α -Amylaza được đo bằng cách sử dụng kit Megazym (mã sản phẩm K-CERA).

[†] cơ bản đo được như được mô tả bởi Groenqvist và các đồng tác giả (1993).

Ví dụ 10

Gen đối với LOX-2 trong đột biến A689 của lúa mạch được đột biến

Trình tự gen nucleotit mã hóa LOX-2 của chủng cv. Barke (SEQ ID NO:1) và của đột biến A689 có null-LOX kép (SEQ ID NO:2) thu được như

được mô tả dưới đây. Sau đó, các trình tự thu được này được so sánh để xác định cơ sở phân tử đối với kiểu gen của đột biến A689 có null-LOX-2, kiểu hình này khác biệt ở chỗ, không có hoạt tính LOX-2 trong hạt lúa mạch đang nảy mầm.

Đối với mục đích so sánh nêu trên, các ADN bộ gen của lúa mạch từ đột biến A689 và lúa mạch kiểu đại chủng cv. Barke được phân lập ra khỏi các lá non của cây giống con bằng cách sử dụng Kit phân lập ADN thực vật (Roche). Hai trình tự 3331-bp bao phủ các vùng mã hóa protein đối với LOX-2 trong ADN bộ gen của đột biến A689 và chủng cv. Barke được mở rộng bởi PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi 5'-CGCAGCGAGCTAACTTAGAAGCGTGCCACA-3' (SEQ ID NO:3) và 5'-CCTCATGCCTTTGTGCTATCCTTGCTTGCT-3' (SEQ ID NO:4); cơ sở đối với các trình tự mồi này chứa trình tự gen di truyền đối với LOX-2 (tức là SEQ ID NO:1).

Các phản ứng PCR bao gồm 100ng ADN bộ gen được tạo huyền phù trong 20 µl dung dịch đệm phản ứng chứa 5 pmol mỗi đoạn mồi và 3,0 đơn vị (U) polymeraza FailSafe (Epicentre). Các lần khuếch đại PCR được tiến hành trong thiết bị điều khiển chu trình MJ, bằng cách sử dụng các thông số sau: 30 giây ở 98°C trong 1 chu kỳ; 15 giây ở 98°C; 30 giây ở 65°C; và 60 giây ở 72°C đối với 30 chu kỳ; 10 phút ở 72°C cho 1 chu kỳ. Các sản phẩm PCR thu được được tách ra trên gel agarosa 1%, và các đoạn ADN tương ứng về chiều dài với các đơn vị sao chép được tinh chế bằng cách sử dụng kit chiết gel Qiaex II (Qiagen), và được lồng ghép vào vật truyền plasmit hoặc pCR Blunt II TOPO Blunt (Invitrogen). Các vùng mã hóa được gắn vào các phản ứng đầu kết thúc mạch dideoxynucleotit bằng các đoạn oligonucleotit mồi đặc hiệu, sau đó xác định trình tự trên bộ xác định trình tự MegaBACE 1000 ADN (GE Biosystems). Trên FIG.17 thể hiện trình tự gen dạng sơ đồ kéo dài các codon bắt đầu và kết thúc vùng mã hóa LOX-2. Việc so sánh các trình tự được thực hiện bằng cách sử dụng gói phần mềm phân tích trình tự Lasergene ver. 5.2 (DNASTAR), cho thấy

một đột biến điểm dưới dạng sự thay thế G→A ở vị trí 2689 của SEQ ID NO: 2 trong exon 6 (FIG.17).

Trình tự gen kiểu dại đối với LOX-2 mã hóa protein dài 864 gốc (SEQ ID NO:5), với khối lượng dự báo trước là 96,7kDa. Trong khi sự đột biến này ở vị trí 684 trong trình tự mã hóa LOX-1 của đột biến D112 do đưa codon kết thúc sớm vào, mà gen mã hóa LOX-2 của đột biến A689 cắt cụt đầu tận cùng C của 180 axit amin, vì thế mã hóa protein 76,8 kDa (SEQ ID NO:6).

Bảng 7 tóm tắt những khác biệt về phân tử liên quan đến gen LOX-2 của lúa mạch kiểu dại, đột biến D112 có null-LOX-1 (được mô tả trong WO 2005/087934), và đột biến A689 của lúa mạch (null-LOX kép).

Bảng 7. Dữ liệu phân tử về lúa mạch kiểu dại và lúa mạch đột biến.

Tính chất	Lúa mạch hoang	Đột biến D112*	Đột biến A689
Kiểu gen LOX	LOX-1 kiểu dại, LOX-2 kiểu dại	null-LOX-1, LOX-2 kiểu dại	null-LOX-1, null-LOX-2
Đột biến bazơ			
**	—	G3474→A	G3474→A
LOX-1	—	—	G2689→A
LOX-2			
Dữ liệu protein			
***	862 aa (96,4 kDa)	665 aa (74,2 kDa)	665 aa (74,2 kDa)
LOX-1			
LOX-2	864 aa (96,7 kDa)	864 aa (96,7 kDa)	684 aa (76,8 kDa)

* Dòng mẹ của đột biến A689, Ca211901, có các tính chất giống nhau.

** Số trình tự theo SEQ ID NO:1 của WO 2005/087934 đối với gen LOX-1, và đối với gen LOX-2 theo SEQ ID NO:1 của công bố sáng chế này.

*** Độ dài dự báo của protein trong các axit amin (aa), với khối lượng dự báo tương ứng, trong các dấu ngoặc.

Ví dụ 11

Phát hiện gen của lúa mạch chứa đột biến A689 có null-LOX kép

Thử nghiệm tính đa hình của một nucleotit (SNP) là phương pháp thuận tiện để nhận dạng các đột biến của thực vật. Thuật ngữ SNP ở đây có nghĩa là sự đột biến điểm với ít nhất hai nucleotit khác nhau ở một locus. Thử nghiệm này dựa trên cơ sở sử dụng kết hợp hai bộ phản ứng PCR bằng cách sử dụng ADN bộ gen làm khuôn mẫu. Cả hai phản ứng chứa đoạn mồi có locus đặc hiệu, và một trong hai đoạn mồi SNP (một cho mỗi alen của trình tự này). Hai bộ phản ứng PCR được thực hiện cho mỗi dòng thực vật, với kết quả là phản ứng PCR hoặc liên kết đoạn mồi SNP với các trình tự của đột biến này hoặc liên kết với alen kiểu dại (FIG.18A). Theo một trong số các phương pháp này, việc phân tích SNP có thể là trên cơ sở nhận dạng các dòng đột biến bằng cách đánh giá mẫu băng sau khi điện di gel các sản phẩm PCR.

ADN bộ gen của lúa mạch từ dòng nhân giống lúa mạch và từ lúa mạch kiểu dại chủng cv. Quench được phân lập ra khỏi các mô lá của cây giống non, bằng cách sử dụng kit phân lập ADN thực vật (Roche) theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Các đoạn oligonucleotit mồi được sử dụng để mở rộng SNP của gen LOX-2 kiểu dại là 5'-ACCTCAAGGACGCGGCGTGG-3' (SEQ ID NO:7) và 5'-GAGCGAGGAGTACGCGGAG-3' (SEQ ID NO:8), trong khi các đoạn này đối với đột biến gen tương ứng là 5'-ACCTCAAGGACGCGGCGTGA-3' (SEQ ID NO:9) và 5'-GAGCGAGGAGTACGCGGAG-3' (SEQ ID NO:8). Các tổ hợp đoạn mồi này được sử dụng trong các phản ứng PCR để mở rộng các đoạn ADN 200bp gồm các phần của các vùng mã hóa đối với LOX-2 lần lượt của đột biến A689 có null-LOX kép và của chủng cv. Quench (FIG.18A). Các phản ứng PCR gồm 100ng ADN bộ gen trong 20µl dung dịch đệm phản ứng chứa đoạn mồi 25pmol và 7µl hỗn hợp REDTaq (Sigma), được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các lần khuếch đại PCR 29 chu kỳ được thực hiện trong thiết bị điều

khiến chu trình MJ: 2 phút ở 96°C cho 1 chu kỳ; 1 phút ở 95°C; 1 phút ở 68°C; 1 phút ở 72°C; kết thúc bằng sự kéo dài 10 phút ở 72°C.

Sự thụ phấn chéo giữa cây lúa mạch đồng hợp tử mang đột biến LOX-1 và cây đồng hợp tử mang đột biến LOX-2 có thể dẫn đến 4 trường hợp khác nhau. Bằng cách sử dụng hai bộ đoạn mồi, một bộ đoạn mồi SNP - FL820 (SEQ ID NO:10 và FL823 (SEQ ID NO:11) - để nhận dạng đột biến gen LOX-1 (đột biến G→A ở vị trí 3474 của gen LOX-1), và một bộ đoạn mồi SNP - FL1034 (SEQ ID NO:9) và FL1039 (SEQ ID NO:8) - để nhận dạng sự đột biến gen LOX-2 [sự thể G→A ở vị trí 2689 của gen LOX-2 (SEQ ID NO:1)], có thể phải nhận dạng được một trong số bốn trường hợp đột biến chéo nêu trên (đưa ra trên FIG.18B). Nói cách khác, một phản ứng PCR tổng hợp duy nhất có thể được sử dụng để tạo ra các sản phẩm PCR đặc trưng cho cả hai sự đột biến LOX-1 và LOX-2 nêu trên. Các đoạn oligonucleotit mồi được sử dụng để mở rộng sản phẩm SNP của PCR đối với đột biến G→A ở vị trí 3474 trong gen LOX-1 là 5'-CAAGGTGCGGTTGCTGGTGTC-3' (SEQ ID NO:10) và 5'-CTCGCGCGTCTCCTTCCAT-3' (SEQ ID NO:11), tạo ra đoạn ADN 166bp chứa một phần vùng mã hóa đối với LOX-1. Các đoạn oligonucleotit mồi được sử dụng để mở rộng sản phẩm SNP của PCR để phát hiện sự đột biến G→A ở vị trí 2689 trong gen đối với LOX-2 là 5'-ACCTCAAGGACGCGGCGTGA-3' (SEQ ID NO:9) và 5'-GAGCGAGGAGTACGCGGAG-3' (SEQ ID NO:8), tạo ra đoạn AND 200bp chứa phần vùng mã hóa LOX-2. FIG.18C, làn 2, thể hiện chi tiết đột biến A689 có null-LOX kép mang cả hai sự đột biến nêu trên, trong khi cả hai đều không mang kiểu đại đối chứng (FIG.18C, làn 3).

Trong một thử nghiệm khác, bằng cách sử dụng Kit REDExtract-N-Amp Plant PCR (Sigma) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, ADN bộ gen của lúa mạch được phân lập ra khỏi các mô lá của 23 cây non giống của dòng nhân giống này, và sau đó được sử dụng trong các phản ứng PCR gồm 100ng ADN bộ gen trong 20μl dung dịch đệm phản ứng chứa đoạn mồi 25 pmol. Các đoạn mở rộng được tiến hành trong thiết bị điều khiển chu trình có động cơ (MJ Research), theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất: 2 phút ở 96°C cho 1 chu kỳ; 1 phút ở

95°C, 1 phút ở 68°C, 1 phút ở 72°C cho 29 chu kỳ; và cuối cùng là 10 phút ở 72°C cho 1 chu kỳ. FIG.19 thể hiện mẫu băng sau khi điện di các sản phẩm PCR. Phân tích này cho thấy rằng quy trình này là hữu ích để chọn tổ hợp các sự đột biến có null-LOX-1 và null-LOX-2 mong muốn.

Danh mục các trình tự

- | | |
|--------------|--|
| SEQ ID NO:1 | Trình tự ADN bộ gen kiểu đại mã hóa LOX-2 từ chủng cv. Barke. |
| SEQ ID NO:2 | Trình tự ADN bộ gen LOX-2 của đột biến từ đột biến A689 của lúa mạch. |
| SEQ ID NO:3 | Đoạn môi để khuếch đại protein mã hóa vùng đối với LOX-2 (cũng được ký hiệu là FL960). |
| SEQ ID NO:4 | Đoạn môi để khuếch đại protein mã hóa vùng ADN bộ gen LOX-2 (cũng được ký hiệu là FL961). |
| SEQ ID NO:5 | Trình tự protein LOX-2 có độ dài đầy đủ của lúa mạch kiểu đại, chủng cv. Barke. |
| SEQ ID NO:6 | Trình tự protein LOX-2 của đột biến không có hoạt tính LOX-2 từ đột biến A689 của lúa mạch. |
| SEQ ID NO:7 | Đoạn môi để khuếch đại ADN của LOX-2 kiểu đại (cũng được ký hiệu là FL1035). |
| SEQ ID NO:8 | Đoạn môi để khuếch đại ADN của LOX-2 (cũng được ký hiệu là FL1039). |
| SEQ ID NO:9 | Đoạn môi để khuếch đại ADN của LOX-2 đột biến của đột biến A689 (cũng được ký hiệu là FL1034). |
| SEQ ID NO:10 | Đoạn môi để khuếch đại ADN của LOX-1 đột biến của đột biến D112 (cũng được ký hiệu là FL820). |
| SEQ ID NO:11 | Đoạn môi để khuếch đại ADN của LOX-1 (cũng được ký hiệu là FL823). |

Tài liệu tham khảo được trích dẫn

Các tài liệu sáng chế

Patent Mỹ số 4.683.195 của Mullis, K.B. và các đồng tác giả.

Patent Mỹ số 4.800.159 của Mullis, K.B. và các đồng tác giả.

Công bố đơn sáng chế PCT số WO 02/053721 của Douma, A.C. và các đồng tác giả.

Công bố đơn sáng chế PCT số WO 2005/087934 của Breddam, K. và các đồng tác giả.

Patent Châu Âu số EP 1609866 của Hirota, N. và các đồng tác giả.

Các ấn phẩm khác

American Association of Cereal Chemists, "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists." ISBN 0-913250-86-4 (1995).

American Society of Brewing Chemists, "Methods of analysis of the American Society of Brewing Chemists." ISBN 1-881696-01-4 (1992).

Baur, C. and Grosch. W., "Investigation about the taste of di-, tri- and tetrahydroxy fatty acids." Z. Lebensm. Unters. Forsch. 165: 82-84 (1977).

Baur, C. et al., "Enzymatic oxidation of linoleic acid: Formation of bitter tasting fatty acids." Z. Lebensm. Unters. Forsch. 164:171-176 (1977).

Briggs, D.E. et al., "Malting and brewing science. Volume I Malt and sweet wort." Chapman and Hall. New York. USA. ISBN 0412165805 (1981).

Drost, B.W. et al., "Role of individual compounds in beer staling." Tech. Q. MBAA 11:127-134 (1974).

Durai, S. et al., "Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells." Nucleic Acids Res. 33:5978-5990 (2005).

European Brewery Convention. "Analytica – EBC." ISBN 3-418-00759-7 (1998).

Groenqvist, A. et al., "Carbonyl compounds during beer production in beer." Proceedings of the 24th EBC Congress, Oslo, pp. 421-428 (1993).

- Hamberg, M., "Trihydroxyoctadecenoic acids in beer: Qualitative and quantitative analysis." *J. Agric. Food Chem.* 39:1568-1572 (1991).
- Hansen, M. et al., "Antisense-mediated suppression of C-hordein biosynthesis in the barley grain results in correlated changes in the transcriptome, protein profile, and amino acid composition." *J. Exp. Bot.* 58:3987-3995 (2007).
- Hough, J.S. et al., "Malting and brewing science. Volume II Hopped wort and beer." Chapman and Hall, New York, USA. ISBN 0412165902 (1982).
- Iida, S. and Terada, R., "Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants." *Plant Mol. Biol.* 59:205-219 (2005).
- Institute of Brewing, "Institute of Brewing. Methods of analysis." ISBN 0-900489-10-3 (1997).
- Jamieson, A.M. and van Gheluwe, J.E.A., "Identification of a compound responsible for cardboard flavor in beer." *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* 29:192-197 (1970).
- Kleinhofs, A. et al., "Induction and selection of specific gene mutations in *Hordeum* and *Pisum*." *Mut. Res.* 51:29-35 (1978).
- Kumar, S. et al., "Gene targeting in plants: fingers on the move." *Trends Plant Sci.* 11:159-161 (2006).
- Kuroda, H. et al., "Characterization of factors involved in the production of 2(E)-nonenal during mashing." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:691-697 (2003).
- Kuroda, H. et al., "Characterization of 9-fatty acid hydroperoxide lyase-like activity in germinating barley seeds that transforms 9(S)-hydroperoxy-10(E).12(Z)-octadecadienoic acid into 2(E)-nonenal." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:1661-1668 (2005).
- Lermusieau, G. et al., "Nonoxidative mechanism for development of trans-2-nonenal in beer." *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57:29-33 (1999).

- Liégeois, C. et al., "Release of deuterated (E)-2-nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized before boiling." *J. Agric. Food Chem.* 50:7634-7638 (2002).
- Maquat, L.E. and Carmichael, G.G., "Quality control of mRNA function." *Cell* 104:173-176 (2001).
- Meilgaard, M.C., "Flavor chemistry of beer: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles." *Tech. Q. MBAA* 12:151-167 (1975).
- Mendell, J.T. and Dietz, H.C., "When the message goes awry: Disease-producing mutations that influence mRNA content and performance." *Cell* 107:411-414 (2002).
- Nevo, E., "Resources for Breeding of Wild Barley." In: "Barley: Genetics. Biochemistry. Molecular Biology and Biotechnology." Shewry, P.R., ed., pp. 3-18. C.A.B. International. ISBN 0-85198-725-7 (1992).
- Noordermeer, M.A. et al., "Fatty acid hydroperoxide lyase: A plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance." *ChemBioChem* 2:494-504 (2001).
- Nyborg, M. et al., "Investigations of the protective mechanism of sulfite against beer staling and formation of adducts with trans-2-nonenal." *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57:24-28 (1999).
- Rasmussen, S.K. and Hatzack, F., "Identification of two low-phytate barley (*Hordeum vulgare* L.) grain mutants by TLC and genetic analysis." *Hereditas* 129:107-112 (1998).
- Robbins, M.P. et al., "Gene manipulation of condensed tannins in higher plants." *Plant Physiol.* 116:1133-1144 (1998).
- Sambrook, J. and Russell, D.W., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3rd Ed.", Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. ISBN 0-87969-577-3 (2001).
- Schmitt, N.F. and van Mechelen, J.R., "Expression of lipoxygenase isoenzymes in developing barley grains." *Plant Sci.* 128:141-150 (1997).

- Stahl, Y. et al., "Antisense downregulation of the barley limit dextrinase inhibitor modulates starch granule sizes distribution. starch composition and amylopectin structure". *Plant J.* 39:599-611 (2004).
- Tzfira, T. and White. C., "Towards targeted mutagenesis and gene replacement in plants." *Trends Biotechnol.* 23:567-569 (2005).
- von Bothmer, R. et al., "Diversity in barley (*Hordeum vulgare*)." In: "Diversity in Barley (*Hordeum vulgare*)." von Bothmer, R., van Hintum, T., Knüpfper, H., Sato. K., eds., pp. 129-136. ISBN 0-444-50587-7 (2003). Also available at <http://www.genres.de/>.
- Wackerbauer, K. and Meyna, S., "Freie und triglyceride-gebundene Hydroxyfettsäuren in Gerste und Malz", *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, heft 3/4: 52-57 (2002).
- Wu, J. et al., "Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) silences the accumulation of aberrant trypsin proteinase inhibitor mRNA in *Nicotiana attenuata*." *Plant J.* 51:693-706 (2007).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Đồ uống được tạo ra từ cây lúa mạch, hoặc bộ phận của nó, trong đó đồ uống này chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 50% so với T2N tiềm năng trong đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ cây lúa mạch chủng cv. Power, và trong đó cây lúa mạch này, hoặc bộ phận của nó, chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng lipoxygenaza (LOX)-1, và chứa đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2, trong đó T2N tiềm năng là nồng độ của T2N được giải phóng vào dung dịch trong khi ủ trong thời gian 2 giờ ở 100°C, độ pH là 4,0, và trong đó T2N là trans-2-nonenal.
2. Đồ uống theo điểm 1, trong đó đồ uống này là đồ uống từ mạch nha.
3. Đồ uống theo điểm 1, trong đó đồ uống này là bia.
4. Đồ uống theo điểm 1, trong đó đồ uống này là bia từ lúa mạch.
5. Đồ uống theo điểm 1, trong đó đồ uống này chứa T2N tự do với lượng nhỏ hơn 50% so với đồ uống tạo ra theo cách tương tự từ cây lúa mạch chủng cv. Power, sau khi bảo quản 8 tuần ở 37°C.
6. Tế bào của cây lúa mạch, trong đó tế bào của cây lúa mạch này không phải là vật liệu sinh sản và chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2.
7. Tế bào của cây lúa mạch theo điểm 6, trong đó gen mã hóa LOX-1 của cây này chứa codon kết thúc sớm.
8. Tế bào của cây lúa mạch theo điểm 7, trong đó gen mã hóa LOX-1 của cây này chứa codon vô nghĩa, codon này tương ứng với bazơ số 3572–3574 của SEQ ID NO:1 theo WO 2005/087934.
9. Tế bào của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 8, trong đó gen mã hóa LOX-2 của cây này chứa codon kết thúc sớm.
10. Tế bào của cây lúa mạch theo điểm 9, trong đó gen mã hóa LOX-2 của cây này chứa đột biến tại vị trí nucleotit 2689 của SEQ ID NO:1, dẫn đến sự tạo ra codon kết thúc.

11. Bộ phận của cây lúa mạch, trong đó bộ phận của cây lúa mạch này không phải là vật liệu sinh sản và chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-1, và đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng LOX-2.

12. Bộ phận của cây lúa mạch theo điểm 11, trong đó gen mã hóa LOX-1 của cây này chứa codon kết thúc sớm.

13. Bộ phận của cây lúa mạch theo điểm 12, trong đó gen mã hóa LOX-1 của cây này chứa codon vô nghĩa, codon này tương ứng với bazơ số 3572–3574 của SEQ ID NO:1 theo WO 2005/087934.

14. Bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13, trong đó gen mã hóa LOX-2 của cây này chứa codon kết thúc sớm.

15. Bộ phận của cây lúa mạch theo điểm 14, trong đó gen mã hóa LOX-2 của cây này chứa đột biến tại vị trí nucleotit 2689 của SEQ ID NO:1, dẫn đến sự tạo ra codon kết thúc.

16. Bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 15, trong đó bộ phận của cây lúa mạch này là (các) hạt.

17. Đồ uống theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó đồ uống này được tạo ra từ tế bào của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10 hoặc bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 16.

18. Sản phẩm thực vật chứa tế bào của cây lúa mạch đã được xử lý, hoặc bộ phận của cây lúa mạch này, trong đó tế bào của cây lúa mạch này là tế bào của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10 hoặc bộ phận của cây lúa mạch là bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 16.

19. Sản phẩm thực vật theo điểm 18, trong đó sản phẩm thực vật này là chế phẩm mạch nha chứa tế bào của cây lúa mạch đã được xử lý, hoặc bộ phận của cây lúa mạch này, trong đó tế bào của cây lúa mạch này là tế bào của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10 hoặc bộ phận của cây lúa

mạch là bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 16.

20. Sản phẩm thực vật theo điểm 18, trong đó sản phẩm thực vật này là chế phẩm ủ men được tạo ra bằng cách sử dụng tế bào của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10 hoặc bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 16, hoặc bằng cách sử dụng chế phẩm mạch nha được tạo ra từ tế bào của cây lúa mạch này, hoặc bộ phận của cây lúa mạch này, hoặc các hỗn hợp của chúng.

21. Sản phẩm thực vật theo điểm 20, trong đó sản phẩm thực vật là chế phẩm ủ men và chế phẩm ủ men nêu trên là chế phẩm ủ men từ lúa mạch.

22. Đồ uống theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó đồ uống nêu trên được tạo ra từ sản phẩm thực vật theo 19, hoặc sản phẩm thực vật theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 20 đến 21.

23. Sản phẩm thực vật theo điểm 18, trong đó sản phẩm thực vật này được chọn từ nhóm bao gồm xiro lúa mạch, xiro mạch nha, dịch chiết từ lúa mạch, và dịch chiết từ mạch nha.

24. Phương pháp sản xuất đồ uống chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 50%, so với lượng T2N tiềm năng trong đồ uống được tạo ra theo cách tương tự từ cây lúa mạch chủng cv. Power, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) tạo ra chế phẩm chứa tế bào của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 6 đến 10 hoặc bộ phận của cây lúa mạch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 16; và

(ii) xử lý chế phẩm thu được từ bước (i) thành đồ uống;

nhờ đó sản xuất được đồ uống, trong đó T2N tiềm năng là nồng độ của T2N được giải phóng vào dung dịch trong khi ủ trong thời gian 2 giờ ở 100°C, độ pH là 4,0 và trong đó T2N là trans-2-nonenal.

25. Phương pháp sản xuất chế phẩm mạch nha chứa T2N tiềm năng với lượng nhỏ hơn 50% so với lượng T2N tiềm năng trong chế phẩm mạch nha được tạo ra theo cách tương tự từ cây lúa mạch chủng cv. Power, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) tạo ra các hạt theo điểm 16 của cây lúa mạch, trong đó cây lúa mạch chứa đột biến thứ nhất dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng lipoxygenaza (LOX)-1, và chứa đột biến thứ hai dẫn đến việc làm mất hoàn toàn enzym chức năng lipoxygenaza LOX-2;

(ii) ngâm các hạt nêu trên;

(iii) cho các hạt đã ngâm nảy mầm trong điều kiện xác định trước;

(iv) xử lý bằng nhiệt các hạt nảy mầm;

nhờ đó sản xuất ra chế phẩm mạch nha,

trong đó T2N tiềm năng là nồng độ của T2N được giải phóng vào dung dịch trong khi ủ trong thời gian 2 giờ ở 100°C, độ pH là 4,0 và trong đó T2N là trans-2-nonenal.

26. Phương pháp theo điểm 25, trong đó mức T2N tự do với lượng tối đa là 50% T2N so với T2N tự do trong chế phẩm mạch nha được tạo ra theo cách tương tự từ đột biến của lúa mạch D112 có số hiệu nộp lưu ATCC số PTA-5487.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Carlsberg Breweries A/S
Heineken Supply Chain B.V.

<120> Đồ uống được tạo ra từ cây lúa mạch có hoạt tính lipoxxygenaza giảm, tế bào của cây lúa mạch, bộ phận của cây lúa mạch, sản phẩm thực vật chứa tế bào của cây lúa mạch, phương pháp sản xuất đồ uống và phương pháp sản xuất chế phẩm mạch nha

<130> P1599PC00

<160> 11

<170> PatentIn phiên bản 3.4

<210> 1

<211> 3229

<212> ADN

<213> Hordeum vulgare cv: Barke

<400> 1

```

atgtttggcg tcggcggcac cgtgagcgac ctgacggggg gcctccgggg cgcccacctc      60
aagggctccg tcgtcctcat gcgcaagaac gcgctcgact tcaacgactt cggcgccacc      120
gtcatggacg gcgtcaccga gtcctcggc cgcggcgtca cctgccagct catcagctcc      180
accaacgtcg accacagtga gcactcactc gccactcccc gttttgtaat ccctgccact      240
gtgatacatg gaaaacggaa gcagatccgc atcctcacgc ccgaaccaag caaataatat      300
atataaagaa ctaaaatgca cgtatggtta cggatgcatg cttatgcttg agcttgagct      360
tgagcttgag agacagggac gtgcaaaaaa taacttaata atggagtaac taatgtgaga      420
catgacgcac ggaggggttt accttactac taattaattg tcgagcagac aacggtgggc      480
gcgggaaggt gggcgcgag gcgaacctgg agcagtggct cctgccgacg aacctgccgt      540
tcatcaccac cggcgagaac aagttcgccg tcaccttcga ctggtcggtg gacaagctgg      600
gggtgccggg ggccatcatc gtcaagaaca accacgcctc cgagttcttc ctcaagacca      660
tcacctcga caacgtgccc ggccgcgga ccatcgtctt cgtcgccaac tcatgggtct      720
acccgcaggc caagtaccgc tacaaccgag tcttcttcgc caacgacgtg agtatatttat      780
acgagtacca ctccatggta gctagtacga tggatttcgc ttgctcgatg cctgactggg      840
cggttccggt gggacatacg tgccgcagac gtacctgccg caccagatgc cggcggcgct      900
gaagccgtac cgcgacgacg agctccggaa cctgaggggc gacgaccagc aggggcccta      960
cctggaccac gaccggtct accgctacga cgtctacaac gacctcggcg actcccgcga      1020
cgtcctcggc ggctccaagg acctccccta cccgcgccgc tgccgcaccg gccggaagcc      1080
ctcggacagc agtgcggtg tcctcccttc tccttccttt cgatctcccc ataacgtgta      1140
cttgggtctga caagcatgtg tggccgacgc agagcccgac cagagagacc ggctgctgcc      1200
gctggtgcag aacgtctacg tgccgcgcga cgagctcttc ggccacctca agcagtcgga      1260
cttctggggc tacacgtca aggcgctggg ggacgggatc ataccggcca tccgcacctc      1320
cgtcgacctc tccccggcg agttcgactc cttcgccgac atcctcaagc tctacgaggg      1380
cggcatcaag ctgcccaaca tcccgccctt cgaggagggt cgcaagcgct tccgctcca      1440
gctcgtcaag gacctcatcc ccaagggcgg cgacttcctc ctcaagctcc ccaagccgga      1500

```

gatcatcaag gtagaccaga aagcgtggat gactgacgag gagttcgcca gggagatgct 1560
cgccggcgctc aaccccatga tgatcaaacg cctcaccgtg agtgaccacac tccatctacc 1620
ggccattgaa caaaatcgctc catacatgtc actaatcaat actcacaccg ttttgaccgc 1680
gtgtgcagga gttccctccc aagagcactc tggatccgag caagtacggc gaccacacca 1740
gcaccatgac cgaggagcac gtggccaaga gcctggaggg cctcaccgtg cagcaggcgc 1800
tcgccggcaa caggctctac atcgtagacc agcacgacaa cctgatgccg ttcctgatcg 1860
acatcaacaa cctcgacgcc agcttcgtgt acgccacaag gacgctgctc ttcctgagag 1920
gggacggcac gctggcgccg gtcgccatcg agctgagctc gccgctgatc caggggcagc 1980
tgaccaccgc caagagcgcc gtgtacacgc cgcagcacgc cggcgtggag ggctggatat 2040
ggcagctcgc caaggcctac gcctccgtga acgactacgg gtggcaccag ctcacagcc 2100
actggctcaa cacgcacgcc gtcattgagc ccttcgtcat cgccaccaac aggcagctca 2160
gcgtcaccca cccggctctac aagctcctgc accgcacta ccgcgacacc atgaacatca 2220
acgcgcgggc gcgcgggctg ctcacaaacg ccggcggcgt catcgagatg accgtgttcc 2280
cgcacaagca cgccatgccc atgtcctcca tggctctaca gactggaac ttcaccgaac 2340
aagctctccc cgccgatcta atcaagaggt gcaacatgtt tacattatat aattgacgaa 2400
acggctcctg atttgatcaa aatgattaat cgatcttgat ggttgatgat gatgtagggg 2460
catggcggtg gaggacgcat cgagcccga caaggtgcgg ctgctgatca aggactaccc 2520
gtacgcgacc gacgggctgg ccgtgtggga cgccatcgag cagtgggtgt cggactacct 2580
gaccatctac taccccaacg acggcgtgct gcagggcgac gtggagctgc aggcgtgggtg 2640
gaaggaggtg agggaggtcg ggcacggcga cctcaaggac gcggcgtggt ggccaaagat 2700
gcagacgggtg gcggagctga tcaaggcgtg cgccaccatc atctggaccg ggtcggcgct 2760
ccacgcggcc gtcaacttcg ggcagtaccc ctactcgggc taccaccca acaagccgtc 2820
ggcgagccgg aggccgatgc cgggtgcagg gagcaggag tacgcggagc tggagcgaga 2880
cccggagaag gccttcaccc gcaccatcac cagccagttc catgccctgg tgggcatctc 2940
gctcatggag atcctctcca agcactcctc cgacgaggtc tacctgggccc agcacgacac 3000
gccggcgtgg acgtcggacg ccaaggcgct ggaggcgctt aagcggttcg gggcgaagct 3060
ggagggcatc gagaagcagg tgggtggccat gaactcggac ccgcagctaa agaaccgcac 3120
cgggccggcc aagttcccat acatgctgct ctacccaac acctccgacc acacgggaca 3180
ggccgagggg ctcaccgcca ggggcatccc gaacagcata tccatctga 3229

<210> 2

<211> 3229

<212> ADN

<213> Hordeum vulgare đột biến A689

<400> 2

atgtttggcg tcggcgccat cgtgagcgac ctgacggggg gcctccgggg cgccacctc 60

aagggctccg tcgtcctcat gcgcaagaac gcgctcgact tcaacgactt cggcgccacc 120

gtcatggacg gcgtcaccga gtcctcggc cgcggcgctc cctgccagct catcagctcc 180

accaacgtcg	accacagtga	gcactcactc	gccactcccc	gttttgtaat	ccctgccact	240
gtgatacatg	gaaaacggaa	gcagatccgc	atcctcacgc	ccgaaccaag	caaataatat	300
atataaagaa	ctaaaatgca	cgtatggtta	cggatgcatg	cttatgcttg	agcttgagct	360
tgagcttgag	agacagggac	gtgcaaaaaa	taacttaata	atggagtaac	taatgtgaga	420
catgacgcac	ggagggggtt	accttactac	taattaattg	tcgagcagac	aacgggtgggc	480
gcgggaaggt	gggcgcggag	gcgaacctgg	agcagtggct	cctgccgacg	aacctgccgt	540
tcataccac	cggcgagaac	aagttcgccg	tcaccttcga	ctggtcggtg	gacaagctgg	600
gggtgccggg	ggccatcatc	gtcaagaaca	accacgcctc	cgagttcttc	ctcaagacca	660
tcaccctcga	caacgtgccc	ggccgcggca	ccatcgctct	cgtcgccaac	tcattgggtct	720
acccgcaggc	caagtaccgc	tacaaccgcg	tcttcttcgc	caacgacgtg	agtattttat	780
acgagtacca	ctccatggta	gctagtacga	tggatttcgc	ttgctcgatg	cctgactggg	840
cggttccgtt	gggacatacg	tgccgcagac	gtacctgccc	caccagatgc	cggcggcgct	900
gaagccgtac	cgcgacgacg	agctccggaa	cctgaggggg	gacgaccagc	agggggcccta	960
cctggaccac	gaccgcgtct	accgctacga	cgtctacaac	gacctcggcg	actcccgcga	1020
cgtcctcggc	ggctccaagg	acctccccta	cccgcgccgc	tgccgcaccg	gccggaagcc	1080
ctcggacagc	agtgcgtgtc	tcctcccttc	tccttccttt	cgatctcccc	ataacgtgta	1140
cttggcttga	caagcatgtg	tggccgacgc	agagcccagc	cacgagagcc	ggctgctgcc	1200
gctggtgcag	aacgtctacg	tgccgcgcga	cgagctcttc	ggccacctca	agcagtcgga	1260
cttcctgggc	tacacgttca	aggcgttggt	ggacgggata	ataccggcca	tccgcacctta	1320
cgtcgacctc	tcccccggcg	agttcgactc	cttcgccgac	atcctcaagc	tctacgaggg	1380
cggcatcaag	ctgcccaca	tcccgccct	cgaggagggtg	cgcaagcgct	tcccgtcca	1440
gctcgtcaag	gacctcatcc	ccaagggcgg	cgacttcctc	ctcaagctcc	ccaagccgga	1500
gatcatcaag	gtagaccaga	aagcgtggat	gactgacgag	gagttcgcca	gggagatgct	1560
cgcggcgctc	aaccccatga	tgatcaaacg	cctcaccgtg	agtgaccac	tccatctacc	1620
ggccattgaa	caaaatcgtc	catacatgtc	actaatcaat	actcacaccg	ttttgaccgc	1680
gtgtgcagga	gttccctccc	aagagcactc	tggatccgag	caagtacggc	gaccacacca	1740
gcaccatgac	cgaggagcac	gtggccaaga	gcctggaggg	cctcaccgtg	cagcaggcgc	1800
tcgccggcaa	caggctctac	atcgtagacc	agcacgacaa	cctgatgccg	ttcctgatcg	1860
acatcaacaa	cctcgacgcc	agcttcgtgt	acgccacaag	gacgctgctc	ttcctgcgag	1920
gggacggcac	gctggcgccg	gtcgccatcg	agctgagctc	gccgctgata	cagggcgagc	1980
tgaccaccgc	caagagcgcc	gtgtacacgc	cgcagcacgc	cggcgtggag	ggctggatat	2040
ggcagctcgc	caaggcctac	gcctccgtga	acgactacgg	gtggcaccag	ctcatcagcc	2100
actgggtcaa	cacgcacgcc	gtcatggagc	ccttcgtcat	cgccaccaac	aggcagctca	2160
gcgtcaccca	cccgggtctac	aagctcctgc	acccgcacta	ccgcgacacc	atgaacatca	2220
acgcgcgggc	gcgcgggctg	ctcatcaacg	ccggcggcgt	catcgagatg	accgtgttcc	2280

cgcacaagca cgccatgccc atgtcctcca tgggtctacaa gcactggaac ttcaccgaac 2340
 aagctctccc cgccgatcta atcaagaggt gcaacatggt tacattatat aattgacgaa 2400
 acgggtccttg atttgatcaa aatgattaat cgatcttgat gggtgatgat gatgtagggg 2460
 catggcggtg gaggacgcat cgagcccga caaggtgctg ctgctgatca aggactaccc 2520
 gtacgcgacc gacgggctgg ccgtgtggga cgccatcgag cagtgggtgt cggactacct 2580
 gaccatctac taccccaacg acggcgtgct gcagggcgac gtggagctgc aggcgtggtg 2640
 gaaggaggtg agggaggtcg ggcacggcga cctcaaggac gcggcgtgat ggccaaagat 2700
 gcagacggtg gcggagctga tcaaggcgtg cgccaccatc atctggaccg ggtcggcgct 2760
 ccacgcggcc gtcaacttcg ggcagtaccc ctactcgggc taccaccca acaagccgtc 2820
 ggcgagccgg aggccgatgc cgggtgcaggg gagcgaggag tacgcggagc tggagcgaga 2880
 cccggagaag gccttcatcc gcaccatcac cagccagttc catgccctgg tgggcatctc 2940
 gctcatggag atcctctcca agcactcctc cgacgaggtc tacctgggccc agcacgacac 3000
 gccggcgtg acgtcggacg ccaaggcgtt ggaggcgttc aagcggttcg gggcgaagct 3060
 ggagggcatc gagaagcagg tggtagccat gaactcggac ccgcagctaa agaaccgcac 3120
 cgggcccggcc aagttcccat acatgctgct ctacccaaac acctccgacc acacgggaca 3180
 ggccgagggg ctcaccgcca ggggcatccc gaacagcata tccatctga 3229

<210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi khuếch đại Hordeum vulgare LOX-2 gADN

<400> 3
 cgcagcgagc taacttagaa gcgtgccaca 30

<210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi khuếch đại Hordeum vulgare LOX-2 gADN

<400> 4
 cctcatgcct ttgtgctatc cttgcttgct 30

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

<400> 5

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

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

Asp Phe Asn Asp Phe Gly Ala His Val Met Asp Gly Val Thr Glu Leu
 35 40 45
 Leu Gly Arg Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Asn Val Asp
 50 55 60
 His Asn Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Asn Leu Glu
 65 70 75 80
 Gln Trp Leu Leu Pro Thr Asn Leu Pro Phe Ile Thr Thr Gly Glu Asn
 85 90 95
 Lys Phe Ala Val Thr Phe Asp Trp Ser Val Asp Lys Leu Gly Val Pro
 100 105 110
 Gly Ala Ile Ile Val Lys Asn Asn His Ala Ser Glu Phe Phe Leu Lys
 115 120 125
 Thr Ile Thr Leu Asp Asn Val Pro Gly Arg Gly Thr Ile Val Phe Val
 130 135 140
 Ala Asn Ser Trp Val Tyr Pro Gln Ala Lys Tyr Arg Tyr Asn Arg Val
 145 150 155 160
 Phe Phe Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro His Gln Met Pro Ala Ala Leu
 165 170 175
 Lys Pro Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln
 180 185 190
 Gln Gly Pro Tyr Leu Asp His Asp Arg Val Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr
 195 200 205
 Asn Asp Leu Gly Asp Ser Arg Asp Val Leu Gly Gly Ser Lys Asp Leu
 210 215 220
 Pro Tyr Pro Arg Arg Cys Arg Thr Gly Arg Lys Pro Ser Asp Ser Lys
 225 230 235 240
 Pro Asp His Glu Ser Arg Leu Leu Leu Leu Val Gln Asn Val Tyr Val
 245 250 255
 Leu Arg Asp Glu Leu Phe Gly His Leu Lys Gln Ser Asp Leu Leu Gly
 260 265 270
 Tyr Thr Leu Lys Gly Trp Leu Asp Gly Ile Ile Leu Ala Ile Arg Thr
 275 280 285
 Tyr Val Asp Leu Ser Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Ala Asp Ile Leu
 290 295 300
 Lys Leu Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Asn Ile Pro Ala Leu Glu

305					310						315				320
Glu	Val	Arg	Lys	Arg	Phe	Pro	Leu	Gln	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Ile	Pro
				325					330					335	
Lys	Gly	Gly	Asp	Phe	Leu	Leu	Lys	Leu	Pro	Lys	Pro	Glu	Ile	Ile	Lys
			340					345					350		
Val	Asp	Gln	Lys	Ala	Trp	Met	Thr	Asp	Glu	Glu	Phe	Ala	Arg	Glu	Met
		355					360					365			
Leu	Ala	Gly	Val	Asn	Pro	Met	Met	Ile	Lys	Arg	Leu	Thr	Glu	Phe	Pro
	370					375					380				
Pro	Lys	Ser	Thr	Leu	Asp	Pro	Ser	Lys	Tyr	Gly	Asp	His	Thr	Ser	Thr
385					390					395					400
Met	Thr	Glu	Glu	His	Val	Ala	Lys	Ser	Leu	Glu	Gly	Leu	Thr	Val	Gln
				405					410					415	
Gln	Ala	Leu	Ala	Gly	Asn	Arg	Leu	Tyr	Ile	Val	Asp	Gln	His	Asp	Asn
			420					425					430		
Leu	Met	Pro	Phe	Leu	Ile	Asp	Ile	Asn	Asn	Leu	Asp	Ala	Ser	Phe	Val
		435					440					445			
Tyr	Ala	Thr	Arg	Thr	Leu	Leu	Phe	Leu	Arg	Gly	Asp	Gly	Thr	Leu	Ala
	450					455					460				
Pro	Val	Ala	Ile	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Leu	Ile	Gln	Gly	Glu	Leu	Thr
465					470					475					480
Thr	Ala	Lys	Ser	Ala	Val	Tyr	Thr	Pro	Gln	His	Ala	Gly	Val	Glu	Gly
				485					490					495	
Trp	Ile	Trp	Gln	Leu	Ala	Lys	Ala	Tyr	Ala	Ser	Val	Asn	Asp	Tyr	Gly
			500					505					510		
Trp	His	Gln	Leu	Ile	Ser	His	Trp	Leu	Asn	Thr	His	Ala	Val	Met	Glu
		515					520					525			
Pro	Phe	Val	Ile	Ala	Thr	Asn	Arg	Gln	Leu	Ser	Val	Thr	His	Pro	Val
	530					535					540				
Tyr	Lys	Leu	Leu	His	Pro	His	Tyr	Arg	Asp	Thr	Met	Asn	Ile	Asn	Ala
545					550					555					560
Arg	Ala	Arg	Gly	Leu	Leu	Ile	Asn	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Glu	Met	Thr
				565					570					575	
Val	Phe	Pro	His	Lys	His	Ala	Met	Pro	Met	Ser	Ser	Met	Val	Tyr	Lys
			580					585					590		

His Trp Asn Phe Thr Glu Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg
 595 600 605
 Gly Met Ala Val Glu Asp Ala Ser Ser Pro His Lys Val Arg Leu Leu
 610 615 620
 Ile Lys Asp Tyr Pro Tyr Ala Thr Asp Gly Leu Ala Val Trp Asp Ala
 625 630 635 640
 Ile Glu Gln Trp Val Ser Asp Tyr Leu Thr Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp
 645 650 655
 Gly Val Leu Gln Gly Asp Val Glu Leu Gln Ala Trp Trp Lys Glu Val
 660 665 670
 Arg Glu Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Ala Trp Trp Pro Lys
 675 680 685
 Met Gln Thr Val Ala Glu Leu Ile Lys Ala Cys Ala Thr Ile Ile Trp
 690 695 700
 Thr Gly Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr
 705 710 715 720
 Ser Gly Tyr His Pro Asn Lys Pro Ser Ala Ser Arg Arg Pro Met Pro
 725 730 735
 Val Gln Gly Ser Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Lys
 740 745 750
 Ala Phe Ile Arg Thr Ile Thr Ser Gln Phe His Ala Leu Val Gly Ile
 755 760 765
 Ser Leu Met Glu Ile Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Val Tyr Leu
 770 775 780
 Gly Gln His Asp Thr Pro Ala Trp Thr Ser Asp Ala Lys Ala Leu Glu
 785 790 795 800
 Ala Phe Lys Arg Phe Gly Ala Lys Leu Glu Gly Ile Glu Lys Gln Val
 805 810 815
 Val Ala Met Asn Ser Asp Pro Gln Leu Lys Asn Arg Thr Gly Pro Ala
 820 825 830
 Lys Phe Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Thr Gly
 835 840 845
 Gln Ala Glu Gly Leu Thr Ala Arg Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile
 850 855 860
 <210> 6
 <211> 684
 <212> PRT

<213> Hordeum vulgare đột biến A689

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Leu Lys Gly Trp Leu Asp Gly Ile Ile Leu Ala Ile Arg Thr
 275 280 285
 Tyr Val Asp Leu Ser Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Ala Asp Ile Leu
 290 300
 Lys Leu Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Asn Ile Pro Ala Leu Glu
 305 310 315 320
 Glu Val Arg Lys Arg Phe Pro Leu Gln Leu Val Lys Asp Leu Ile Pro
 325 330 335
 Lys Gly Gly Asp Phe Leu Leu Lys Leu Pro Lys Pro Glu Ile Ile Lys
 340 345 350
 Val Asp Gln Lys Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met
 355 360 365
 Leu Ala Gly Val Asn Pro Met Met Ile Lys Arg Leu Thr Glu Phe Pro
 370 375 380
 Pro Lys Ser Thr Leu Asp Pro Ser Lys Tyr Gly Asp His Thr Ser Thr
 385 390 395 400
 Met Thr Glu Glu His Val Ala Lys Ser Leu Glu Gly Leu Thr Val Gln
 405 410 415
 Gln Ala Leu Ala Gly Asn Arg Leu Tyr Ile Val Asp Gln His Asp Asn
 420 425 430
 Leu Met Pro Phe Leu Ile Asp Ile Asn Asn Leu Asp Ala Ser Phe Val
 435 440 445
 Tyr Ala Thr Arg Thr Leu Leu Phe Leu Arg Gly Asp Gly Thr Leu Ala
 450 455 460
 Pro Val Ala Ile Glu Leu Ser Ser Pro Leu Ile Gln Gly Glu Leu Thr
 465 470 475 480
 Thr Ala Lys Ser Ala Val Tyr Thr Pro Gln His Ala Gly Val Glu Gly
 485 490 495
 Trp Ile Trp Gln Leu Ala Lys Ala Tyr Ala Ser Val Asn Asp Tyr Gly
 500 505 510
 Trp His Gln Leu Ile Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu
 515 520 525
 Pro Phe Val Ile Ala Thr Asn Arg Gln Leu Ser Val Thr His Pro Val
 530 535 540
 Tyr Lys Leu Leu His Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Ala
 545 550 555 560

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn môi khuếch đại Hordeum vulgare LOX-2 gADN

<400> 7
acctcaagga cgcggcgtgg

20

<210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn môi khuếch đại Hordeum vulgare LOX-2 gADN

<400> 8
gagcgaggag tacgcggag

19

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn môi khuếch đại Hordeum vulgare đột biến A689 LOX-2
gDNA

<400> 9
acctcaagga cgcggcgtga

20

<210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi khuếch đại Hordeum vulgare đột biến D112 LOX-1
 gADN

<400> 10
 caaggtgcgg ttgctggtgt c

21

<210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi khuếch đại Hordeum vulgare LOX-1 gADN

<400> 11
 ctcgcgcgtc tccttccat

19

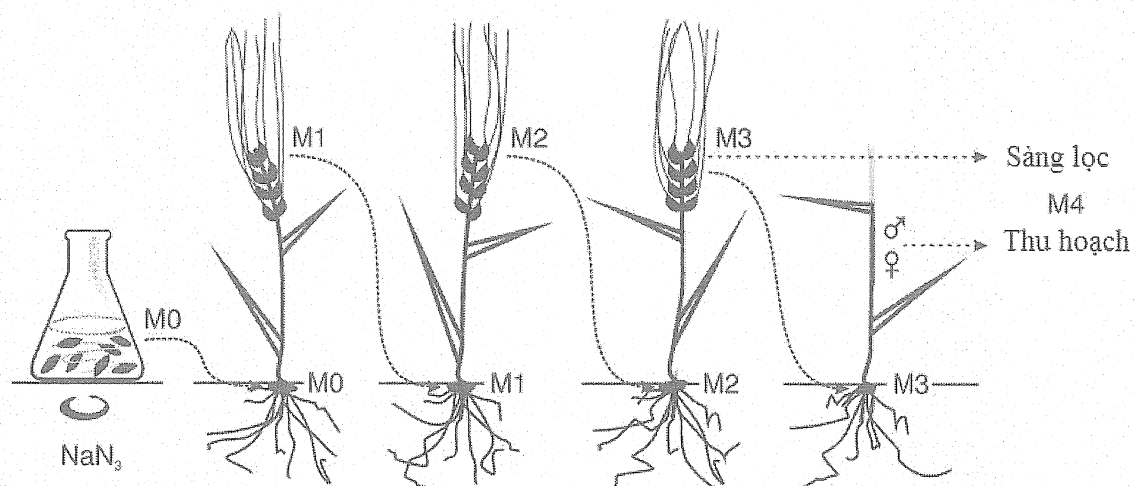


FIG. 1

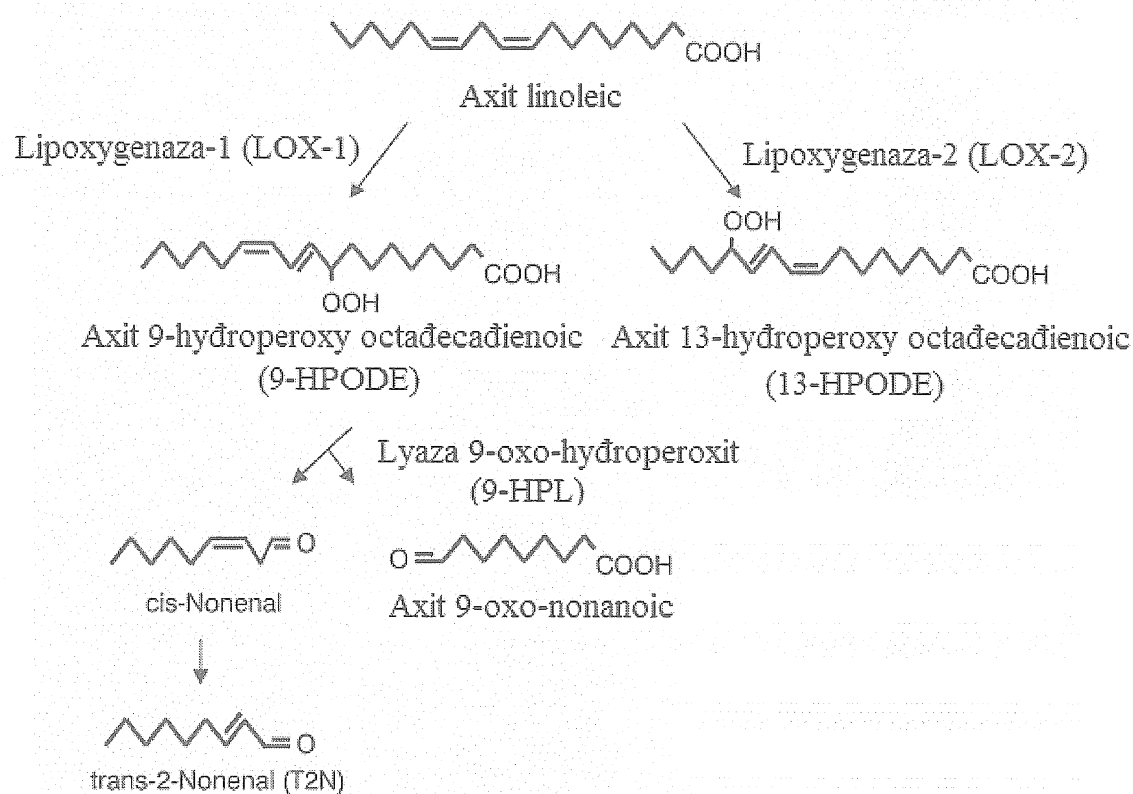
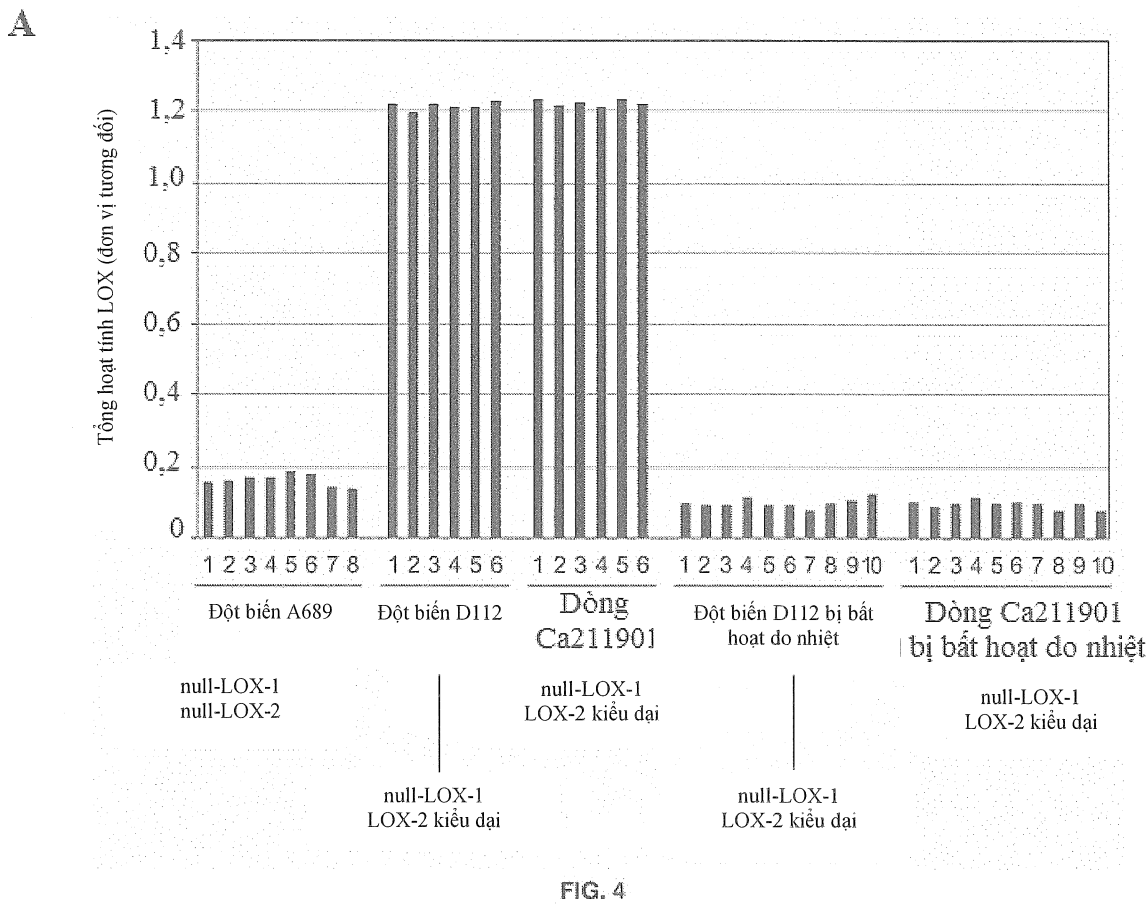
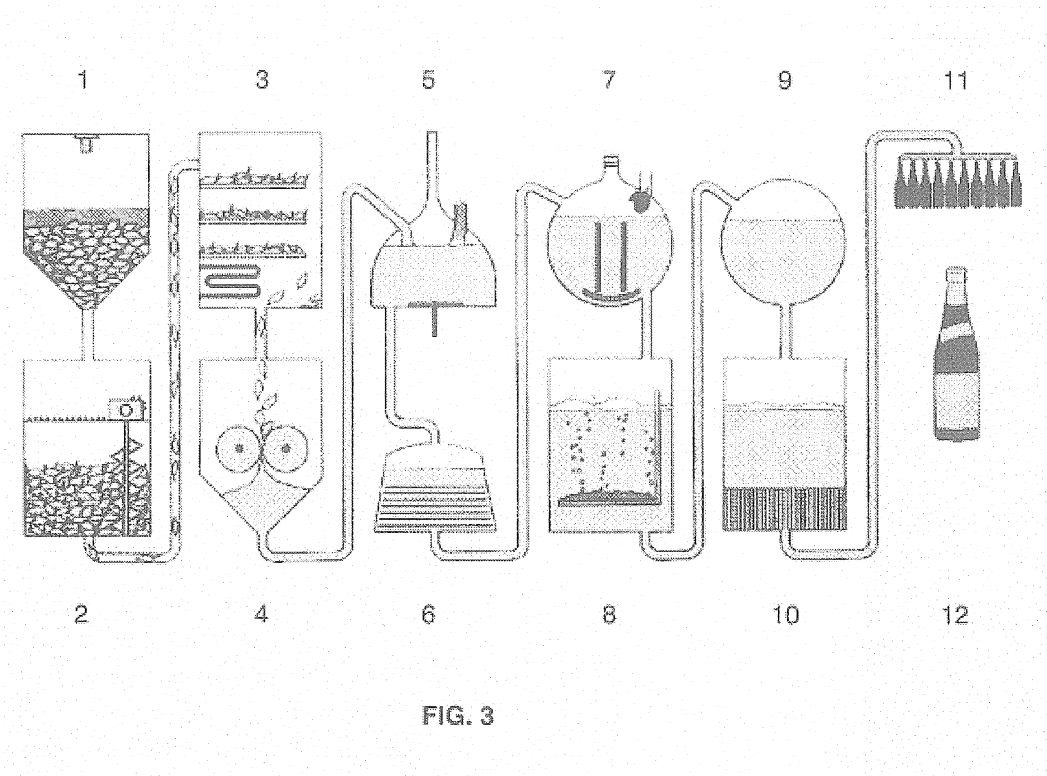


FIG. 2



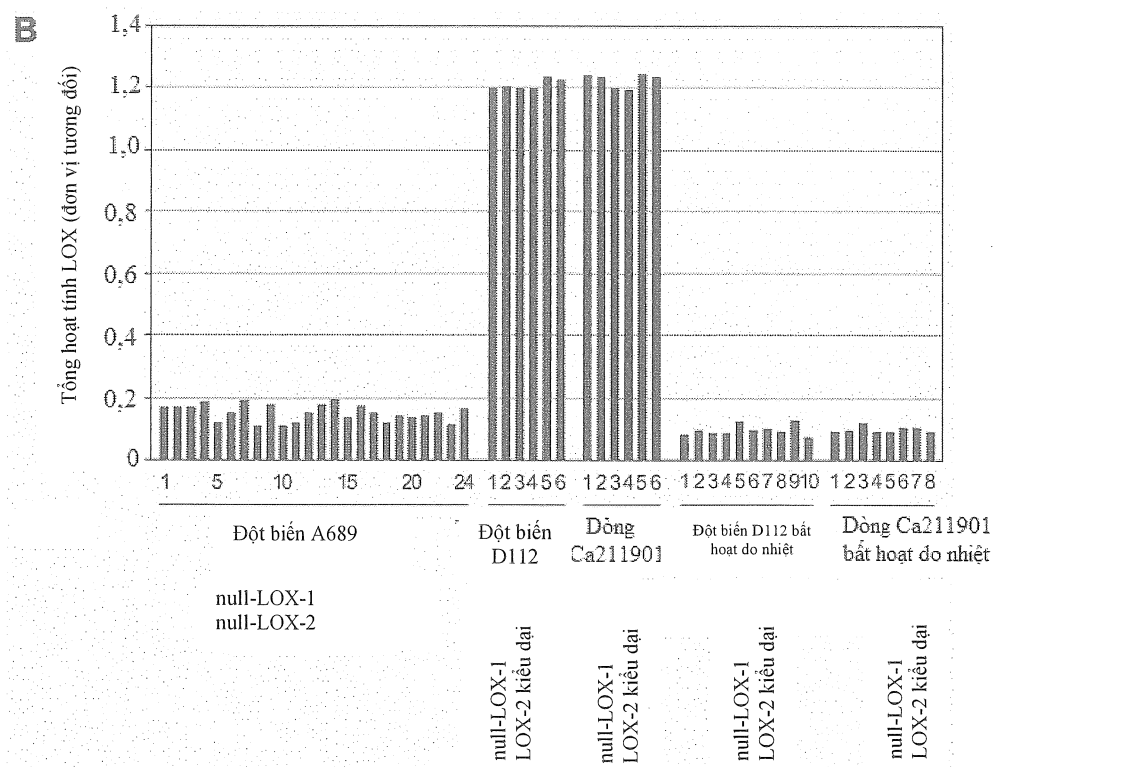


FIG. 4

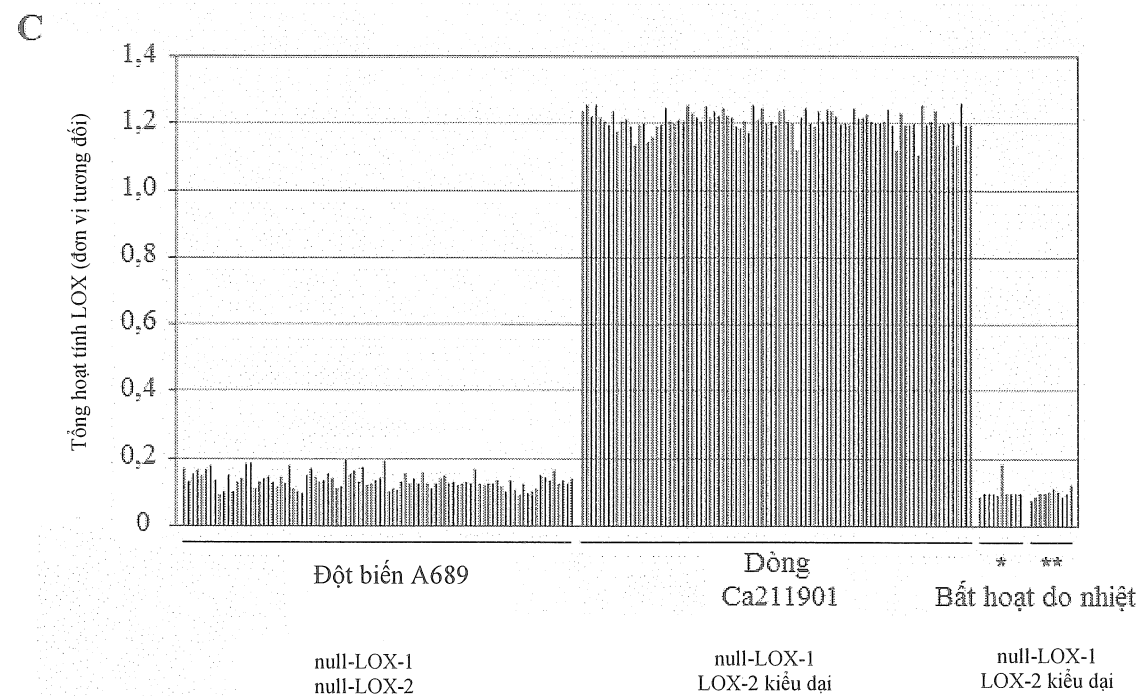


FIG. 4

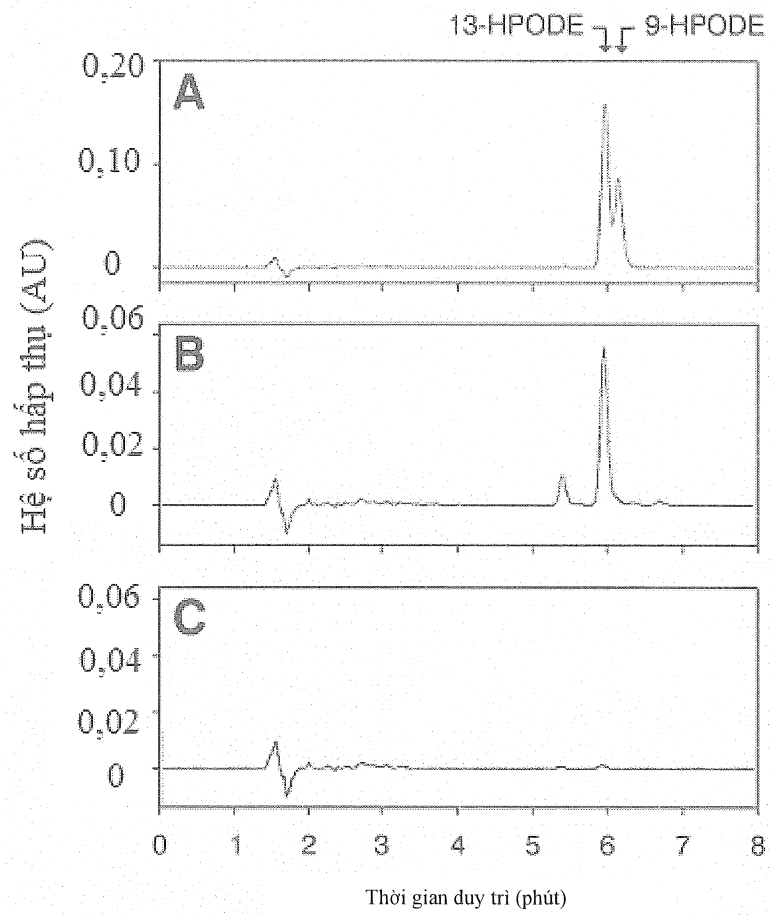


FIG. 5

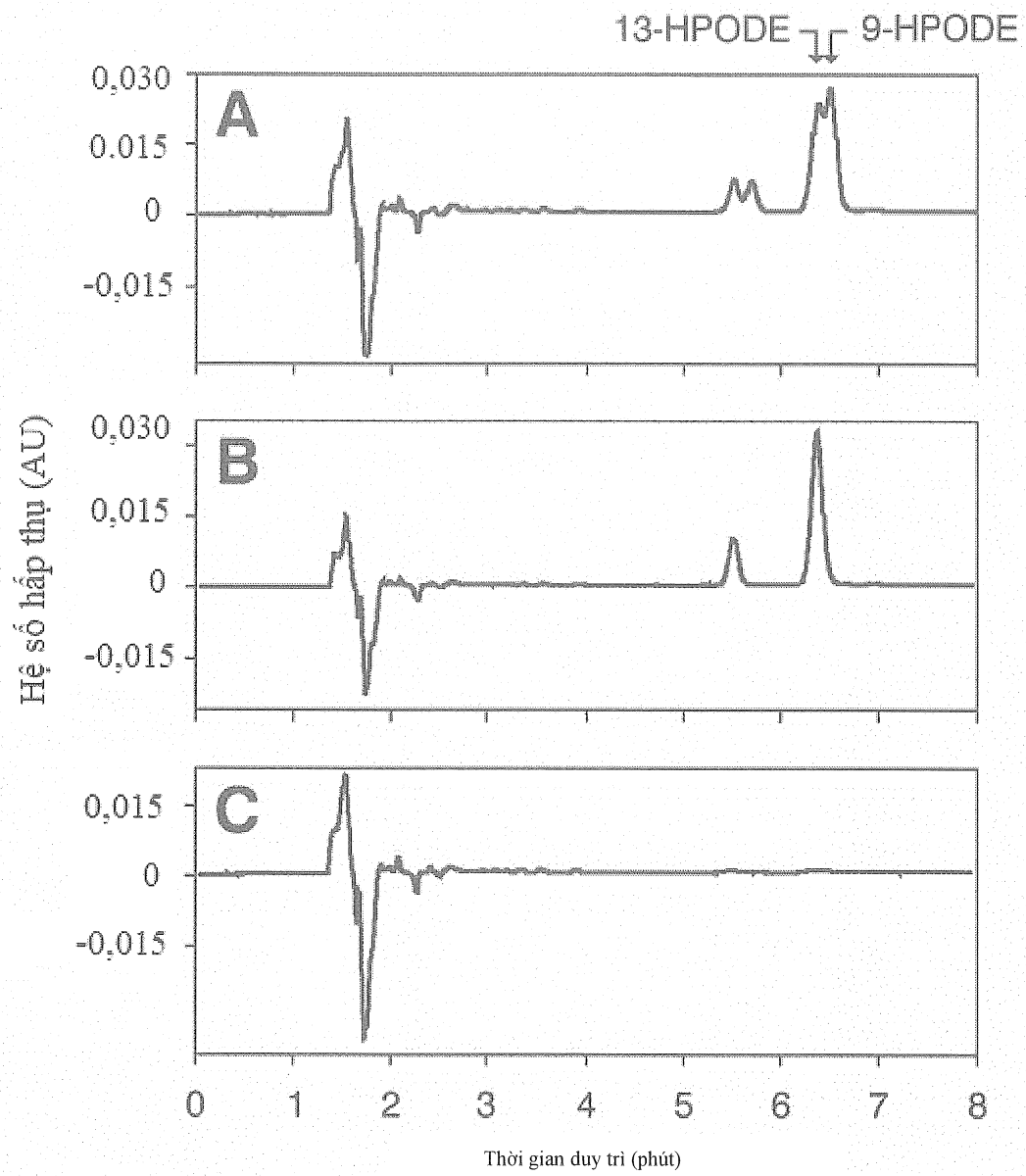


FIG. 6

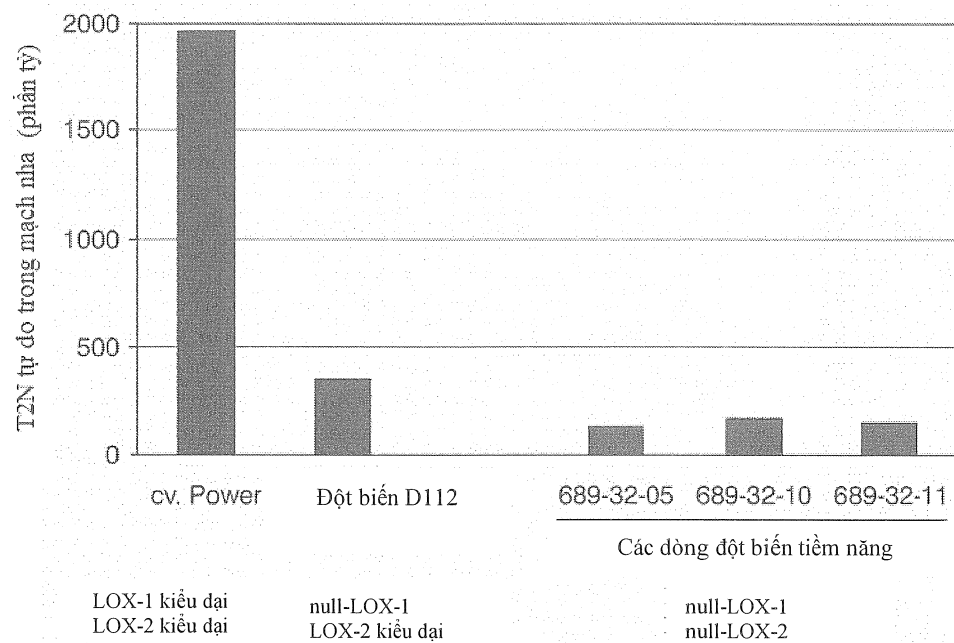


FIG. 7

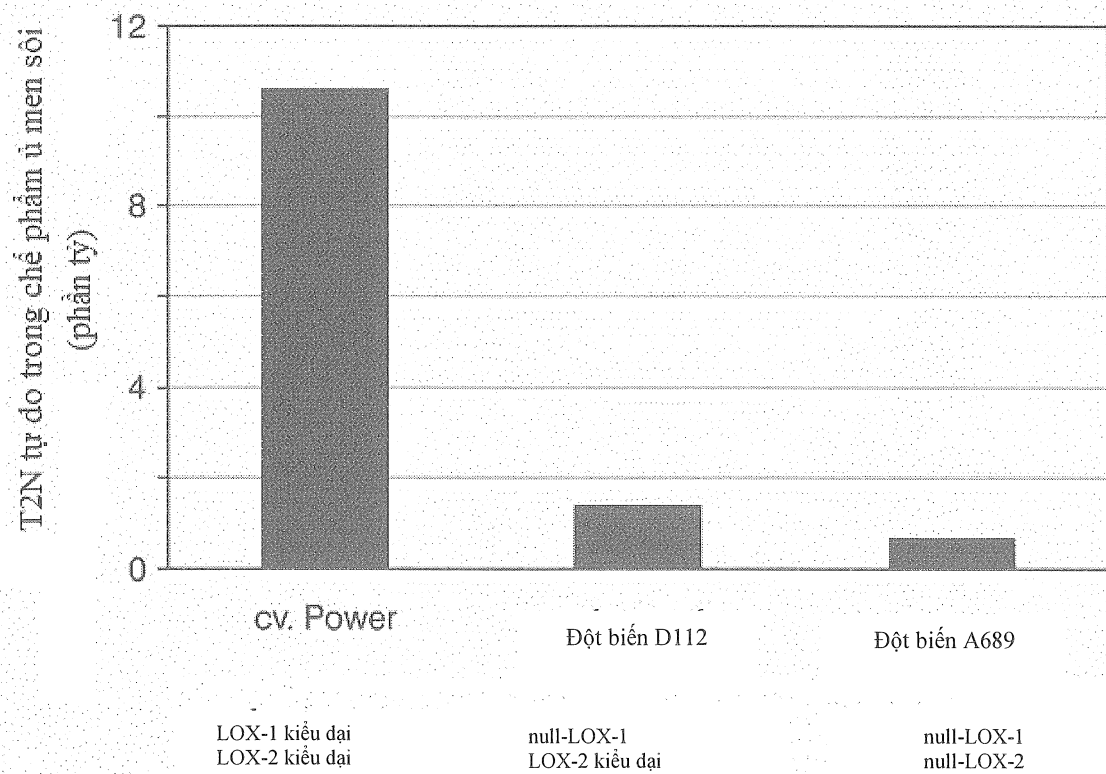


FIG. 8

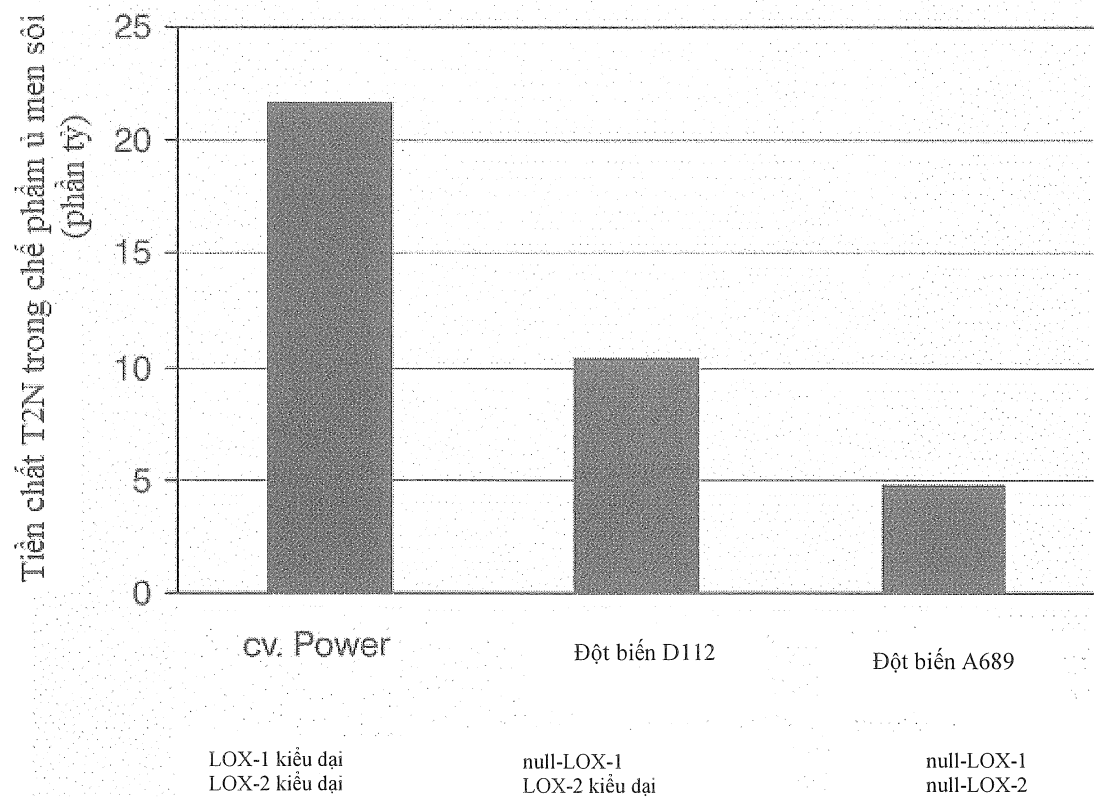


FIG. 9

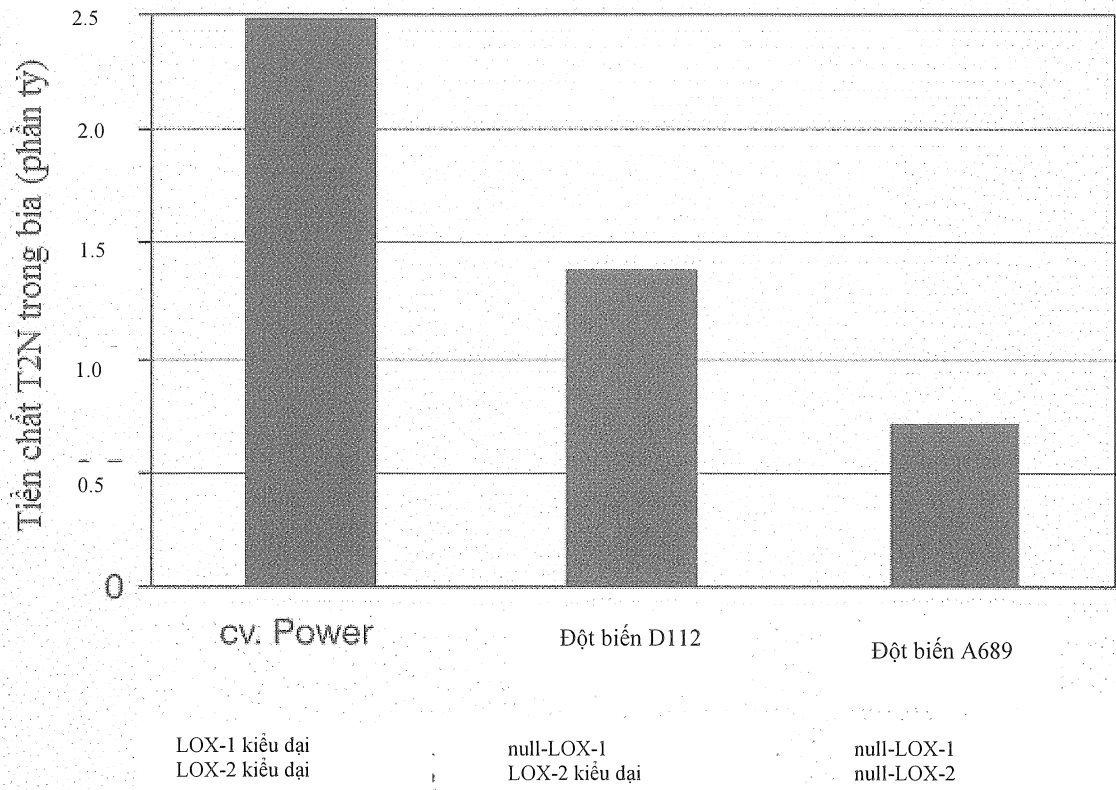


FIG.10

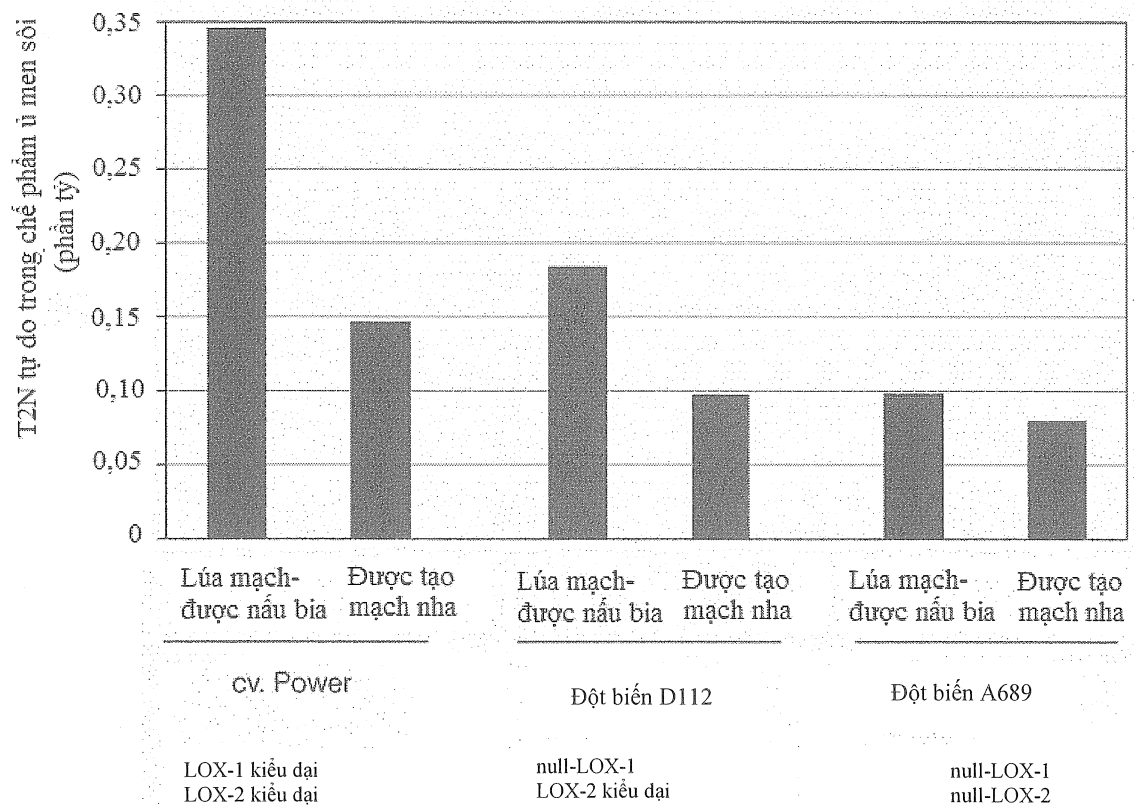


FIG. 11

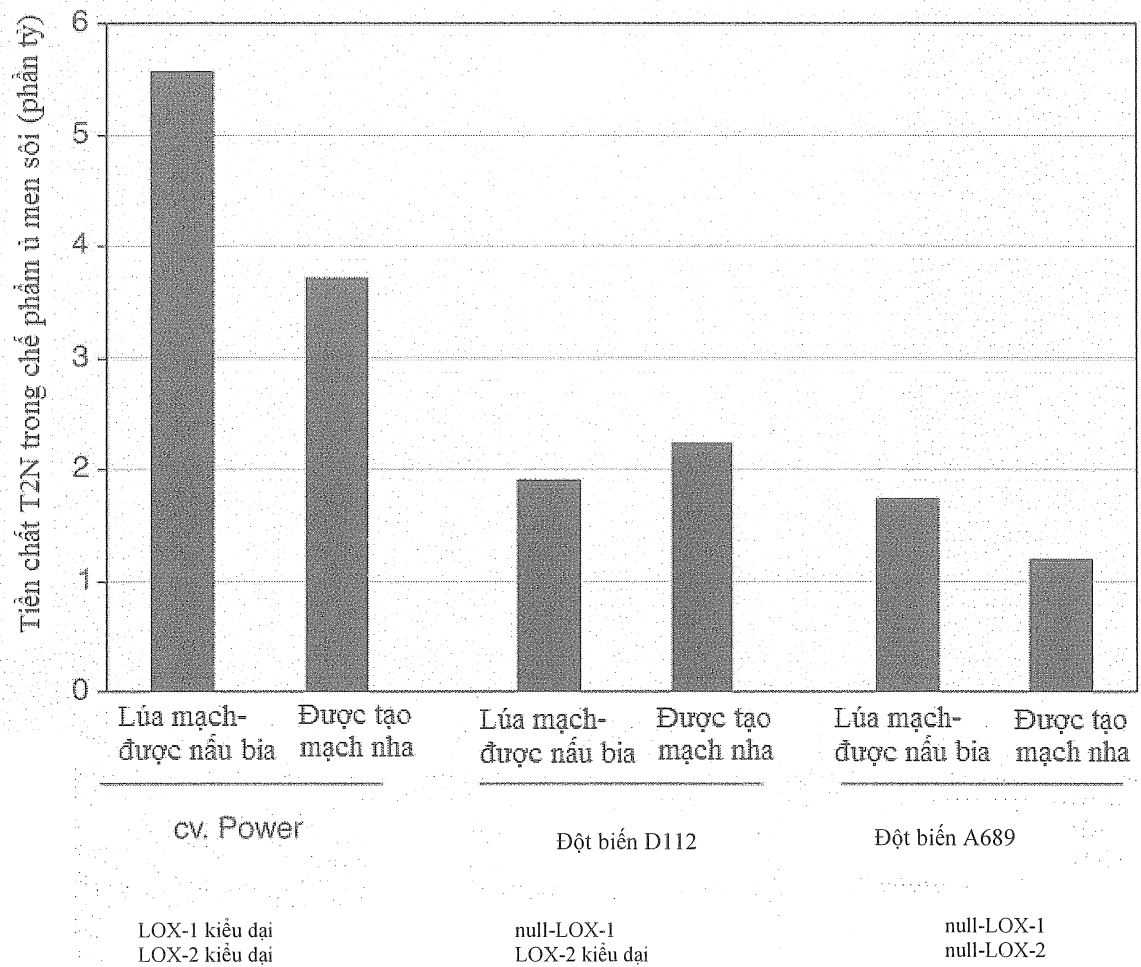


FIG.12

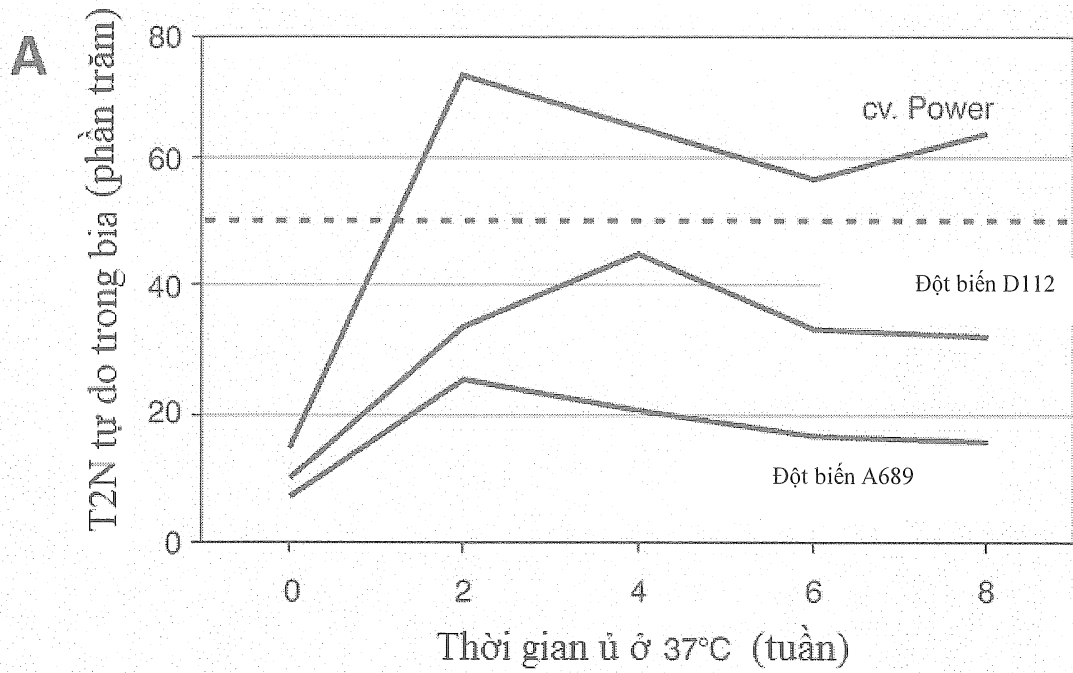


FIG. 13

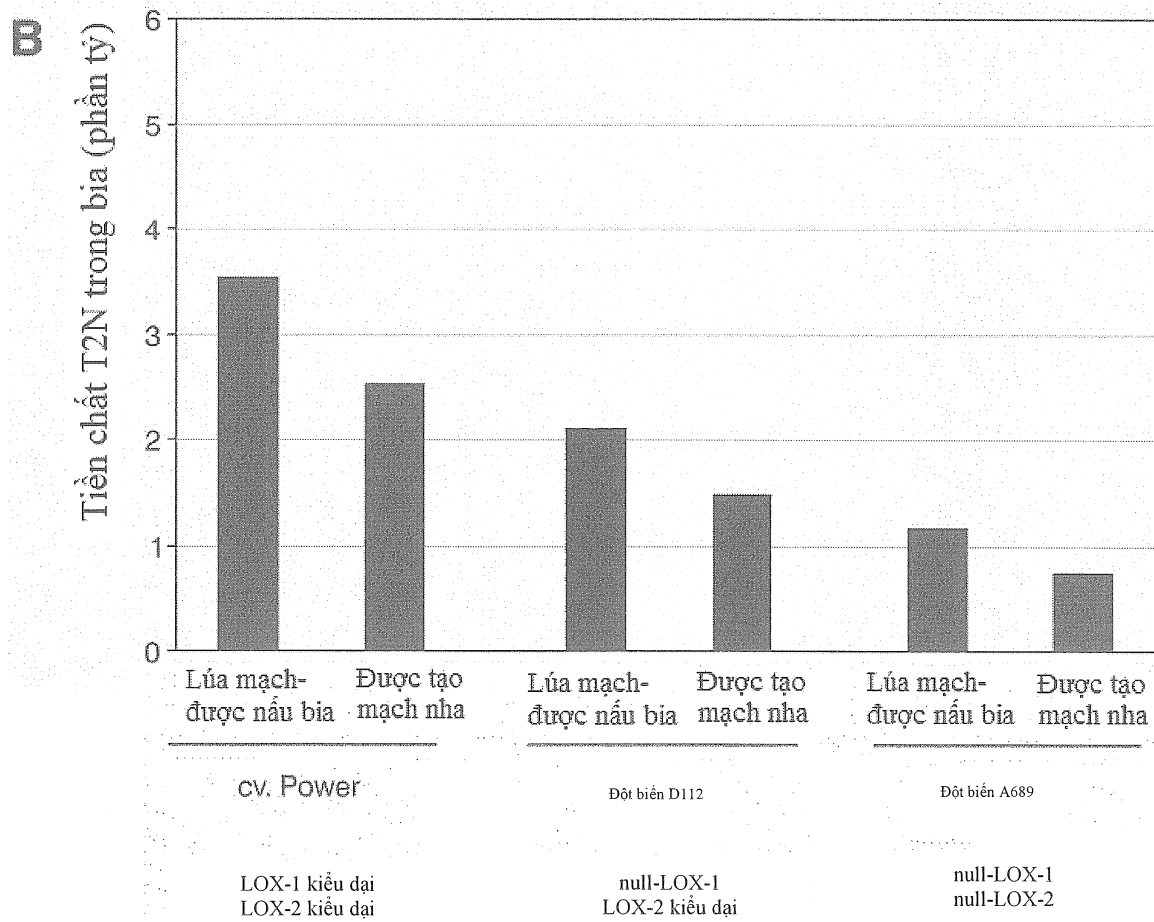


FIG. 13

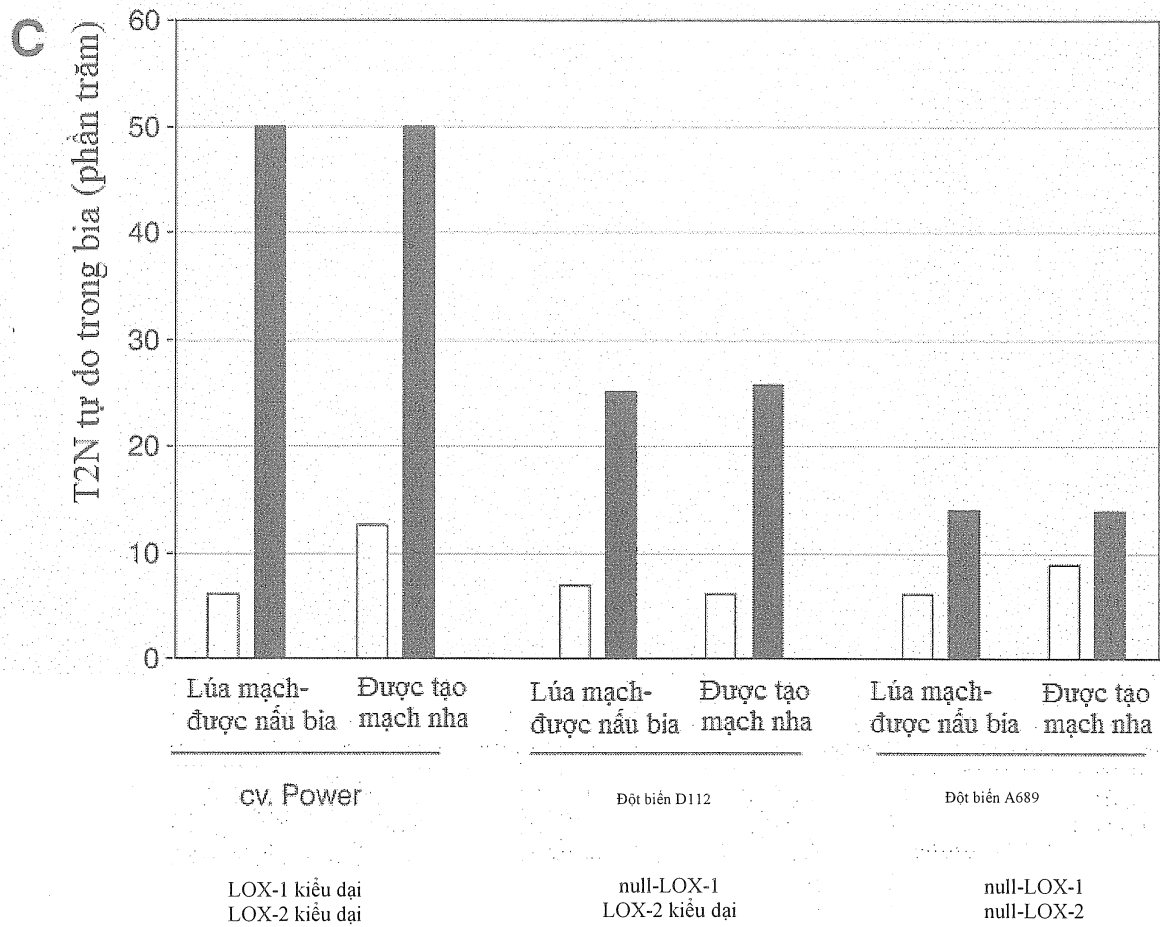


FIG. 13

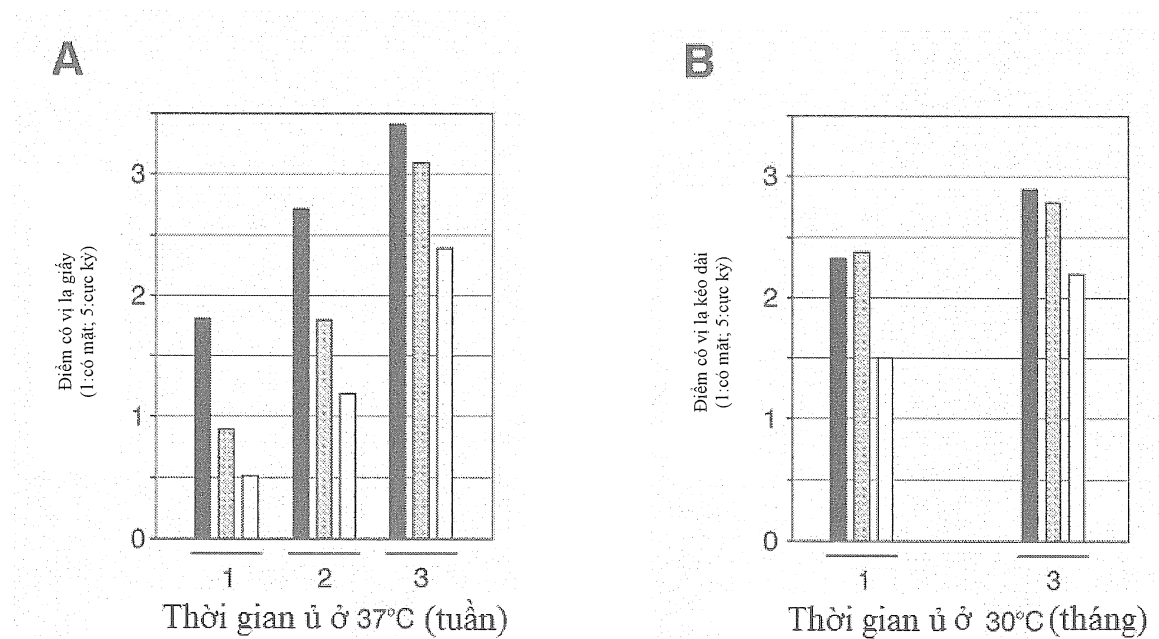
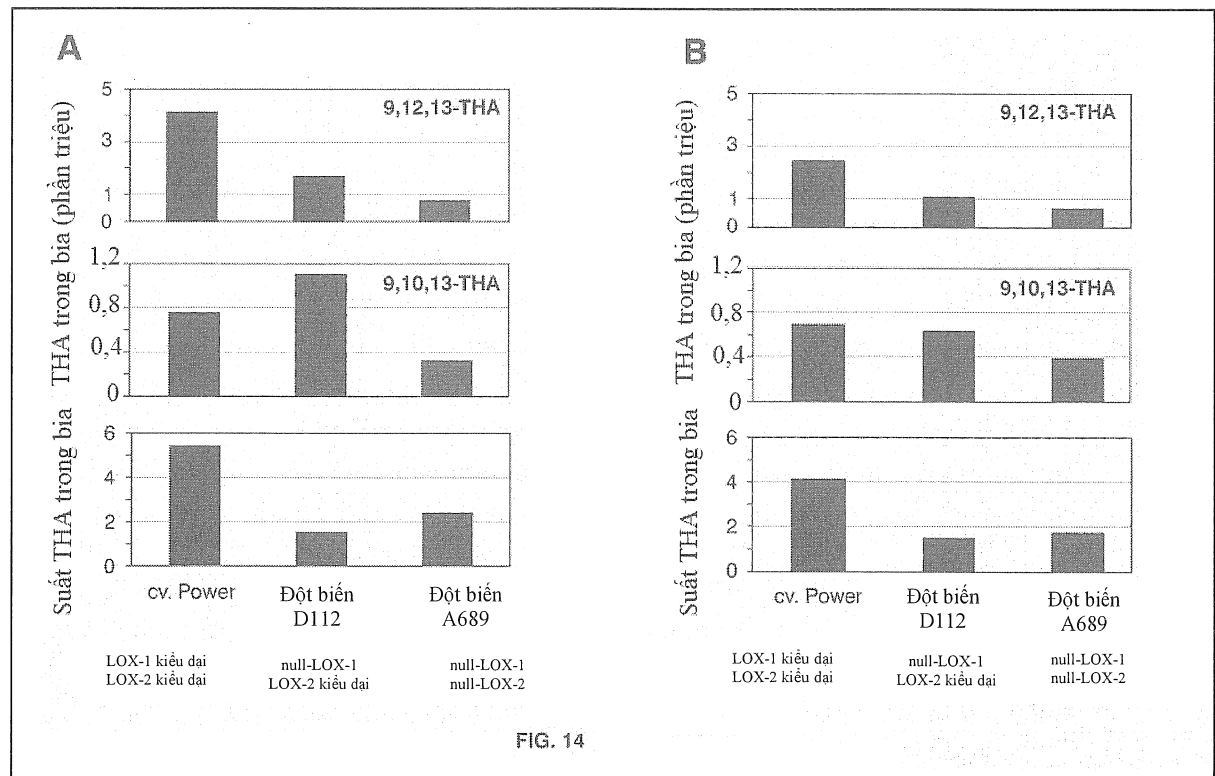


FIG. 15

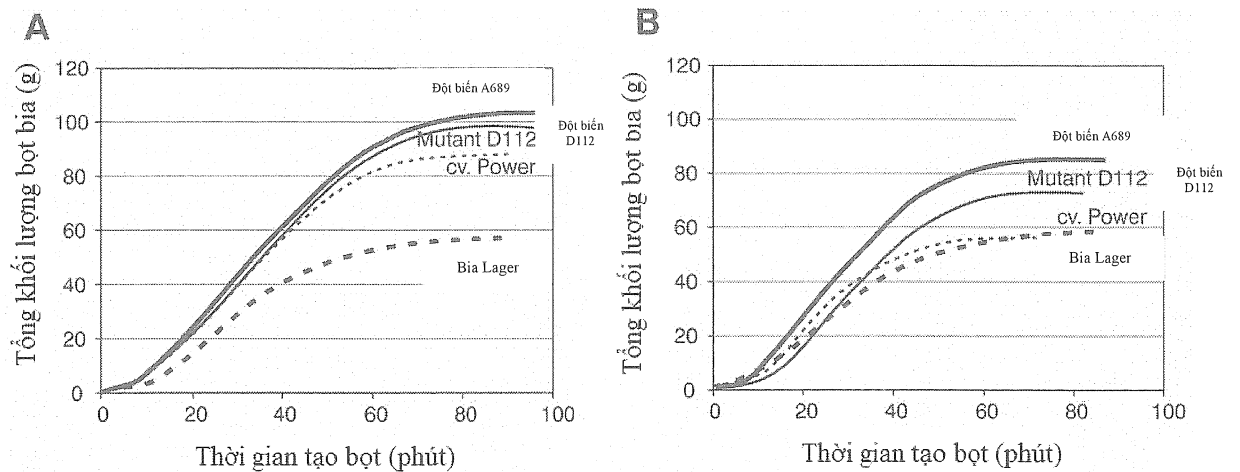


FIG. 16

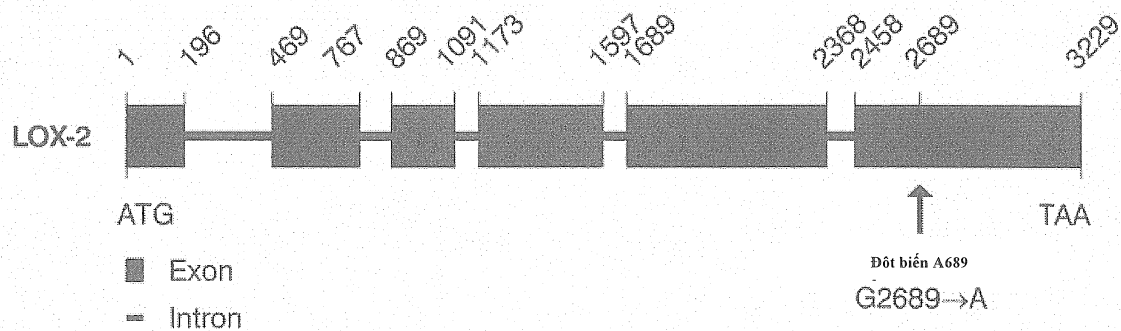


FIG. 17

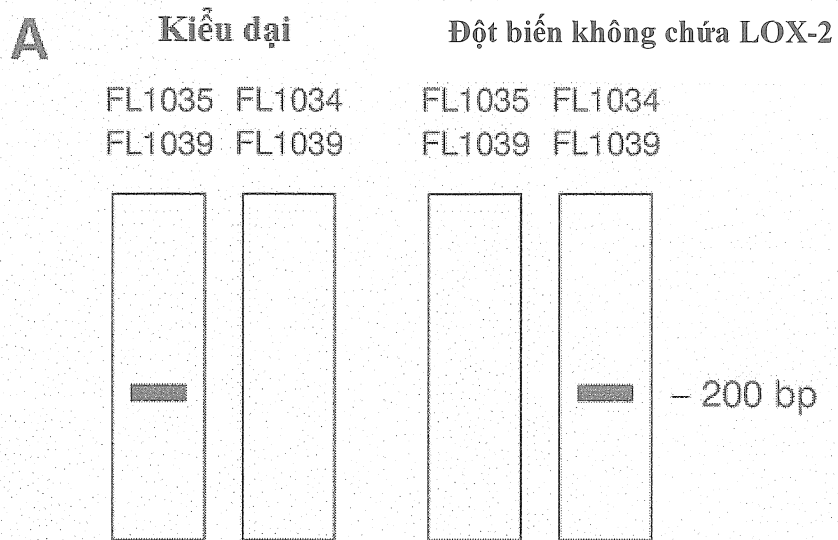


FIG. 18

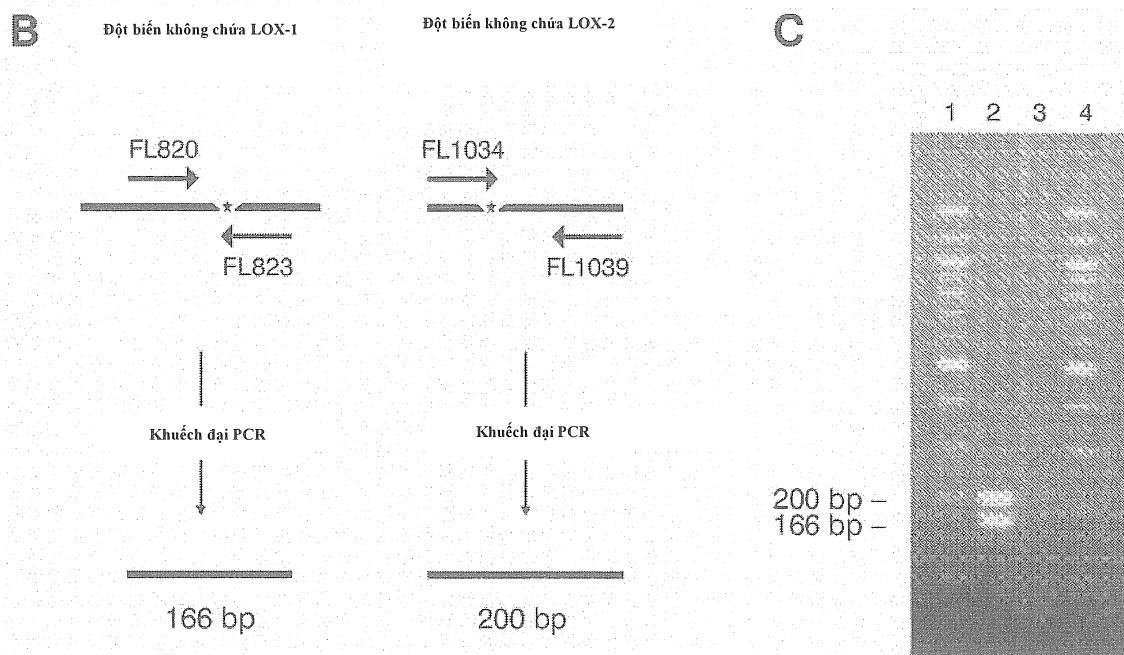


FIG. 18

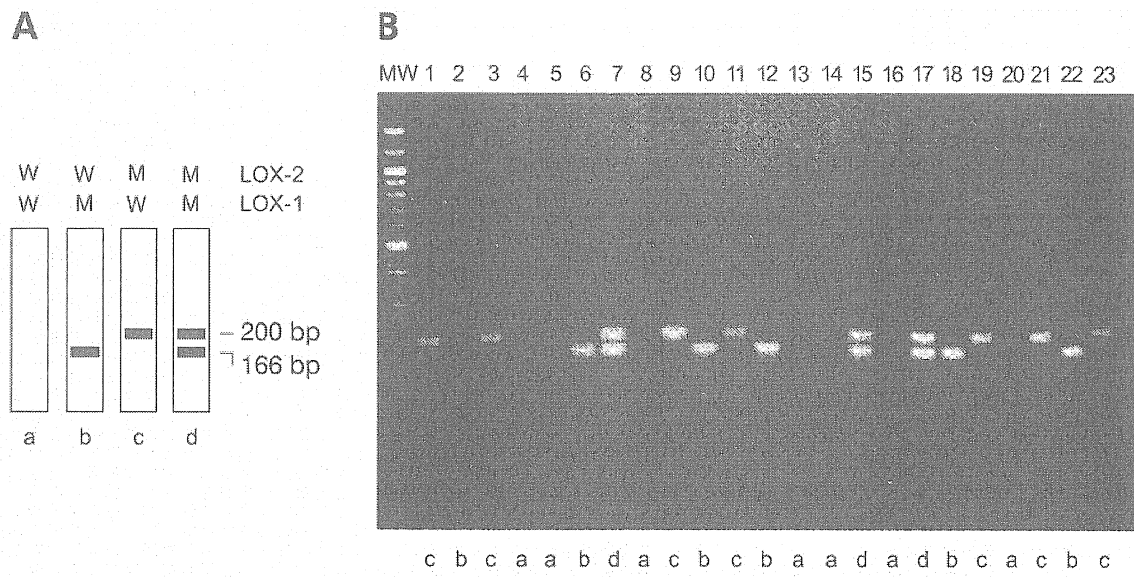


FIG. 19