

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 353**

51 Int. Cl.:

A23L 7/25 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
C12C 1/18 (2006.01)
C12C 12/00 (2006.01)
A23L 2/38 (2006.01)
A23L 7/20 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2011** **PCT/DK2011/050186**
87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011** **WO11150933**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2011** **E 11729247 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016** **EP 2575433**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de cerveza con ahorro de energía**

30 Prioridad:

03.06.2010 DK 201070243

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.02.2017

73 Titular/es:

CARLSBERG BREWERIES A/S (50.0%)
Ny Carlsberg Vej 100
1799 Copenhagen V, DK y
HEINEKEN SUPPLY CHAIN B.V. (50.0%)

72 Inventor/es:

KNUDSEN, SØREN;
RIIS, PREBEN;
SKADHAUGE, BIRGITTE;
BECH, LENE, MØLSKOV y
OLSEN, OLE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 600 353 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fabricación de cerveza con ahorro de energía

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos con ahorro de energía para preparar bebidas a base de cebada, por ejemplo bebidas a base de malta, tales como cerveza. La invención más adicionalmente se refiere a plantas de cebada útiles en los procedimientos desvelados. En particular, la invención describe plantas de cebada con rasgos combinados de lipooxigenasa-1-nula (LOX-1-nula), lipooxigenasa-2-nula (LOX-2-nula) y S-adenosilmetionina:metionina S-metiltransferasa-nula (también denominada S-metionina-nula (Met)-S-metiltransferasa o MMT-nula) en una planta, es decir, una planta de cebada con LOX-1 nula-LOX-2 nula-MMT nula (en la presente memoria descriptiva también denominada intercambiabilmente doble-LOX nula-MMT nula), lo cual es particularmente útil para los procedimientos con ahorro de energía para preparar bebidas a base de cebada descritas en la presente memoria descriptiva.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Instalación para malteado y cervecería

La cebada - *Hordeum vulgare*, L. - es un cereal diploide que se cultiva ampliamente en diferentes climas para la producción de comidas y bebidas. Las bebidas a base de dicha planta son producidas en grandes cantidades, empleando procedimientos con elevado consumo de energía, por ejemplo, en las instalaciones para malteado y cervecerías para secado en horno y operaciones de cocción del mosto, respectivamente.

El malteado normalmente implica el remojo de los granos de cebada para promover la germinación, seguido del secado en horno a elevadas temperaturas, lo cual hace que el proceso sea particularmente consumidor de energía. Los objetivos principales del secado en horno incluyen: (i) terminación de la germinación; (ii) secado de los granos de cebada germinados; (iii) desnaturalización de enzimas, particularmente enzimas lipasa y LOX en cebada de tipo salvaje; y (iv) conversión de los precursores de sulfuro de dimetilo (DMS) (DMSP), que principalmente consisten en S-metil-Met (SMM), en DMS volátil [después del secado en horno de una malta pálida normal, el contenido de DMSP es en promedio 4 ppm en peso seco (ver Technology Brewing and Malting, Kunze, 2004, VLB Berlin, pp. 158-162)]. Ciertas actividades de enzima son preservadas durante el secado en horno (por ejemplo, amilasa, proteasa, etc.).

En la cervecería, se consumen en términos generales, aproximadamente la mitad de la energía en el proceso de elaboración, que corresponde a una carga de energía en el rango de 48000-83000 kJ/hL (Modern brewhouse technology, Brauwelt International 2004, p. 410-412). La mayoría de la energía es consumida en el proceso de cocción del mosto, el objetivo del cual es, en general, proporcionar: (i) coagulación de proteínas; (ii) inactivación de enzimas; (iii) esterilización del mosto; (iv) extracción de compuestos de lúpulo; (v) isomerización de α -ácidos; y (vi) evaporación de compuestos volátiles no deseados, por ejemplo, los sabores sulfuroso y rancio de DMS y trans-2-nonenal (T2N), respectivamente.

El mosto es tradicionalmente hervido durante al menos 50-60 min para permitir una evaporación global de al menos 10-15% (ver Technology Brewing and Malting, Kunze, 2004, VLB Berlin, Chapter 11), pero actualmente a menudo es mejorada mediante medios tecnológicos hasta 6-8%. También se ha intentado reducir el consumo de energía aún más, por ejemplo, mediante minimización de la evaporación hasta tan sólo 3-4%, combinado con un proceso de remoción que extrae compuestos volátiles no deseados dentro de vapor de agua inyectado (véase, por ejemplo, Bonacchelli y col., 2007). Se piensa que los niveles de compuestos volátiles, no deseados, en mosto hacen difícil reducir adicionalmente, o incluso eliminar, la evaporación.

T2N

El T2N - un alquenal C_9 volátil con un punto de ebullición de 88°C - fue caracterizado en 1970 como la molécula que confiere el sabor a cartón en la cerveza (Jamieson and Gheluwe, 1970). Dado que el nivel del umbral de sabor para T2N en humanos es extremadamente bajo, previamente determinado como estando alrededor de 0,7 nM o 0,1 ppb (Meilgaard, 1975), los productos con incluso niveles mínimos del aldehído son percibidos como envejecidos. Sin embargo, los niveles de T2N son generalmente muy bajos en cerveza fresca (Lermusieau y col., 1999), lo que indica que los procesos durante el envejecimiento promueven la liberación de T2N libre a partir de los correspondientes aductos (Nyborg y col., 1999). Una observación posterior reveló la correlación entre el potencial de T2N del mosto y

el T2N libre formado después del almacenamiento del producto (Kuroda y col., 2005).

El secado en horno y la cocción del mosto representan etapas de procesamiento separadas que pueden ser blanco para la manipulación con el fin de alcanzar niveles reducidos de T2N en bebidas a base de cebada. Mientras que el secado en horno a elevadas temperaturas confiere inactivación de las enzimas implicadas en la formación de T2N, tales como lipasas y LOXs (véase, por ejemplo, Technology Brewing and Malting, Kunze, 2004, VLB Berlin, p. 162), el T2N libre también puede ser eliminado mediante cocción del mosto.

El grano de cebada contiene tres enzimas LOX - conocidas como LOX-1, LOX-2, y LOX-3 (van Mechelen y col., 1999). La actividad principal de LOX-1 cataliza la formación de ácido 9-hidroperoxi octadecadienoico (9-HPODE; ver **FIG. 1A** para una vista parcial de la ruta de LOX) - un precursor de tanto T2N como ácidos trihidroxi octadecenoicos (THAs) - a partir de ácido linoleico. LOX-2 principalmente cataliza la conversión de ácido linoleico a 13-HPODE, el cual es adicionalmente metabolizado a hexanal, un aldehído C_6 con un umbral de sabor elevado $\sim 0,4$ -ppm (Meilgaard, supra). Dada la muy pequeña actividad de LOX-2 para la formación de 9-HPODE, varios informes han mostrado que el T2N es producido mediante una ruta bioquímica que implica la conversión de ácido linoleico a 9-HPODE, inicialmente catalizada por LOX-1, seguida de escisión de 9-HPODE a través de acción de 9-hidroperóxido liasa (ver, por ejemplo, Kuroda y col., 2003, 2005; Noodermeer y col., 2001).

Con respecto a las propiedades anteriormente mencionadas de LOX-1, dicha enzima es un blanco útil para la inactivación en los esfuerzos para disminuir los niveles de T2N en productos a base de cebada, actualmente sustanciados mediante las siguientes dos observaciones: (i) Kuroda y col. (2005) sugirieron una correlación entre la actividad de LOX-1 y el potencial de T2N en el mosto, principalmente porque LOX-2 ha sido considerada inferior con respecto a la formación del potencial de T2N en dicho mosto. Sin embargo, parece no haber correlación entre la actividad global de LOX en malta y el potencial de T2N en el mosto; (ii) se han descrito procedimientos para obtener actividad reducida de LOX-1 en cebada.

Varias plantas de cebada diferentes han sido desarrolladas que comparten la propiedad de actividad de LOX-1 parcialmente o totalmente reducida. Por ejemplo, los granos de cebada y las plantas de cebada que tienen una baja actividad de LOX-1 fueron desveladas en la Solicitud PCT WO 02/053721 de Douma, A.C. y col., mientras que WO 2005/087934 de Breddam, K. y col. está centrada en dos mutantes de cebada diferentes deficientes en actividad de LOX-1 - una mutante de sitio de splicing y una mutante con un codón de terminación traduccional prematuro. Además, EP 1609866 de Hirota, N. y col. describió una planta de cebada sin actividad de LOX-1, la cual fue identificada mediante relevamiento de una colección de variedades autóctonas de cebada.

35 DMS

En bebidas a base de cebada - como también en muchos vegetales y alimentos, incluyendo té, cacao, leche, vinos, bebidas espirituosas (tales como ron), maíz dulce, y numerosos vegetales cocidos - el DMS agrega notas prominentes de aroma y sabor al producto. Dependiendo del tipo de cerveza, los niveles de DMS típicamente pueden alcanzar 150 ppb (150 $\mu\text{g/l}$), contribuyendo dicho compuesto a sabores no deseables de "vegetal cocido" o "tipo repollo". En este aspecto, no es solo importante que el umbral sensorial esté alrededor de 30-45 $\mu\text{g/l}$ (Meilgaard, 1982), sino también que el sabor derivado del DMS permanezca sin notarse a niveles <10 ppb.

Las anteriormente mencionadas etapas de procesamiento de secado en horno y cocción de mosto en la producción de cerveza influyen en los niveles de DMS en bebidas a base de cebada, principalmente porque ambos dichos procesos pueden inducir conversión química de SMM a DMS (véase, por ejemplo, Technology Brewing and Malting, Kunze, 2004, VLB Berlin, p. 160). Debido al punto de ebullición del último compuesto de solamente 37-38°C, una parte mayoritaria del DMS simplemente se evaporará a la atmósfera. Sin embargo, cuando la duración o el vigor de la cocción de mosto es inadecuado para convertir SMM residual, el DMS puede continuar formándose a medida que el mosto se enfría - con alta probabilidad de transferirse a la cerveza.

El SMM representa casi toda, posiblemente toda, la reserva de DMSP en granos de cebada que germinan, sintetizado por la acción de componentes funcionales del ciclo de SMM (**FIG. 1B**). Aquí, el MMT cataliza la transferencia de un grupo metilo a partir S-adenosil-Met (AdoMet) a Met, formando SMM. El último compuesto puede a su vez servir como donador de metilo para la síntesis de Met a partir de homocisteína (Hcy), una reacción catalizada por la enzima Hcy-S-metiltransferasa (HMT).

En la literatura científica, se ha considerado como una oportunidad regular la síntesis de SMM utilizando, por ejemplo, tecnología antisentido (McElroy y Jacobsen, 1995). Sin embargo, no se proveyó de ninguna guía sobre

genes diana relevantes para antisentido. A pesar de ello, se esperaba que la posibilidad de un resultado positivo fuera cuestionable dado que grandes reducciones en los niveles de SMM podrían ser dañinas para el crecimiento y desarrollo de la cebada. Soluciones alternativas para obtener un nivel de SMM más bajo no fueron discutidas por McElroy y Jacobsen (supra). Y además, como se discute en detalle a continuación en la presente memoria descriptiva, las tecnologías antisentido no han sido exitosamente aplicadas en cebada para abolir completamente la expresión génica.

Se han desarrollado procedimientos tecnológicos para reducir el nivel de DMS en cerveza. Así, el documento AU 38578/93 describe un procedimiento para reducir niveles de DMS en malta, que comprende tratamiento con vapor de dicha malta. En la solicitud de patente US 2006/0057684 de Bisgaard-Frantzen, H. y col. se describen procedimientos de fabricación de cerveza que comprenden tratamiento de maceración con calor a $\geq 70^{\circ}\text{C}$. Y en la Patente US No. 5,242,694 de Reuther, H. se muestran procedimientos para preparar cerveza baja en carbohidratos, donde los procedimientos comprenden ebullición prolongada de mosto seguida de lavado de dicho mosto con dióxido de carbono (CO_2). Sin embargo, todos los tratamientos anteriormente mencionados son conocidos porque consumen elevados niveles de energía, posiblemente alterando las características de la malta o del mosto.

Plantas mutantes de cebada

Desafortunadamente, no hay procedimientos disponibles para preparar plantas transgénicas de cebada que carezcan por completo de la expresión de una dada proteína. En general para cebada, la aplicación de técnicas de antisentido conducen a plantas transgénicas que aún expresan algo de la proteína en cuestión (ver por ejemplo Robbins y col. 1998; Stahl y col., 2004; Hansen y col., 2007). Además, no se han desarrollado para el uso en plantas de cebada procedimientos efectivos para preparar mutaciones específicas utilizando ARN/ADN quimérico o mutagenia sitio-dirigida. En línea con esto, y a pesar de los intensos esfuerzos, los inventores de la presente solicitud siguen sin estar en conocimiento de ningún ejemplo publicado sobre direccionamiento exitoso de genes dirigido por oligonucleótidos en cebada. A pesar de no haber sido emprendido en cebada, lida y Terada (2005) muestran que el direccionamiento de genes dirigido por oligonucleótidos ha sido ensayado en maíz, tabaco y arroz - pero en todos los casos con el gen resistente a herbicida acetolactato sintasa (ALS) como diana. De acuerdo con la conclusión de lida y Terada (supra), aún queda por establecerse si la anteriormente mencionada estrategia, con las modificaciones apropiadas, es aplicable a genes distintos de aquellos directamente seleccionables, tales como los genes ALS. A pesar de no estar aún sustanciada, la mutagenia dirigida utilizando nucleasas de dedo de zinc representa otra herramienta que podría potencialmente permitir futuras investigaciones en biología vegetal básica o modificaciones en plantas de cultivo (Durai y col., 2005; Tzfira y White, 2005; Kumar y col., 2006). También en este caso, sin embargo, la mutagenia no ha sido emprendida ni aplicada con éxito en cebada.

No obstante, los mutantes de cebada pueden ser preparados mediante mutagenia al azar utilizando radiación o tratamiento químico, tal como incubando granos durante 12 h hasta durante una noche, con una solución de azida de sodio (NaN_3). Un ejemplo se refiere a granos de cebada mutagenizados a través del uso de NaN_3 , y posteriormente analizados en busca de niveles elevados de fosfato libre en un esfuerzo por detectar mutantes con bajo fitato (Rasmussen y Hatzack, 1998); se identificaron un total de 10 mutantes de 2000 granos analizados. A pesar de estar lejos de lo siempre posible, encontrar un mutante particular después de tratamiento con NaN_3 es dependiente de la persistencia y de un procedimiento de relevamiento efectivo.

Sustentabilidad

En un mundo que busca soluciones para sus desafíos en energía, medioambiente y alimentos, un foco de la sociedad es limitar o reducir las concentraciones atmosféricas de CO_2 especialmente enfocándose en las emisiones de CO_2 de los sistemas industriales. La principal razón es que un incremento en la concentración de un gas de invernadero ocasiona un cambio en el balance de energía de la Tierra, siendo el CO_2 el contribuyente único más grande. Como consecuencia de la preocupación mundial acerca del cambio climático, y también basado en razonamientos y restricciones económicas, las fábricas de cerveza pueden ser una parte activa utilizando energía tan eficientemente como sea posible, y reduciendo las emisiones de gases de invernadero de las operaciones más efectivamente. Hasta ahora, el punto focal ha estado en medios tecnológicos para solucionar los temas anteriormente mencionados sobre sustentabilidad.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los procedimientos de tratamiento con calor han sido descritos para la reducción de la actividad de LOX y de los niveles DMS de DMS. Dicho tratamiento fue generalmente llevado a cabo durante el malteado y/o la preparación del

mosto, significando que se permitía que los productos de la actividad de LOX se acumularan en la cebada hasta que se llevaba a cabo el tratamiento con calor. El análisis de la cebada reveló que cantidades significativas de productos de la actividad de LOX estaban presentes en la cebada, incluso antes del malteado (Wackerbauer y Meyna, 2002). Es evidente que los procedimientos de tratamiento con calor son altamente consumidores de energía.

En particular, la invención proporciona procedimientos para preparar una bebida a base de cebada con bajos niveles de uno o más sabores indeseables y precursores de los mismos (particularmente bajos niveles de DMS y T2N y precursores de los mismos), donde el procedimiento implica una entrada de energía reducida, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (i) proporcionar una planta de cebada, o parte de la misma, donde dicha planta de cebada comprende:
 - (a) una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional; y
 - (b) una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional; y
 - (c) una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional;
 - (ii) opcionalmente maltear al menos parte de dicha cebada, obteniendo así cebada malteada;
 - (iii) macerar dicha cebada y/o cebada malteada y opcionalmente adjuntos adicionales, obteniendo así un mosto;
 - (iv) calentar dicho mosto opcionalmente en presencia de ingrediente(s) adicional(es), donde como máximo el 4% del volumen del mosto es evaporado, obteniendo así mosto calentado;
 - (v) procesar dicho mosto calentado como una bebida;
- preparando así una bebida derivada de cebada con bajos niveles de uno o más sabores indeseables y precursores de los mismos.

Es también un objeto de la presente invención proporcionar plantas de cebada adecuadas para el uso en los procedimientos descritos. Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar plantas de cebada agrónomicamente útiles que comprenden los tres rasgos diferentes, es decir, una planta de cebada LOX-1 nula-LOX-2 nula-MMT nula (en la presente memoria descriptiva también denominada "doble-LOX nula-MMT nula"). La selección de una planta de cebada útil se refiere no solamente al vigor de la planta, sino también a la falta combinada de las actividades enzimáticas LOX-1, LOX-2 y MMT, utilizando ensayos bioquímicos tal como se describe en detalle en la presente memoria descriptiva a continuación. Las plantas de cebada de acuerdo con la presente invención pueden ser introducidas dentro de un esquema de mejoramiento (breeding) adecuado, tal como autopolinización, retrocruzamiento, cruzamiento con poblaciones, y similares.

Un modo para acelerar el proceso de mejoramiento de plantas comprende la multiplicación inicial de mutantes generadas mediante aplicación de cultivo de tejidos y técnicas de regeneración. Como se describe en el Ejemplo 3 y se muestra esquemáticamente en la **FIG. 3**, un esquema tradicional de mejoramiento de cebada fue empleado para generar una planta de cebada con un rasgo de doble-LOX nula-MMT nula a partir de una planta de cebada doble-LOX-nula y una planta MMT-nula. Por lo tanto, otro aspecto es proporcionar células, las cuales al crecer y diferenciarse producen plantas de cebada que tienen el rasgo de doble-LOX nula-MMT nula. Por ejemplo, el mejoramiento puede implicar cruzamientos tradicionales, preparación de plantas haploides dobles derivadas de anteras fértiles, utilizando el cultivo de tejido tal como cultivo de anteras o cultivos de microesporas.

La presente invención desvela que la entrada de energía reducida para el secado en horno es alcanzable a través de la aplicación de granos con LOX-nula, porque no hay necesidad de inactivar la enzima LOX endógena. La mutante con doble-LOX nula-MMT nula descrita por la presente invención puede ser utilizada para la producción de material de partida que carezca de las correspondientes actividades de enzima, para preparar la mutante de interés para alcanzar un consumo de energía más bajo durante el secado en horno en la instalación para malteado, pero también en la cervecería debido a la entrada reducida de calor durante la cocción del mosto.

Desde un punto de vista de la calidad de la cerveza o bebida, existe también una necesidad de un material de partida con doble-LOX nula-MMT nula, con el fin de eliminar funcionalmente o reducir drásticamente los niveles de T2N y DMS en los productos.

Además de las propiedades potenciales anteriormente mencionadas de una malta con doble-LOX nula-MMT nula, una cebada correspondiente podría ser útil para la producción de cerveza de cebada con bajo sabor indeseable, definida aquí como cerveza producida a través de la omisión del proceso de malteado, pero en su lugar proporcionar una maceración que consiste en numerosas enzimas externas (por ejemplo, Onda Pro, una mezcla de enzimas producida por Novozymes). Como se trata en la presente memoria descriptiva a continuación en el Ejemplo 7, fue sorprendente para los inventores de la presente encontrar que el mosto producido mediante maceración de material de partida de cebada no malteada con doble-LOX nula-MMT nula contenía muy bajos niveles de sabores indeseables de T2N y DMS, mientras que a partir de cebada de tipo salvaje era sorprendentemente alta en niveles

de DMS a pesar de que los granos de cebada no habían sido sometidos a germinación. En consecuencia, algunos precursores de DMS (DMSP) deben estar presentes en el grano de cebada seco, maduro - una propiedad nueva, aún no descrita, la cual es explorada en productos de cerveza de la presente solicitud. En consecuencia, los granos con doble-LOX nula-MMT nula son útiles en la producción de mosto y cerveza fabricados con cebada con el fin de minimizar los niveles de T2N y DMS en productos de cerveza frescos y envejecidos.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** presenta vistas simplificadas de las rutas bioquímicas de cebada que conducen a la formación de T2N (**A**), y SMM (**B**). Las enzimas ausentes en la cebada con Triple-Nula están resaltadas en recuadros negros. Las abreviaturas de las enzimas son aquellas definidas en la presente solicitud. La **FIG. 1B** muestra componentes seleccionados del ciclo de SMM en el cual el SMM es sintetizado mediante transferencia de metilo desde S-adenosilmetionina (SAM) a metionina (Met), catalizada por la enzima Met-S-metiltransferasa (MMT). El SMM puede a su vez servir como donador de metilo para la síntesis de Met a partir de homocisteína (Hcy), en una reacción catalizada por la enzima Hcy-S-metiltransferasa (HMT). La ilustración muestra cómo las reacciones esencialmente irreversibles están conectadas. Cada vuelta del ciclo es infructuoso dado que consume y después regenera dos Mets mientras que convierte ATP a adenosina, PPi y Pi (no mostrado).

La **FIG. 2** muestra los resultados de experimentos de HPLC para verificar el fenotipo MMT-nulo de la Mutante 8063 y la Mutante 14018. (**A**) Un ejemplo de la separación basada en HPLC de un extracto a partir de brotes del cv. Prestige, que muestra la elución de ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser) y SMM. Fluorescencia de extractos de brotes de cebada derivatizados con OPA fueron excitados a 340 nm y la emisión fue medida a 450 nm. (**B**) Separación basada en HPLC de extractos a partir de las mutantes indicadas y cv Sebastian tipo salvaje. La separación de componentes en un extracto mutante proveyó un cromatograma sin picos específicos de SMM.

La **FIG. 3** ilustra el flujo de trabajo a partir del cruzamiento de plantas de cebada con LOX-1-nula-LOX-2-nula (doble-LOX-nula) y MMT-nula con cebada Triple-Nula.

La **FIG. 4** resalta las actividades de LOX en muestras derivadas a partir de las plantas indicadas. Los resultados de las determinaciones de actividad de LOX total en granos de cebada maduros se muestran con barras grises, mientras que aquellos en negro indican las actividades de LOX-2 en embriones en germinación. Se observaron muy bajas actividades de LOX tanto en plantas LOX-1 nula-LOX-2 nula como en Triple-Nula.

La **FIG. 5** ilustra que las plantas Triple-Nulas germinadas no pueden sintetizar SMM (panel superior en el cual el pico correspondiente está ausente en el cromatograma de UPLC), mientras que dicho compuesto es fácilmente detectable como un pico de cromatograma correspondiente en un extracto de cebada germinada de tipo salvaje, cv. Quench (panel inferior). Se indican las posiciones de elución de los aminoácidos seleccionados.

La **FIG. 6** detalla gráficamente el flujo de trabajo de micro-malteados y micro-maceraciones (**A**), además de aquellos de malteados, maceraciones y fabricaciones de cerveza piloto, de granos a partir de cebada de tipo salvaje (**B**) y la mutante Triple-Nula (**C**). El flujo de muestras individuales (marcadas en recuadros grises) está ilustrado con flechas. Productos de partida, intermediarios y finales están marcados en tipo de fuente negrita arriba de la lista; los procesos están en tipo de fuente cursiva. En (**A**), los números en cursivas debajo de la lista de flujo se refieren a puntos de muestreo para la determinación de niveles de T2N libre y sus precursores (2 y 4), y DMSP y DMS (1, 2, 3), donde el punto 4 de medición representa mosto calentado, enfriado. Para micro-maceración de harina de cebada, las muestras fueron medidas en los puntos de medición 2, 3 y 4. En (**B**) y (**C**), los niveles de DMSP, DMS, precursor de T2N y T2N libre fueron determinados en todos los puntos de muestreo.

La **FIG. 7** muestra que la cerveza hecha de malta Triple-Nula genera alrededor de cuatro veces más espuma de cerveza que aquella de una cerveza elaborada sobre malta de cv. Quench tipo salvaje - independientemente de la cocción de mosto presurizada o normal.

La **FIG. 8** proporciona un ejemplo sobre cómo pueden ser propagados los granos de cebada mutagenizados con NaN_3 . Los granos de la generación M0 crecen como plantas que desarrollan granos de generación M1. Estos pueden ser sembrados para el desarrollo de plantas M1, las cuales producen nuevos granos de generación M2. Después, las plantas M2 crecen y establecen granos de generación M3. Los granos de generación M3 pueden dejarse germinar, por ejemplo para el análisis de coleóptilos de plantas M3 germinadas. Además, las flores derivadas a partir de granos de plantas M3 pueden ser utilizadas en cruzamientos con líneas de cebada o cultivares para obtener plantas de generación M4. Una figura similar se presenta como FIG. 1A en la solicitud de patente PCT

WO 2005/087934 de Breddam, K. y col.

La **FIG. 9** muestra una vista simplificada, esquemática, de un proceso de producción de cerveza preferido, que incluye remojar el grano de cebada (1), malteado (2), secado en horno (3), molienda de la malta seca (4), maceración (5), filtración (6), cocción de mosto en presencia de lúpulos agregados (7), fermentación en presencia de levadura (8), maduración de la cerveza (9), filtración de la cerveza (10), envasado, tal como el envasado en botellas, latas, o similares (11), y etiquetado (12). Los procesos individuales pueden ser agrupados en secciones que comprenden la producción de malta (1-3), producción de mosto (4-7), fermentación (8-9), y la preparación de la cerveza terminada (10-12). A pesar de que se ilustra un procedimiento preferido, pueden ser concebidos otros procedimientos que omitan algunas de las etapas detalladas (la filtración puede, por ejemplo, ser omitida, o pueden no agregarse los lúpulos - o pueden agregarse etapas adicionales, tales como adición de adjuntos, azúcares, jarabes, o carbonato).

La **FIG. 10** ilustra cómo identificar fragmentos de ADN derivados de LOX-1-nula en cerveza (mezcla que comprende 50% de LOX-1-nula) y muestras de mosto (Triple- Nula) producidas utilizando materiales de partida LOX-1-nulos, pero no en cerveza producida utilizando harina de una mezcla de malta normal y cebada de tipo salvaje (Tuborg). Se indica el volumen del molde de la amplificación por PCR concluyente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

En la descripción, figuras, y tablas que siguen, se utilizan distintos términos. Con el fin de proporcionar las especificaciones y reivindicaciones, que incluyen el alcance que será dado a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones:

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "un/una" puede significar uno o más, dependiendo del contexto en el cual es utilizado.

El término "rasgo agronómico" describe un rasgo fenotípico o genético de una planta que contribuye al desempeño o valor económico de dicha planta. Dichos rasgos incluyen resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, resistencia a virus, resistencia a nematodos, tolerancia a sequía, tolerancia a elevada salinidad, rendimiento, altura de la planta, días hasta madurez, graduación de granos (es decir, fraccionamiento del tamaño de grano), contenido de nitrógeno en grano y similares.

El término "cebada" en referencia al proceso de preparación de bebidas a base de cebada, tal como cerveza, particularmente cuando es utilizado para describir el proceso de malteado, significa granos de cebada. En todos los otros casos, a menos que se especifique de otro modo, "cebada" significa la planta de cebada (*Hordeum vulgare*, L.), que incluye cualquier línea o variedad de mejoramiento, mientras que parte de una planta de cebada puede ser cualquier parte de una planta de cebada, por ejemplo, cualquier tejido o células.

En el proceso de "elaboración de cerveza de cebada", el mosto es preparado mediante incubación de un extracto de una cebada no malteada con una mezcla de enzimas que hidrolizan los componentes de la cebada. Un mosto producido mediante elaboración de cerveza de cebada puede ser denominado "mosto de cebada", o mosto "elaborado con cebada".

Por "resistencia a enfermedad" se entiende que las plantas evitan síntomas de enfermedad, los cuales son el resultado de las interacciones planta-patógeno. De este modo, se evita que los patógenos causen enfermedades en la planta y los síntomas de enfermedad asociados. Alternativamente, los síntomas de enfermedad causados por el patógeno son minimizados o reducidos, o incluso evitados.

"DMSP" tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva es una abreviatura para el precursor de DMS o para potencial de DMS, es decir, las moléculas que pueden ser convertidas a DMS durante la producción de bebidas. SMM representa la mayor parte de, si no todo, el DMSP. El nivel de DMSP está definido en la presente memoria descriptiva como la cantidad de DMS que puede ser generada a partir de DMSP en el material vegetal especificado, o el producto del mismo, mediante ebullición en condiciones alcalinas durante 1 h. Tal como se define en la presente memoria descriptiva, 1 ppb de DMSP puede ser convertida en 1 ppb de DMS.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "doble LOX-nula" se refiere a una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional y una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2

funcional. Por lo tanto, una "planta de cebada con doble LOX-nula" es una planta de cebada que comprende una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional y una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional. Similarmente, los "granos con doble LOX-nula" son granos que tienen una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional y una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional.

El término "doble-LOX nula-MMT nula" se refiere a una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional y una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional y una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional. Por lo tanto, una "planta de cebada con doble-LOX nula-MMT nula" es una planta de cebada que comprende una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional y una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional y una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional. Similarmente, los "granos con doble-LOX nula-MMT nula" son granos que tienen una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional y una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional y una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional. Un ejemplo de doble-LOX nula-MMT nula útil se denomina "Triple-Nula" y se describe en los Ejemplos de la presente a continuación.

Una planta de "cereal", como se define en la presente memoria descriptiva, es un miembro de la familia de plantas Graminae, cultivada principalmente por sus semillas o granos que contienen almidón. Las plantas de cereal incluyen, pero no están limitadas a, cebada (*Hordeum*), trigo (*Triticum*), arroz (*Oryza*), maíz (*Zea*), centeno (*Secale*), avena (*Avena*), sorgo (*Sorghum*), y *Triticale*, un híbrido de centeno-trigo.

Por "codificante" o "codificado/a", en el contexto de un ácido nucleico especificado, se quiere decir que comprende la información para traducción en la proteína especificada. Un ácido nucleico o polinucleótido que codifica una proteína puede comprender secuencias no traducibles, por ejemplo, intrones, dentro de regiones traducidas del ácido nucleico, o puede carecer de dichas secuencias no traducibles intervinientes, por ejemplo, en ADNc. La información mediante la cual una proteína es codificada está especificada mediante el uso de codones.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "expresión" en el contexto de ácidos nucleicos deberá entenderse como la transcripción y acumulación de ARNm sentido o ARN antisentido derivados a partir de un fragmento de ácido nucleico. "Expresión" utilizada en el contexto de proteínas se refiere a la traducción de ARNm a polipéptido.

El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; este incluye regiones que preceden y continúan a la región codificante (promotor y terminador). Más aún, los genes vegetales generalmente consisten en exones interrumpidos por intrones. Después de la transcripción a ARN, los intrones son removidos mediante splicing para generar un ARN mensajero maduro (ARNm). Los "sitios de splicing" entre exones e intrones están típicamente determinados mediante secuencias consenso que actúan como señales de splicing para el proceso de splicing, que consiste en una delección del intrón desde el transcrito de ARN primario y una unión o fusión de los extremos del ARN remanente sobre cada lado del intrón cortado. En algunos casos, esquemas de splicing alternativos o diferentes pueden generar diferentes proteínas a partir de la misma elongación única de ADN. Un gen nativo puede ser referido como un "gen endógeno".

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "heterólogo" en referencia a un ácido nucleico es un ácido nucleico que se origina a partir de una especie foránea, o, si es de la misma especie, está sustancialmente modificado a partir de su forma nativa en composición y/o locus genómico mediante intervención humana deliberada.

El término "germinación" como se utiliza en la presente memoria descriptiva significa el comienzo de o retorno al crecimiento mediante un grano de cebada en diversas composiciones, tales como suelo normal tal como se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, un embrión en germinación es un embrión que está atravesando la germinación. La germinación también puede tener lugar en el suelo de macetas ubicadas en cámaras de crecimiento y similares, o por ejemplo puede tener lugar sobre papel de filtro ubicado en placas de Petri estándar de laboratorio o durante malteado (por ejemplo, en tanques para remojo o cajas de germinación de la fábrica de malteado). La germinación es generalmente comprendida como incluyendo hidratación de los granos, hinchazón de los granos e inducción del crecimiento del embrión. Los factores ambientales que afectan a la germinación incluyen humedad, temperatura y nivel de oxígeno. Se observa desarrollo de raíz y brote.

El término "grano" está definido comprendiendo la cariopsis del cereal, también definida como semilla interna, lema y pálea. En la mayoría de las variedades de cebada, lema y pálea se adhieren a la cariopsis y son parte del grano

después de la trilla. Sin embargo, también ocurren variedades de cebada desnuda. En éstas, la cariopsis está libre de lema y pálea y se trilla libre como en trigo. Los términos "grano" y "pepita" son utilizados intercambiamente en la presente memoria descriptiva.

"Desarrollo del grano" se refiere al período que comienza con la fertilización del huevo cigoto por una célula de polen. Durante la fertilización las reservas metabólicas - por ejemplo, azúcares, oligosacáridos, almidón, fenólicos, aminoácidos, y proteínas - son depositadas, con o sin direccionamiento a vacuola, en diversos tejidos en el endospermo del grano (pepita), testa, aleurona, y escutelo, conduciendo así al agrandamiento del grano (pepita), relleno del grano (pepita), y culminando con la desecación del grano (pepita).

El término "pérdida total de ... funcional" se refiere a la falta de una dada actividad enzimática. Por lo tanto, una planta de cebada con una pérdida total de LOX-1 y LOX-2 funcional es una planta de cebada sin actividades detectables de LOX-1 y LOX-2. En el contexto de la presente invención, las actividades de LOX-1 y LOX-2 están determinadas mediante un procedimiento de ensayo que determina la formación de 9- HPODE y 13-HPODE a partir de ácido linoleico, aun cuando las enzimas LOX-1 y LOX-2 pueden tener otras actividades. Preferentemente, la formación de 9-HPODE y 13-HPODE a partir de ácido linoleico se determina tal como se describe en el Ejemplo 4 de la patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), véase más adelante. La actividad debería ser determinada utilizando extractos de proteína de embriones germinados. En el contexto de la presente invención, la generación de un pico de cromatograma que corresponde a menos del 5%, preferentemente menos del 3% del pico de 9-HPODE del estándar mostrado en la **FIG. 5A** de la patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), y/o un pico que corresponde a menos del 5%, preferentemente menos del 3% del pico de 13-HPODE del estándar mostrado en la **FIG. 5A** de la patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), cuando se utiliza ácido linoleico como sustrato, es considerado como actividad no detectable de LOX-1 y LOX-2, cuando se utiliza el ensayo descrito en el Ejemplo 4 de la patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), véase más adelante. Los enfoques moleculares para obtener una pérdida total de LOX funcional comprenden la generación de mutaciones que causan una ausencia total de transcritos para dicha enzima, total ausencia de la enzima codificada correspondiente, o mutaciones que inactivan totalmente la enzima codificada. Similarmente, una planta de cebada con "pérdida total de MMT funcional" se refiere a la falta de la actividad enzimática MMT, es decir, una planta de cebada sin actividad de MMT detectable cuando se utiliza el ensayo descrito en el Ejemplo 2 de la presente, a continuación. Alternativamente, la actividad de MMT de una planta de cebada es determinada aislando el ADNc de MMT de dicha cebada y determinando si la proteína codificada por dicho ADNc es capaz de catalizar la transferencia de un grupo metilo desde SAM a Met, formando así SMM.

El término "actividad de LOX-1" se refiere a la actividad enzimática de la enzima LOX-1 de la cebada. Particularmente, en el contexto de la presente invención, "actividad de LOX-1" es la dioxigenación catalizada por enzima de ácido linoleico a 9- HPODE, y en un grado mucho menor 13-HPODE. Aunque la enzima LOX-1 es capaz de catalizar otras reacciones, para los efectos de determinar la actividad de LOX-1 de acuerdo con la presente invención, solamente las actividades de formación de 9- y 13- HPODE deberían ser consideradas. La **FIG. 1A** detalla la ruta bioquímica donde el ácido linoleico es convertido en 9-HPODE.

El término "actividad de LOX-2" se refiere a la actividad enzimática de la enzima LOX-2 de la cebada. Particularmente, en el contexto de la presente invención, "actividad de LOX-2" es la dioxigenación catalizada por enzima de ácido linoleico a 13- HPODE, y en un grado mucho menor 9-HPODE. Aunque la enzima LOX-2 es capaz de catalizar otras reacciones, para los efectos de determinar la actividad de LOX-2 de acuerdo con la presente invención, solamente las actividades de formación de 13- y 9- HPODE deberían ser consideradas. La **FIG. 1A** detalla la ruta bioquímica donde el ácido linoleico es convertido en 13-HPODE.

El término "bebida de malta" y el término "bebida a base de malta" se refieren a bebidas preparadas utilizando malta, preferentemente bebidas preparadas mediante un procedimiento que incluye una etapa de incubación de malta con agua caliente. Los términos se utilizan indistintamente en la presente memoria descriptiva. Las bebidas de malta pueden ser, por ejemplo, cerveza o maltinas. La cerveza de la presente solicitud puede también ser producida utilizando "elaboración de cerveza de cebada" (ver definición anteriormente mencionada).

El término "bebida de malta fermentada" se refiere a bebidas de malta, las cuales han sido fermentadas, es decir, incubadas con levadura.

"Malteado" es una forma especial de germinación de los granos de cebada que tiene lugar en condiciones ambientales controladas - incluyendo, pero no limitadas a, tanques de remojo y cajas de germinación de la fábrica de malteado. De acuerdo con el proceso de la presente invención, el malteado comienza a ocurrir durante y/o después

de que los granos de cebada han sido remojados. El proceso de malteado puede ser frenado mediante secado de los granos de cebada, por ejemplo, en un proceso de secado en horno. El secado en horno es normalmente llevado a cabo a temperaturas elevadas, pero una ventaja de la presente invención es que el secado en horno puede ser llevado a cabo a temperaturas inferiores. En caso de que la malta no haya sido secada en horno, se la denomina "malta verde". Se entiende que una composición de malta preparada a partir de cebada con doble-LOX nula-MMT nula comprende malta con doble-LOX nula-MMT nula, tal como malta pura con doble-LOX nula-MMT nula, o cualquier mezcla de malta que comprenda malta con doble-LOX nula-MMT nula. Preferentemente, dicha composición es preparada solamente a partir de malta con doble-LOX nula-MMT nula. La malta puede ser procesada, por ejemplo, mediante molienda y por lo tanto ser referida como "malta molida" o "harina".

La "maceración" es la incubación de malta molida en agua. La maceración es preferentemente llevada a cabo a una temperatura específica, y en un volumen específico de agua. La temperatura y el volumen de agua son de importancia, dado que afectan a la tasa de disminución de actividad de enzima derivada a partir de la malta, y por lo tanto, especialmente la cantidad de hidrólisis de almidón que puede ocurrir; la acción de proteasas también puede ser de importancia. La maceración puede ocurrir en presencia de adjuntos, lo cual se entiende que comprende cualquier fuente de carbohidratos distinta de la malta, tal como, pero no limitada a, cebada (incluyendo por ejemplo, cebada con doble-LOX nula-MMT nula), jarabes de cebada, o maíz, o arroz -ya sea como granos enteros o como productos procesados como polvos, jarabes o almidón. Todos los adjuntos anteriormente mencionados pueden ser utilizados principalmente como una fuente adicional de extracto (los jarabes son típicamente dosificados durante la cocción del mosto). Los requerimientos para el procesamiento del adjunto en la cervecería dependen del estado y tipo de adjunto utilizado, y en particular de las temperaturas de gelatinización y licuefacción del almidón. Si la temperatura de gelatinización está por encima de aquella de la sacarificación normal de la malta, entonces el almidón es gelatinizado y licuado antes de la adición al macerado.

El término "actividad de MMT" se refiere a la actividad enzimática de la enzima metionina S-metiltransferasa de la cebada. En el contexto de la presente invención, "actividad de MMT" es la metilación catalizada por MMT en el átomo de azufre de Met para rendir SMM. Aunque la enzima MMT puede ser capaz de catalizar otras reacciones, para los efectos de determinar la actividad de MMT de acuerdo con la presente invención, solamente la actividad de formación de SMM debería ser considerada. La **FIG. 1B** detalla las reacciones bioquímicas donde Met es convertido a SMM mediante metilación.

Las "mutaciones" incluyen delecciones, inserciones, sustituciones, transversiones, y mutaciones puntuales en las regiones codificantes y no codificantes de un gen. Las delecciones pueden ser del gen entero, o de solamente una porción del gen, donde la región no codificante preferentemente es la región promotora, o la región terminadora o intrones. Las mutaciones puntuales pueden importar cambios de una base o un par de bases, y pueden resultar en codones de terminación, mutaciones por cambio de marco o sustituciones de aminoácidos. Con referencia a la **FIG. 8** de la presente -la cual presenta una vista sobre cómo los granos de cebada mutada pueden ser propagados en un programa de mejoramiento -los granos de la generación M3, y los granos directamente propagados a partir de los mismos, o de cualquier generación posterior, incluyendo las plantas de los mismos, pueden ser denominados "mutantes de partida". Además, aún con referencia a la **FIG. 8** de la presente, el término "línea de mejoramiento" se refiere a granos de la generación M4, y cualquier generación posterior, incluyendo las plantas de los mismos, las cuales pueden ser el resultado de un cruzamiento con una planta cultivar, o el resultado de un cruzamiento con otra línea de mejoramiento con un rasgo separado, específico.

El término "LOX-nula" se refiere a la presencia de una mutación en un gen que codifica LOX, que causa una pérdida total de función de la enzima LOX codificada (ya sea LOX-1 o LOX-2 o ambas LOX-1 y LOX-2). Las mutaciones que generan codones de terminación prematura (sin sentido) en un gen que codifica LOX representan solamente un mecanismo mediante el cual se puede obtener la pérdida total de LOX funcional. Los enfoques moleculares para obtener pérdida total de LOX funcional comprenden la generación de mutaciones que causan una ausencia total de transcritos para dicha enzima, o mutaciones que causan inactivación total de la enzima codificada. "LOX-nula" con referencia a una planta se refiere a una planta que tiene una mutación que produce una pérdida total de la enzima LOX funcional.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "MMT-nula" se refiere a una pérdida total de la enzima S-adenosilmetionina:metionina S-metiltransferasa funcional (también denominada enzima metionina S-metiltransferasa). Por lo tanto, una "planta de cebada con MMT-nula" es una planta de cebada que comprende una mutación en el gen que codifica MMT que produce una pérdida total de MMT funcional. Similarmente, los granos con "MMT-nula" son granos que comprenden una mutación en el gen que codifica MMT, que produce una pérdida total de MMT funcional.

"Operativamente unido" es una expresión utilizada para hacer referencia a la asociación de dos o más fragmentos de ácido nucleico en un único polinucleótido, de modo que la función de uno está afectado por el otro. Por ejemplo, un promotor está operativamente ligado con una secuencia codificante cuando es capaz de afectar la expresión de aquella secuencia codificante, es decir que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor. Las secuencias codificantes pueden estar operativamente ligadas a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

"PCR" o "reacción en cadena de la polimerasa" es bien conocida por aquellos expertos en el arte como una técnica utilizada para la amplificación de segmentos específicos de ADN (Pat. de EEUU Nos. 4.683.195 y 4.800.159 de Mullis, K.B. y col.).

"Planta" o "material vegetal" incluye cultivos de células de plantas, protoplastos de plantas, y tejidos de células de plantas a partir de los cuales se pueden regenerar plantas de cebada - incluyendo callos de plantas, y células de plantas que están intactos en plantas, o partes de plantas, tales como embriones, polen, óvulos, flores, granos, hojas, raíces, puntas de raíces, anteras, o cualquier parte o producto de una planta. El material vegetal puede en una realización ser células de plantas a partir de las cuales no se pueden regenerar plantas de cebada.

Por el término "producto vegetal" se quiere decir un producto que resulta a partir del procesamiento de una planta o material vegetal. Dicho producto vegetal puede, por lo tanto, ser malta, mosto, una bebida fermentada o no fermentada, un alimento, o un producto alimenticio.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "recombinante" en referencia a una proteína es una proteína que se origina a partir de una especie foránea, o, si es de la misma especie, está sustancialmente modificada a partir de su forma nativa en composición mediante intervención humana deliberada.

Un "panel de especialistas en degustación de cerveza" dentro del significado de la presente solicitud es un panel de especialistas intensivamente entrenados en la degustación y descripción de los sabores de la cerveza, con especial foco en aldehídos, sabor a papel, sabor a viejo, ésteres, alcoholes superiores, ácidos grasos y componentes sulfurosos. A pesar de que existen diversas herramientas analíticas para evaluar componentes del sabor, la significancia relativa de los componentes activos del sabor es difícil de examinar analíticamente. Sin embargo, dichas propiedades complejas, pueden ser evaluadas mediante especialistas en degustación. Su continuo entrenamiento incluye la degustación y evaluación de muestras estándar de cerveza.

Por el término "sitio de splicing" se quiere decir las zonas entre exones e intrones de un gen. Por lo tanto, un sitio de splicing puede ser el límite que va desde el exón hacia el intrón (denominado un "sitio donador"), o el límite que separa intrón de exón (denominado "sitio aceptor"). Un sitio de splicing en plantas típicamente comprende secuencias consenso. El extremo 5' de un intrón, en general, consiste en un dinucleótido GT conservado (GU en el ARNm), y el extremo 3' de un intrón normalmente consiste en un dinucleótido AG conservado. El sitio de splicing 5' de un intrón por lo tanto comprende el extremo 5' de un intrón, y el sitio de splicing 3' comprende el extremo 3' de un intrón. Preferentemente, dentro del contexto de la presente invención, el sitio de splicing de un intrón es, o bien el sitio de splicing 5' que consiste en los dinucleótidos más 5' del intrón (el cual en general es GT), o bien el sitio de splicing 3' que consiste en los dinucleótidos más 3' del intrón (el cual en general es AG).

A menos que se indique de otro modo, "T2N" significa trans-2-nonenal (T2N) en la forma libre. T2N es a veces también denominado como 2-E-nonenal.

Por el término "potencial de T2N" se describen las sustancias químicas que tienen la capacidad de liberar T2N, o de ser convertidas en T2N, en una o más reacciones. En el presente contexto, el potencial de T2N está definido como la concentración de T2N liberada dentro de una solución, por ejemplo, mosto o cerveza, durante la incubación durante 2 h a 100°C, pH 4,0. En términos prácticos, la concentración inicial de T2N es determinada, después de lo cual la solución es incubada durante 2h a 100°C, pH 4,0, seguido de la determinación de la concentración de T2N. La diferencia entre la concentración inicial y final de T2N se denota como el potencial de T2N. El tratamiento térmico, ácido ocasiona la liberación de T2N a partir del potencial de T2N, por ejemplo, a partir de "aductos de T2N", el último término, utilizado para describir T2N conjugado a una o más sustancias, incluyendo, pero no limitado a proteína(s), sulfito, restos celulares, paredes celulares, o similares. En general, los aductos de T2N per se no son detectados por los humanos como sabores indeseables. Sin embargo, el T2N liberado a partir de dichos aductos de T2N puede dar origen a un sabor indeseable.

"Cultivo de tejido" indica una composición que comprende células aisladas de la misma o de diferentes tipos, o una colección de dichas células organizadas como partes de una planta - incluyendo, por ejemplo, protoplastos, callos,

embriones, polen, anteras y similares.

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "transgénico/a" incluye la referencia a una célula que ha sido modificada mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo, o que la célula está derivada de una célula así modificada. Por lo tanto, por ejemplo, células transgénicas expresan genes que no son encontrados en una forma idéntica dentro de la forma nativa de la célula, o expresan genes nativos que son de otro modo anormalmente expresados, sub-expresados, o no expresados en absoluto como resultado de la intervención humana deliberada. El término "transgénico/a" como se utiliza en la presente memoria descriptiva en referencia a plantas, particularmente plantas de cebada, no abarca la alteración de la célula mediante procedimientos de mejoramiento/cultivo tradicional de plantas - por ejemplo, mutagenia basada en NaN_3 , o mediante eventos que ocurren naturalmente sin la invención humana deliberada.

"Cebada salvaje", *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*, es considerada el progenitor de las formas cultivadas contemporáneas de la cebada. La transición de la cebada desde un estado salvaje a uno cultivado se piensa que ha coincidido con la domesticación de la planta como "variedades autóctonas de cebada". Estas son genéticamente más cercanamente relacionadas con los cultivares modernos que la cebada salvaje.

El término cebada "tipo salvaje" se refiere a una planta de cebada generada convencionalmente. Preferentemente, el término se refiere a la planta de cebada a partir de la cual las plantas de cebada de la presente invención han sido derivadas, es decir, las plantas parentales. Los granos de cebada de tipo salvaje están generalmente disponibles de, por ejemplo, compañías semilleras como "cultivares" o "variedades" - es decir, aquellos granos genéticamente similares que están listados por organizaciones nacionales de mejoramiento de plantas. A pesar de la disponibilidad de varios cultivares de cebada con LOX-1-nula (por ejemplo, cvs. Chamonix y Charmay), pero, para los fines de un mejor entendimiento de la presente invención, todas las plantas con LOX-1-nula, LOX-2-nula, doble LOX-nula y doble LOX nula-MMT nula, son consideradas en la presente memoria descriptiva plantas mutantes, y no plantas de tipo salvaje. Las notaciones "cultivar" y "variedad" son utilizadas intercambiabilmente en la presente memoria descriptiva.

Por el término "mosto" se quiere decir un extracto líquido de malta, tal como malta molida, o malta verde, o malta verde molida. En la elaboración de la cebada, el mosto puede también ser preparado incubando un extracto de cebada no malteada con una mezcla de enzimas que hidrolizan los componentes de la cebada. Además de dichos extractos derivados de malta o de cebada, el extracto líquido puede ser preparado a partir de malta y componentes adicionales, tales como material adicional que contiene almidón parcialmente convertido en azúcares fermentables. El mosto es en general obtenido mediante maceración, opcionalmente seguido de "asperjado", en un proceso de extracción de azúcares residuales y otros compuestos a partir de cebadillas después de la maceración con agua caliente. El asperjado es típicamente llevado a cabo en una cuba filtro, un filtro de maceración, u otro aparato que permita la separación del agua extraída de la cebadilla. El mosto obtenido después de la maceración es generalmente referido como "primer mosto", mientras que el mosto obtenido después del asperjado es generalmente referido como el "segundo mosto". Si no está especificado, el término mosto puede ser el primer mosto, el segundo mosto, o una combinación de ambos. Durante la producción convencional de cerveza, el mosto se hierve junto con lúpulos, no obstante la presente invención proporciona procedimientos para reducir el hervido o evitar el hervido del mosto. El mosto sin lúpulos, también puede ser referido como "mosto dulce", mientras que el mosto hervido/calentado con lúpulos puede ser referido como "mosto hervido".

Procedimientos para preparar una bebida a base de cebada

La presente invención se refiere a procedimientos para preparar una bebida a base de cebada con bajos niveles de sabores indeseables y de precursores de los mismos, donde los procedimientos implican reducido aporte de energía. Los sabores indeseables se describen a continuación, pero preferentemente los sabores indeseables son de T2N y DMS. Los procedimientos implican el uso de una planta de cebada, la cual preferentemente es una planta de cebada con doble LOX nula-MMT nula. Tales plantas de cebada se describen en mayor detalle en la presente memoria descriptiva más adelante.

De acuerdo con la presente invención, el procedimiento en general comprende una etapa de malteado de dicha planta de cebada con doble LOX nula-MMT nula, aunque en algunas realizaciones de la invención, la bebida a base de cebada es preparada utilizando cebada no malteada. El malteado se describe en mayor detalle en la sección "Malteado" en la presente memoria descriptiva más adelante.

El procedimiento comprende además una etapa de preparación de mosto mediante el macerado de una cebada con doble LOX nula-MMT nula o una malta con doble LOX nula-MMT nula o una mezcla de las mismas - opcionalmente

en presencia de adjuntos adicionales. La maceración se describe en mayor detalle en la sección "Maceración" en la presente memoria descriptiva más adelante.

El procedimiento también comprende una etapa de calentar dicho mosto opcionalmente en presencia de ingrediente(s) adicional(es), donde como máximo 4%, por ejemplo como máximo 2% del volumen de mosto es evaporado, obteniendo de este modo mosto calentado. Esta etapa se describe en mayor detalle en la sección "Mosto Caliente".

Finalmente, el procedimiento comprende procesar mosto calentado en una bebida. Esta parte del procedimiento se describe en mayor detalle en la sección "Preparación de bebidas" en la presente memoria descriptiva más adelante.

Malteado

Mediante el término "malteado" se debe entender la germinación de granos de cebada remojados en un proceso que tiene lugar en condiciones ambientales controladas – por ejemplo, como se ilustra en la **FIG. 9**, etapas 2 y 3 - seguido de una etapa de secado. Dicha etapa de secado puede ser preferentemente secado en horno de los granos germinados a temperaturas elevadas.

Antes del secado, los granos de cebada remojados y germinados son referidos como "malta verde", la cual puede también representar un producto de planta de acuerdo con la presente invención. Esta secuencia de eventos de malteado anteriormente mencionados es importante para la síntesis de numerosas enzimas que ocasionan la modificación del grano, procesos que despolimerizan principalmente las paredes celulares del endospermo muerto para movilizar los nutrientes del grano y activar otras despolimerasas. En el proceso de secado posterior, se generan sabor y color debido a reacciones químicas de amarronado (browning).

El malteado es un proceso con un elevado consumo de energía. Debido a la necesidad de elevada temperatura, en particular el secado en horno es también un proceso que consume energía. Hay diversos objetivos para el secado en horno, incluyendo en particular: (i) secado de los granos de cebada germinados; (ii) detención de la germinación; (iii) desnaturalización de lipoxigenasas con el fin de disminuir los niveles de T2N y de T2N potencial; y (iv) la generación de DMS a partir de precursores y la remoción de DMS con el fin de disminuir los niveles de DMS potencial y de DMS.

De acuerdo con la presente invención, el secado en horno puede ser llevado a cabo a baja temperatura, y aún conseguir los objetivos anteriormente mencionados. Mediante el empleo de una planta de cebada con pérdida de LOX-1 y LOX-2 funcional no hay requerimiento de desnaturalización de lipoxigenasas. Mediante el empleo de una planta de cebada con pérdida de MMT funcional, no hay requerimiento de disminución de los niveles de DMS y DMS potencial, debido a que dichos niveles son mínimos en tales plantas de cebada. En consecuencia, los granos de cebada pueden ser secados y la germinación puede ser detenida incluso a bajas temperaturas.

Así, el malteado de acuerdo con la presente invención preferentemente comprende las etapas de:

- (a) remojar cebada con doble LOX nula-MMT nula;
- (b) germinar dicha cebada; y
- (c) secar dicha cebada, preferentemente mediante secado en horno.

El remojo puede ser llevado a cabo mediante cualquier procedimiento convencional conocido para un experto en la materia. Un ejemplo no limitativo implica remojar a una temperatura en el rango de 10 a 25°C alternando condiciones en seco y en húmedo. Durante el remojo, por ejemplo, la cebada puede ser incubada húmeda en el rango de 30 min a 3 h seguido de incubación en seco durante 30 min a 3 h y opcionalmente repetir dicho esquema de incubación 2 a 5 veces. El contenido final de agua después del remojo puede, por ejemplo, estar en el rango de 40 a 50%.

La germinación puede ser llevada a cabo mediante cualquier procedimiento convencional conocido para una persona experta. Un ejemplo no limitativo implica la germinación a una temperatura en el rango de 10 a 25°C, opcionalmente con cambio de temperatura en el rango de 1 a 4 h.

Un ejemplo no limitativo de un esquema de remojo y germinación adecuados está diagramado en el Ejemplo 9 en la presente memoria descriptiva, más adelante.

El secado en horno puede ser llevado a cabo a temperaturas convencionales, tales como al menos 75°C, por

ejemplo en el rango 80 a 90°C, tal como en el rango de 80 a 85°C. En consecuencia, la malta puede, por ejemplo ser producida mediante cualquiera de los procedimientos descritos por Briggs y col. (1981) y por Hough y col. (1982). Sin embargo, cualquier otro procedimiento adecuado para producir malta puede ser también utilizado con la presente invención, tal como los procedimientos para la producción de maltas especializadas, incluyendo pero no limitados a, procedimientos de tostado de la malta. Ejemplos no limitantes se describen en los Ejemplos 6 y 8 y 9.

Preferentemente, sin embargo, dicho secado en horno es llevado a cabo a una baja temperatura, más preferentemente a una temperatura por debajo de 80°C, aún más preferentemente a una temperatura por debajo de 75°C, tal como a una temperatura por debajo de 70°C, por ejemplo a una temperatura por debajo de 65°C, tal como a una temperatura por debajo de 60°C, por ejemplo a una temperatura por debajo de 55°C, tal como a una temperatura por debajo de 50°C, por ejemplo a una temperatura por debajo de 45°C, tal como a una temperatura por debajo de 41°C. Así, se prefiere que la temperatura no se eleve por encima de 80°C, preferentemente no se eleve por encima de 75°C en ningún momento durante el secado en horno.

Con el fin de secar suficientemente los granos de cebada germinados, el tiempo de secado en horno puede aumentar si dicho secado es llevado a cabo a una baja temperatura. Preferentemente, el secado en horno es llevado a cabo durante un tiempo suficiente para reducir el contenido de agua de los granos geminados a menos del 10%, preferentemente a menos del 8%, más preferentemente a menos del 6%. Así, a una temperatura de secado en horno convencional de 85°C, el tiempo de horno puede estar en el rango de 1 a 3 h, mientras que el horneado a una temperatura en el rango de 70 a 80°C puede requerir un tiempo de horneado en el rango de 1 a 10 h; el horneado a una temperatura en el rango de 50 a 70°C puede requerir un tiempo de horneado en el rango de 3 a 50 h, mientras que el horneado a una temperatura por debajo de 50°C, por ejemplo en el rango de 40 a 50°C, puede requerir un tiempo de horneado de más de 40 h, tal como en el rango de 40 a 60 h, por ejemplo en el rango de 45 a 52 h, tal como 48 h.

En un aspecto, la invención también se refiere a composiciones de malta preparadas a partir de granos de cebada con doble LOX nula-MMT nula mediante malteado, preferentemente mediante malteado como se describe en la presente memoria descriptiva directamente precedentemente.

Dichas composiciones de malta comprenden bajos niveles de T2N y T2N potencial aun cuando se preparen a las bajas temperaturas de horneado como se describió precedentemente. En particular, dichas composiciones de malta comprenden bajos niveles de T2N potencial (y precursores de T2N).

Se ha descrito que la actividad de LOX en granos de cebada puede reducirse mediante procesos de empapado, donde la cebada puede ser sometida a elevadas temperaturas y/o tratamiento con ácido láctico. Sin embargo, tales procesos de empapado son también consumidores de energía. Adicionalmente, tal tratamiento puede tener otros efectos adversos, tal como reducir actividades enzimáticas deseables, por ejemplo, actividad de fitasa. Adicionalmente, tal tratamiento solamente reduce la actividad de LOX desde el punto en que es asumido el tratamiento de calor y por lo tanto sin efecto sobre la acumulación anterior de productos derivados de la actividad de LOX.

En una realización de acuerdo con la invención, los productos de plantas son preparados utilizando un procedimiento, donde, los granos de cebada no son sometidos a empapado a una temperatura de al menos 70°C. Se prefiere también que los productos de plantas de acuerdo con la invención sean preparados utilizando un procedimiento, donde los granos de cebada no son sometidos a empapado a una temperatura de al menos 57°C en presencia de ácido láctico.

Se prefiere que dichas composiciones de malta comprendan menos de 60%, preferentemente menos de 50%, más preferentemente menos de 40%, aún más preferentemente menos de 30%, por ejemplo menos de 20% de T2N comparado con una composición de malta preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de cv. Power o a partir de cv. Quench o a partir de cv. Rosalina.

Se prefiere adicionalmente que dichas composiciones de malta - aun cuando secadas en horno a una temperatura en el rango de 70 a 80°C - comprendan menos de 60%, preferentemente menos de 50%, más preferentemente menos de 40%, aun más preferentemente menos de 30%, más preferentemente menos de 20% de T2N comparado con una composición preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de cv. Power o a partir de cv. Quench o a partir de cv. Rosalina.

Se prefiere adicionalmente que dichas composiciones de malta - aun cuando secadas en horno a una temperatura en el rango de 50 a 70°C - comprendan menos de 60%, preferentemente menos de 50%, más preferentemente

menos de 40%, aun más preferentemente menos de 30%, más preferentemente menos de 20% de T2N comparado con una composición preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de cv. Power o a partir de cv. Quench o a partir de cv. Rosalina.

Es aún más preferido que dichas composiciones de malta -aun cuando secadas en horno a una temperatura en el rango de 40 a 50°C - comprendan menos de 60%, preferentemente menos de 50%, más preferentemente menos de 40%, aun más preferentemente menos de 30%, más preferentemente menos de 20% de T2N comparado con una composición preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de cv. Power o a partir de cv. Quench o a partir de cv. Rosalina.

En adición a los bajos niveles de T2N y T2N potencial, la malta de acuerdo con la invención también comprende bajos niveles de DMS y de precursor de DMS, aun cuando esté preparada a las bajas temperaturas de horneado descritas precedentemente.

De un modo interesante, DMS es un compuesto bastante volátil con un punto de ebullición de 37°C-38°C (Imashuku, supra), y durante la producción de malta, por ejemplo durante el secado en horno, la composición es generalmente sometida a calor, tal que cantidades sustanciales de DMS se evaporan. Sin embargo, durante el enfriado de una composición normal de malta, se puede generar más DMS a partir de precursores de DMS (DMSP). Una de las principales ventajas de la presente invención es que no se genera o se genera muy pequeña cantidad de DMSP (en particular SMM) en la composición de malta.

Han sido descritos procedimientos para reducir la concentración de DMS. Muchos de estos procedimientos dependen de un tratamiento de calor de la malta altamente consumidor de energía. Dicho tratamiento puede ser simplemente calentar la malta, por ejemplo durante el secado en horno o puede implicar la volatilización y/o remoción de DMS libre mediante la aplicación de vapor de agua. Así, el tratamiento con vapor de agua de la malta puede reducir los niveles de DMS libre en la malta, pero nuevamente representa un proceso con elevado consumo de energía. Más aún, estos procedimientos principalmente reducen el nivel de DMS libre en la malta, con solo un pequeño efecto en el nivel de SMM. En una realización, las composiciones de malta de la invención han sido sometidas solamente a un limitado tratamiento que implica volatilizar y remover DMS libre con vapor de agua, o alternativamente no han sido sometidas a tratamiento que involucre volatilización y remoción de DMS libre utilizando vapor de agua durante el secado en horno.

En una realización, se prefiere que la malta de acuerdo con la invención no haya sido tratada con sal bromato, tal como bromato de potasio o bromato de calcio.

Las composiciones de malta de la invención preferentemente comprenden como máximo 3, preferentemente como máximo 2, más preferentemente como máximo 1, aún más preferentemente como máximo 0,5, tal como como máximo 0,2 µg/g de DMS libre. Adicionalmente, se prefiere que las composiciones de malta de la invención preferentemente comprendan como máximo 2, preferentemente como máximo 1, más preferentemente como máximo 0,5 µg/g, aún más preferentemente como máximo 0,2 µg/g de DMSP. La concentración de DMSP, el cual preferentemente puede ser SMM, es aquí y en toda otra parte de este documento indicada como la concentración de DMS, que puede ser liberado a partir de dicho DMSP.

Se prefiere además que dichas composiciones de malta -aun cuando secadas en horno a una temperatura en el rango de 70 a 80°C - comprenden como máximo 2, preferentemente como máximo 1, más preferentemente como máximo 0,5 µg/g, aún más preferentemente como máximo 0,2 µg/g de DMSP (preferentemente SMM).

Se prefiere además que dichas composiciones de malta -aun cuando secadas en horno a una temperatura en el rango de 50 a 70°C - comprenden como máximo 2, preferentemente como máximo 1, más preferentemente como máximo 0,5 µg/g, aún más preferentemente como máximo 0,2 µg/g de DMSP (preferentemente SMM).

Se prefiere además que dichas composiciones de malta -aun cuando secadas en horno a una temperatura en el rango de 40 a 50°C - comprenden como máximo 2, preferentemente como máximo 1, más preferentemente como máximo 0,5 µg/g, aún más preferentemente como máximo 0,2 µg/g de DMSP (preferentemente SMM).

En otro aspecto la descripción se refiere a composiciones de malta verde que comprenden como máximo 5000, más preferentemente como máximo 2500, aún más preferentemente como máximo 1000, aún más preferentemente como máximo 500, aún más preferentemente como máximo 250, por ejemplo como máximo 150 ppb de DMSP. Se prefiere también que dichas composiciones de malta verde comprendan como máximo 200, preferentemente como máximo 150, más preferentemente como máximo 100, aún más preferentemente como máximo 50, tal como como

máximo 25 ppb de DMS libre.

Aunque el uso principal de la malta es para la producción de bebidas, ella puede ser también utilizada en otros procesos industriales, por ejemplo como una fuente de enzimas en la industria de la panificación, en la industria alimenticia como un agente saborizante o colorante, por ejemplo en la forma de malta o harina de malta o indirectamente como un jarabe de malta, etc. Así, el producto de planta de acuerdo con la invención puede ser cualquiera de los productos precedentemente mencionados.

En otro aspecto, los productos de planta de acuerdo con la invención comprenden, o aún más consisten en jarabe, tal como jarabe de cebada, o un jarabe de malta de cebada. El producto de planta puede ser también un extracto de cebada o malta.

La malta puede ser procesada adicionalmente, por ejemplo mediante molienda. Así, el producto de planta de acuerdo con la invención puede ser cualquier tipo de malta, tal como malta no procesada o malta molida, tal como harina. La malta molida y la harina de la misma comprende componentes químicos de la malta y células muertas que carecen de la capacidad de re-germinar.

Preferentemente la molienda es llevada a cabo en estado seco, es decir la malta es molida mientras se seca. De este modo, se prefiere que la malta no sea molida bajo agua.

Maceración

El procedimiento de acuerdo con la invención comprende una etapa de producir mosto macerando cebada y/o malta con doble LOX nula-MMT nula y opcionalmente adjuntos adicionales. Dicha etapa de maceración puede también comprender opcionalmente el asperjado, y en consecuencia dicha etapa de maceración puede ser una etapa de maceración que incluye una etapa de asperjado o una etapa de maceración que excluye una etapa de asperjado.

En general, la producción de mosto es iniciada mediante la molienda de la malta con doble LOX nula-MMT nula y/o de la cebada con doble LOX nula-MMT nula. Si se añaden adjuntos adicionales, estos pueden estar también molidos dependiendo de su naturaleza. Si el adjunto es un cereal, puede por ejemplo estar molido, mientras que los jarabes, azúcares y similares no estarán molidos generalmente. La molienda facilitará el acceso del agua a las partículas de grano en la fase de maceración. Durante la maceración puede continuar la despolimerización enzimática de los sustratos iniciada durante el malteado.

En la **FIG. 9**, las etapas 4 a 6 ilustran un procedimiento común para la preparación de mosto a partir de malta. En general, el mosto es preparado combinando e incubando malta molida y agua, es decir, en un proceso de maceración. Durante la maceración, la composición de malta/líquido puede ser suplementada con composiciones de adjunto ricas en carbohidratos adicionales, por ejemplo adjuntos de cebada molida, maíz o arroz. Los adjuntos de cereal no malteado usualmente contienen pocas enzimas o no activas, lo que hace importante suplementar con malta o enzimas exógenas para proporcionar las enzimas necesarias para la despolimerización de polisacáridos, etc.

Durante la maceración, la malta molida con doble LOX nula-MMT nula y la cebada molida con doble LOX nula-MMT nula -y opcionalmente adjuntos adicionales son incubados con una fracción líquida, tal como agua. La temperatura de incubación es en general mantenida constante (macerado isotérmico), o aumentada gradualmente, por ejemplo aumentada de un modo secuencial. En cualquier caso, las sustancias solubles en la malta/cebada/adjuntos son liberadas dentro de dicha fracción líquida. Una posterior filtración proporciona separación de mosto y partículas residuales sólidas, significando las últimas el "grano gastado". El mosto así obtenido puede ser designado "primer mosto". Puede agregarse líquido adicional, tal como agua, puede ser agregado a los granos gastados durante un proceso indicado como asperjado. Después del asperjado, puede obtenerse un "segundo mosto". Pueden prepararse mostos adicionales repitiendo el procedimiento. Ejemplos no limitantes de procedimientos adecuados para la preparación de mosto son descritos por Briggs y col. (supra) y Hough y col. (supra).

Se ha descrito que la actividad de LOX puede ser reducida mediante tratamiento con calor de las enzimas y que los niveles de DMS pueden ser reducidos mediante tratamiento con calor. También, se ha descrito que el mosto puede ser tratado con calor para reducir la actividad de LOX y reducir los niveles de DMS y/o que la maceración puede ser llevada a cabo a temperaturas elevadas para alcanzar el mismo objetivo. Sin embargo, el tratamiento con calor puede tener efectos adversos, tales como reducir otras actividades enzimáticas y el tratamiento con calor es además consumidor de energía. Adicionalmente, el tratamiento con calor solo reduce la actividad de lipoxigenasa y los niveles de DMS desde el punto de vista de cuándo es asumido el tratamiento con calor y entonces no afecta la

acumulación previa de productos derivados de la actividad de LOX y de precursores de DMS.

En consecuencia, en una realización se prepara un mosto utilizando un procedimiento cuando la temperatura de macerado inicial no excede los 70°C, preferentemente no excede 69°C, así por ejemplo la temperatura de macerado inicial puede estar en el rango de 30°C a 69°C, tal como en el rango de 35°C a 69°C, por ejemplo en el rango de 35°C a 65°C, tal como en el rango de 35°C a 55°C, por ejemplo en el rango de 35°C a 45°C, tal como aproximadamente 40°C. Se prefiere también que el mosto de acuerdo con la invención no ha sido sometido a temperaturas de 70°C o superior durante más de 25 min, preferentemente no más de 20 min, y que el mosto no ha sido sometido a temperaturas de 78°C o más, durante más de 20 min, preferentemente no más de 15 min, más preferentemente no más de 10 min durante la maceración. Si las temperaturas de maceración son demasiado elevadas, esta propiedad afectará las actividades enzimáticas en el macerado y pueden reducir, o aún abolir, actividades enzimáticas deseables, lo cual resultará en una cualidad alterada del mosto. Se prefiere adicionalmente que el mosto de acuerdo con la invención no haya sido sometido a temperaturas de 65°C o superiores durante más de 100 min, preferentemente no más de 90 min, más preferentemente no más de 80 min, aún más preferentemente no más de 70 min durante la maceración.

En una realización preferida, la temperatura durante la maceración no excede 80°C, preferentemente no excede 78°C.

Un ejemplo no limitativo de una maceración adecuada es:

(1) macerar a una temperatura en el rango de 35-45°C, tal como aproximadamente 40°C, en el rango de 10 a 30 min, tal como aproximadamente 20 min;

(2) calentar a una temperatura en el rango de 60 a 70°C, preferentemente en el rango de 60 a 65°C, tal como aproximadamente 65°C, en el rango de 30 a 90 min, preferentemente en el rango de 45 a 75 min, tal como aproximadamente 60 min;

(3) calentar a una temperatura en el rango de 70 a 80°C, preferentemente en el rango de 75 a 78°C, tal como aproximadamente 78°C, en el rango de 5 a 15 min, tal como aproximadamente 10 min.

Otro ejemplo no limitativo de maceración adecuada es:

(4) macerar a una temperatura en el rango de 55-65°C, tal como aproximadamente 60°C, en el rango de 10 a 30 min, tal como aproximadamente 20 min;

(5) calentar a una temperatura en el rango de 60 a 70°C, preferentemente en el rango de 60 a 65°C, tal como aproximadamente 65°C, en el rango de 30 a 90 min, preferentemente en el rango de 45 a 75 min, tal como aproximadamente 60 min;

(6) calentar a una temperatura en el rango de 70 a 80°C, preferentemente en el rango de 75 a 78°C, tal como aproximadamente 78°C, en el rango de 5 a 15 min, tal como aproximadamente 10 min.

Como se mencionó precedentemente, la composición de mosto puede ser preparada mediante la maceración de plantas de cebada con doble LOX nula-MMT nula, o partes de las mismas, tal como granos no malteados con doble LOX nula-MMT nula, en particular granos no malteados con doble LOX nula-MMT nula molidos, o partes de los mismos. Los granos de cebada no malteados carecen o contienen solo una limitada cantidad de enzimas beneficiosas para la producción de mosto, tal como enzimas capaces de degradar paredes celulares o enzimas capaces de despolimerizar almidón a azúcares. Así, en la realización de la invención donde se utiliza doble LOX nula-MMT nula no malteada para macerar, se prefiere que se agreguen al macerado una o más enzimas externas adecuadas para la fabricación de cerveza. Enzimas adecuadas pueden ser lipasas, enzimas que degradan almidón (por ejemplo amilasas), glucanasas, [preferentemente (1-4)- y/o (1-3,1-4)-β-glucanasa], y/o xilanasas (tal como arabinoxilanasas), y/o proteasas, o mezclas de enzimas que comprenden una o más de las enzimas anteriormente mencionadas, por ejemplo Cereflo, Ultraflo, o Ondea Pro (Novozymes). Un procedimiento para producir una bebida a partir de mosto preparado a partir de cebada no malteada pueden ser también referido como "fabricación de cerveza de cebada" y la composición de mosto del mismo como "mosto de cebada", o mosto de "fabricación de cerveza de cebada".

La composición de mosto puede ser también preparada mediante el uso de una mezcla de plantas de cebada malteada o no malteada con doble LOX nula-MMT nula, o partes de las mismas, en cuyo caso una o más enzimas adecuadas pueden ser agregadas durante la preparación. Más específicamente, la cebada de la invención puede utilizarse junto con malta en cualquier combinación para la maceración – con o sin enzimas externas para fabricar cerveza - tal como, pero no limitado a, las proporciones de cebada:malta = aproximadamente 100: 0, o aproximadamente 75:25, o aproximadamente 50:50, o aproximadamente 25:75.

En otra realización de la invención, se prefiere que no se agreguen enzimas externas, en particular que no se agreguen proteasas externas, y/o celulasas externas, y/o α -amilasas externas y/o β -amilasa externas y/o α -amilasa maltogénica externa, antes o durante la maceración.

El mosto obtenido después de la maceración puede también ser referido como "mosto dulce". En procedimientos convencionales, el mosto dulce es hervido con o sin lúpulo, el que puede ser referido como mosto hervido.

El término "aproximadamente" como se utiliza en la presente memoria descriptiva significa $\pm 10\%$, preferentemente $\pm 5\%$, aún más preferentemente $\pm 2\%$.

Calentamiento del mosto

El procedimiento para preparar una bebida a base de cebada de acuerdo con la presente invención implica una etapa de calentar el mosto obtenido después de la etapa de maceración descrita en la presente memoria descriptiva anteriormente en la sección "Maceración".

Es una ventaja de la presente invención que las bebidas a base de cebada con bajos niveles de sabores indeseables y precursores de los mismos - en particular T2N y DMS y precursores de los mismos - pueden ser preparadas sin el requerimiento de extenso calentamiento del mosto.

En la fabricación de cerveza convencional, el mosto es generalmente hervido durante una extensa longitud de tiempo. El hervido del mosto tiene diversos objetivos, en particular: (i) inactivación de enzimas; (ii) coagulación de proteína; (iii) esterilización del mosto; (iv) extracción de compuestos del lúpulo; (v) isomerización de α -ácidos; (vi) conversión de DMSP a DMS; y (vii) evaporación de DMS y T2N.

Varios de estos objetivos pueden alcanzarse sin cocción extendida. Así, la esterilización solo requiere un breve hervido o calentamiento. La extracción de compuestos de lúpulo puede ser también hecha durante un breve hervido o calentamiento. Los α -ácidos pre-isomerizados están disponibles comercialmente y pueden ser agregados al mosto.

Empleando una planta de cebada con pérdida funcional de LOX-1 y LOX-2 no hay un requerimiento de desnaturalización de LOXs. Adicionalmente, el requerimiento de reducción de los niveles de T2N es también abolido mediante el empleo de plantas de cebada con pérdida de LOX-1 y LOX-2 funcionales. Empleando una planta de cebada con pérdida de MMT funcional, no hay tampoco un requerimiento de disminuir los niveles de DMS y DMS potencial, dado que dicho niveles son ínfimos en tales plantas de cebada. Adicionalmente, los granos de cebada pueden ser secados y la germinación puede ser detenida aún a bajas temperaturas.

Se ha intentado reducir el consumo de energía durante la cocción del mosto mediante diversos medios, por ejemplo reduciendo la evaporación hasta tan sólo 3% combinado con un proceso de depuración (stripping) extrayendo compuestos volátiles no deseados dentro de vapor de agua. Sin embargo, la generación de vapor de agua es también un proceso que consume energía.

Se ha intentado también preparar mosto sin la clásica cocción del mosto. Sin embargo, estos procedimientos en general utilizan temperaturas elevadas de hasta 95°C durante la maceración así como la extracción del mosto con vapor de agua, considerados así procesos con elevado consumo de energía.

El presente procedimiento proporciona la posibilidad de evaporación reducida, y preferentemente aun en ausencia de un proceso de depuración con vapor de agua. Así, de acuerdo con los procedimientos de la presente invención el mosto es calentado de un modo que es evaporado como máximo 4%, preferentemente como máximo 3%, aún más preferentemente como máximo 2%, aún más preferentemente como máximo 1,5%, aún más preferentemente como máximo 1%, aún más preferentemente como máximo 0,5%, aún más preferentemente como máximo 0,1%, tal como como máximo 0,01% del volumen de mosto. Aún más preferentemente la evaporación reducida anteriormente mencionada es llevada a cabo en ausencia de tratamiento con vapor del mosto. Se prefiere también que la evaporación reducida anteriormente mencionada sea llevada a cabo en ausencia de depuración del mosto, por ejemplo con vapor de agua.

La evaporación reducida puede ser alcanzada calentando mosto en un contenedor esencialmente cerrado o preferentemente en un contenedor cerrado.

Se prefiere además que no se lleve a cabo una evaporación extensiva del líquido en cualquiera de las otras etapas del procedimiento. Una realización preferida de la presente invención en consecuencia se refiere a procedimientos para preparar bebidas a base de cebada con bajos niveles de uno o más sabores indeseables y precursores de los mismos (preferentemente T2N y DMS y precursores de los mismos), donde el procedimiento implica un reducido aporte de energía, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (i) proporcionar una planta de cebada o parte de la misma, donde dicha planta de cebada comprende:
 - (a) una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional; y
 - (b) una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional; y
 - (c) una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional;
- (ii) opcionalmente maltear al menos parte de dicha cebada, obteniendo de este modo cebada malteada;
- (iii) macerar dicha cebada y/o cebada malteada y opcionalmente adjuntos adicionales, obteniendo así un mosto;
- (iv) calentar dicho mosto opcionalmente en presencia de ingrediente(s) adicional(es);
- (v) procesar dicho mosto calentado hasta una bebida;

donde como máximo 4%, por ejemplo como máximo 3%, tal como como máximo 2%, por ejemplo como máximo 1,5%, tal como como máximo 1% del volumen de líquido es evaporado durante el procedimiento después de completar la etapa (ii), o aún después de completar la etapa (iv) anterior, preparando de este modo una bebida derivada de cebada con bajos niveles de uno o más sabores indeseables y precursores de los mismos.

Se prefiere que la etapa (iv) descrita en la presente memoria descriptiva anteriormente sea llevada a cabo con el mosto en un contenedor esencialmente cerrado, tal como un contenedor cerrado.

Preferentemente el líquido/mosto/bebida es calentado a una temperatura por encima de 80°C durante como máximo 30 min, más preferentemente durante como máximo 20 min, preparando de este modo una bebida derivada de cebada con bajos niveles de uno o más sabores indeseables y precursores de los mismos.

Preferentemente, dicho líquido/mosto/bebida es calentado a una temperatura en el rango de 80 a 99,8°C, preferentemente a una temperatura en el rango de 80 a 99,5°C, tal como una temperatura de 80 a 99°C, aún más preferentemente a una temperatura en el rango de 90 a 99°C, aún más preferentemente a una temperatura en el rango de 95 a 99°C durante como máximo 30 min, preferentemente como máximo 20 min, tal como en el rango de 10 a 30 min, por ejemplo en el rango de 10 a 20 min durante dicho procedimiento.

El primer, segundo y demás mostos pueden ser combinados, y posteriormente sometidos a calentamiento o cada clase individual o mosto puede ser calentado. De acuerdo con los procedimientos de la invención, el mosto no debe ser necesariamente hervido. El mosto no hervido, tanto un primer mosto puro o un mosto combinado, es también referido como "mosto dulce"; después de hervido puede ser referido como "mosto hervido". Si el mosto está destinado a ser utilizado en la producción de cerveza, el lúpulo es frecuentemente agregado antes de ebullición.

En los procedimientos de fabricación de cerveza tradicionales, el mosto es hervido durante un largo tiempo, en general en el rango de 60 min a 120 min, con el fin de evaporar al menos 5% y algunas veces aún hasta el 25% del volumen del mosto. Sin embargo, el hervido extendido es indeseable por un número de otras razones, por ejemplo debido a que un hervido extendido requiere un pronunciado suministro de energía.

De acuerdo con la presente invención, mosto con bajos niveles de T2N, T2N potencial, DMS y DMSP puede ser producido a partir de cebada con doble LOX nula-MMT nula aún con hervido extendido. Así, el mosto es hervido preferentemente durante como máximo 30 min, más preferentemente durante como máximo 15 min, aún más preferentemente durante como máximo 10 min, aún más preferentemente durante como máximo 5 min, aún más preferentemente durante como máximo 1 min, aún más preferentemente el mosto no es hervido en absoluto. Se prefiere además que después de completarse la etapa ii) del procedimiento de acuerdo con la invención el líquido/mosto/bebida sea hervido durante como máximo 30 min, más preferentemente durante como máximo 15 min, aún más preferentemente durante como máximo 10 min, aún más preferentemente durante como máximo 5 min, aún más preferentemente durante como máximo 1 min, aún más preferentemente el líquido/mosto/bebida no es hervido en absoluto. Preferentemente, el calentamiento del mosto es llevado a cabo en un contenedor esencialmente cerrado, preferentemente en un contenedor cerrado.

En este contexto el término "hervir" significa llevar el líquido o el mosto o la bebida a una temperatura a la cual el agua se evapora. En consecuencia, a presión normal hervir significa llevar el líquido acuoso, tal como mosto a 100°C o levemente por encima.

Así se prefiere entonces que el mosto sea mantenido a una temperatura de al menos 100°C durante como máximo 30 min, más preferentemente durante como máximo 15 min, aún más preferentemente durante como máximo 10 min, aún más preferentemente durante como máximo 5 min, aún más preferentemente durante como máximo 1 min, aún más preferentemente el mosto no es calentado a una temperatura de al menos 100°C en absoluto.

Adicionalmente, se prefiere que después de completarse la etapa (ii) del procedimiento de acuerdo con la invención el líquido/mosto/bebida sea mantenido a una temperatura de al menos 100°C durante como máximo como máximo 30 min, más preferentemente durante como máximo 15 min, aún más preferentemente durante como máximo 10 min, aún más preferentemente durante como máximo 5 min, aún más preferentemente durante como máximo 1 min, aún más preferentemente el líquido/mosto/bebida no es calentado a una temperatura de al menos 100°C.

Es también preferido que el procedimiento completo de preparación de bebidas a base de cebada de acuerdo con la invención en ningún momento implique calentar a una temperatura de más de 99,8°C, preferentemente 99,5°C, aún más preferentemente 99°C.

Preferentemente el procedimiento puede comprender una etapa de calentar mosto a una temperatura de como máximo 99,8°C, tal como como máximo 99,5°C, por ejemplo como máximo 99°C, tal como como máximo 98°C durante una limitada cantidad de tiempo. Dicha limitada cantidad de tiempo es preferentemente como máximo 30 min, más preferentemente como máximo 15 min, aún más preferentemente como máximo 10 min.

Por lo tanto, se prefiere que el mosto sea calentado a una temperatura por encima de 80°C, preferentemente en el rango de 80 a 99,8°C, tal como en el rango de 80 a 99,5°C, por ejemplo en el rango de 80 a 99°C, aún más preferentemente a una temperatura en el rango de 90 a 99°C, aún más preferentemente a una temperatura en el rango de 95 a 99°C durante como máximo 30 min, preferentemente como máximo 20 min, tal como en el rango de 10 a 30 min, por ejemplo durante un rango de 10 a 20 min.

Además, se prefiere que el mosto no esté sometido a (por ejemplo lavado con CO₂) posteriormente a hervir el mosto y antes de la fermentación.

Mosto

En otro aspecto, la descripción se refiere a tipos de productos de plantas, los cuales son composiciones de mosto. Dichas composiciones de mosto son preferentemente preparadas partir de composiciones de malta derivadas de granos con doble LOX nula-MMT nula. Dichas maltas pueden ser preparadas a partir de granos con doble LOX nula-MMT nula, o mezclas que comprenden otros granos también. La descripción también se refiere a composiciones de mosto preparadas utilizando cebada con doble LOX nula-MMT nula, o partes de la misma, tal como malta verde, sola o mezclada con otros componentes.

Las composiciones de mosto son preferentemente preparadas mediante maceración como se describió en la presente memoria descriptiva anteriormente en la sección "Maceración". Adicionalmente, las composiciones de mosto pueden haber sido calentadas como se describe en la presente memoria descriptiva precedentemente en la sección "Calentamiento del mosto".

Se prefiere que dichas composiciones de mosto preferentemente comprendan menos de 60%, más preferentemente menos de 50%, aún más preferentemente menos de 40% de T2N potencial comparado con una composición de mosto preparada del mismo modo a partir de una cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o cv. Rosalina.

Dicho mosto puede ser el primero, y/o el segundo, y/o mostos siguientes y/o mezclas de los mismos. La composición de mosto puede ser mosto dulce, mosto calentado, o una mezcla de los mismos. El mosto calentado es preferentemente calentado como se describió en la sección "Calentamiento del mosto" en la presente memoria descriptiva anteriormente. La composición de mosto puede ser también mosto de cebada. En general, una composición de mosto contiene un elevado contenido de nitrógeno de amina y carbohidratos fermentables, siendo los últimos principalmente maltosa.

El mosto puede ser mosto dulce en una realización, es decir mosto que no ha sido sometido a tratamiento de calor. Dicho mosto dulce preferentemente comprende menos de 60%, más preferentemente menos de 50% de T2N potencial comparado con una composición de mosto preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o cv. Rosalina. Si dicho mosto ha sido preparado a partir de malta que fue secada en horno (kiln) a bajas temperaturas el mismo puede aún comprender menos T2N potencial. Así en realizaciones donde dicho mosto dulce ha sido preparado a partir de malta, la que ha sido secada en horno (kiln) a

una temperatura en el rango de 50 a 70°C, entonces dicho mosto dulce puede comprender preferentemente menos de 50%, aún más preferentemente menos de 45%, tal como menos de 40% de T2N potencial comparado con una composición de mosto preparado del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power. En realizaciones donde dicho mosto dulce ha sido preparado a partir de malta, la cual ha sido secada en

5 horno a una temperatura en el rango de 40 a 50°C, entonces dicho mosto dulce puede comprender preferentemente menos de 50%, aún más preferentemente menos de 40%, aún más preferentemente menos de 30% de T2N potencial comparado con una composición de mosto preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Quench o cv. Rosalina.

10 Dicho mosto dulce preferentemente comprende también bajos niveles de DMSP, preferentemente menos de 150 µg/l, más preferentemente menos de 100 µg/l, aún más preferentemente menos de 50 µg/l, aún más preferentemente menos de 30 µg/l, aún más preferentemente menos de 20 µg/l, aún más preferentemente menos de 15 µg/l de DMSP (preferentemente SMM). Aún si dicho mosto ha sido preparado a partir de malta que fue secada en horno a bajas temperaturas el mismo aún comprende bajos niveles de DMSP. Así en realizaciones donde dicho

15 mosto dulce ha sido preparado a partir de malta, la cual ha sido secada en horno a una temperatura en el rango de 50 a 70°C, entonces dicho mosto dulce puede comprender preferentemente menos de 150 µg/l, más preferentemente menos de 100 µg/l, aún más preferentemente menos de 50 µg/l, aún más preferentemente menos de 30 µg/l, aún más preferentemente menos de 20 µg/l, aún más preferentemente menos de 15 µg/l de DMSP. En realizaciones donde dicho mosto dulce ha sido preparado a partir de malta, la cual ha sido secada en horno a una

20 temperatura en el rango de 40 a 50°C, entonces dicho mosto dulce puede comprender preferentemente menos de 150 µg/l, más preferentemente menos de 100 µg/l, aún más preferentemente menos de 50 µg/l, aún más preferentemente menos de 30 µg/l, aún más preferentemente menos de 20 µg/l, aún más preferentemente menos de 15 µg/l de DMSP.

25 Preferentemente, dicho mosto dulce también comprende bajos niveles de DMS, preferentemente menos de 90 µg/l, aún más preferentemente menos de 50 µg/l, aún más preferentemente menos de 30 µg/l, aún más preferentemente menos de 20 µg/l de DMS.

El mosto puede ser también mosto que ha sido tratado con calor por un tiempo corto, tal como a una temperatura en

30 el rango de 95 a 99,8°C o en el rango de 95 a 99°C durante un rango de 10 a 30 min. En este caso dicho mosto comprende preferentemente como máximo 60%, más preferentemente como máximo 50%, aún más preferentemente como máximo 45%, más preferentemente como máximo 40% de T2N potencial comparado con una composición de mosto preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o cv Rosalina. Dicho mosto también preferentemente comprende como máximo 150 µg/l, más

35 preferentemente menos de 100 µg/l, aún más preferentemente menos de 50 µg/l, aún más preferentemente menos de 30 µg/l, aún más preferentemente menos de 20 µg/l, aún más preferentemente menos de 15 µg/l de DMSP. Dicho mosto también preferentemente comprende lo sumo 150 µg/l, más preferentemente menos de 100 µg/l, aún más preferentemente menos de 50 µg/l, aún más preferentemente menos de 30 µg/l, aún más preferentemente menos de 20 µg/l de DMS.

40 El mosto puede ser también mosto calentado (preferentemente calentado como se describe en la presente memoria descriptiva anteriormente en la sección "Calentamiento del mosto") en cuyo caso el mosto preferentemente comprende como máximo 60%, más preferentemente como máximo 50%, aún más preferentemente como máximo 40% de T2N potencial comparado con una composición de mosto preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power.

45

Dicho mosto calentado preferentemente también comprende bajos niveles de DMSP, preferentemente menos de 150 µg/l, más preferentemente menos de 100 µg/l, aún más preferentemente menos de 50 µg/l, aún más preferentemente menos de 30 µg/l, aún más preferentemente menos de 20 µg/l, aún más preferentemente menos de 15 µg/l de DMSP. En realizaciones donde dicho mosto enfriado ha sido preparado a partir de malta, la cual ha sido secada en horno a una temperatura en el rango de 50 a 70°C, entonces dicho mosto dulce puede comprender preferentemente menos de 150 µg/l, más preferentemente menos de 100 µg/l, aún más preferentemente menos de 50 µg/l, aún más preferentemente menos de 30 µg/l, aún más preferentemente menos de 20 µg/l, aún más preferentemente menos de 15 µg/l de DMSP. Aún en realizaciones en dicho mosto enfriado ha sido preparado a

50 partir de malta, la cual ha sido secada en horno a una temperatura en el rango de 40 a 50°C, entonces dicho mosto dulce puede preferentemente comprender menos de 150 µg/l, más preferentemente menos de 100 µg/l, aún más preferentemente menos de 50 µg/l, aún más preferentemente menos de 30 µg/l, aún más preferentemente menos de 20 µg/l, aún más preferentemente menos de 15 µg/l de DMSP. Dicho mosto calentado preferentemente también comprende bajos niveles de DMS, preferentemente menos de 30 µg/l, más preferentemente menos de 20 µg/l de DMSP.

55

60

El mosto puede ser también mosto calentado (preferentemente calentado como se describe en la presente memoria descriptiva anteriormente en la sección "Calentamiento del mosto"), el cual posteriormente ha sido enfriado (referido aquí también como mosto enfriado) en cuyo caso el mosto preferentemente comprende como máximo 60%, más preferentemente como máximo 50%, aún más preferentemente como máximo 40% de T2N potencial comparado con una composición de mosto preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o cv. Rosalina. En realizaciones donde dicho mosto enfriado ha sido preparado a partir de malta, la cual ha sido secada en horno a una temperatura en el rango de 40 a 50°C, entonces dicho mosto dulce puede preferentemente comprender menos de 50%, aún más preferentemente menos de 40%, aún más preferentemente menos de 30% de T2N potencial comparado con una composición de mosto preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o cv. Rosalina.

Dicho mosto enfriado preferentemente también comprende bajos niveles de DMSP, preferentemente menos de 90 µg/l, aún más preferentemente menos de 50 µg/l, aún más preferentemente menos de 30 µg/l, aún más preferentemente menos de 20 µg/l, aún más preferentemente menos de 15 µg/l DMSP. Dicho mosto enfriado preferentemente también comprende bajos niveles de DMS, preferentemente menos de 90 µg/l, aún más preferentemente menos de 50 µg/l, aún más preferentemente menos de 30 µg/l, aún más preferentemente menos de 20 µg/l de DMS.

En una realización específica la composición de mosto es un mosto de cebada, tal como mosto de cebada calentado, es decir mosto preparado incubando granos no malteados con doble LOX nula-MMT nula (y preferentemente molidos) con agua, preferentemente mediante macerado y asperjado. Tal mosto de cebada está caracterizado por extremadamente bajos niveles de T2N y T2N potencial. Se prefiere que dicho mosto de cebada comprenda menos de 50%, más preferentemente menos de 40%, aún más preferentemente menos de 30% de T2N potencial comparado con una composición de mosto de cebada preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power. Es también preferido que dicho mosto de cebada preferentemente comprenda menos de 50%, más preferentemente menos de 40%, aún más preferentemente menos de 30% de precursor de T2N comparado con una composición de mosto de cebada preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o cv. Quench o cv. Rosalina.

Bebidas

La presente invención se refiere a bebidas a base de cebada preparadas a partir de cebada con doble LOX nula-MMT nula. Dichas bebidas pueden en una realización preferida ser bebidas de malta, aún más preferido bebidas fermentadas, tal como bebidas de malta fermentada, preferentemente bebidas alcohólicas, tal como cerveza, donde dicha bebida es preparada utilizando cebada con doble LOX nula-MMT nula, o partes de la misma. Entonces, en una realización preferida de la invención, la bebida se prepara preferentemente mediante fermentación de cebada con doble LOX nula-MMT nula, o partes de la misma, o extractos de la misma, por ejemplo por fermentación de mosto a partir de malta con doble LOX nula-MMT nula, sola o en combinación con otros ingredientes.

En una realización preferida de la invención, la bebida anteriormente mencionada es preparada mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una planta de cebada o parte de la misma, donde dicha planta de cebada comprende:
 - (a) una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional; y
 - (b) una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional; y
 - (c) una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional;
- (ii) opcionalmente maltear al menos parte de dicha cebada, obteniendo de este modo cebada malteada;
- (iii) macerar dicha cebada y/o cebada malteada y opcionalmente adjuntos adicionales, obteniendo de este modo un mosto;
- (iv) calentar dicho mosto opcionalmente en presencia de ingrediente(s) adicional(es), donde como máximo el 4% del volumen de mosto es evaporado, obteniendo de este modo mosto calentado;
- (v) procesar dicho mosto calentado hasta una bebida.

Sin embargo, en otra realización la invención se refiere a cualquier bebida a base de cebada preparada a partir de cebada con doble LOX nula-MMT nula. Así, la invención también se refiere a bebidas a base de cebada preparadas a partir de cebada con doble LOX nula-MMT nula utilizando procedimientos convencionales, tales como procedimientos convencionales de fabricación de cerveza.

En algunas realizaciones, la bebida es una bebida no fermentada, por ejemplo mosto, preferentemente mosto

preparado a partir de malta doble LOX nula-MMT nula.

También está comprendido dentro de la presente invención que dicha bebida sea preparada a partir de plantas de cebada no malteadas, preferentemente plantas de cebada no malteadas con doble LOX nula-MMT nula, o partes de las mismas, por ejemplo mediante la fabricación de cerveza de cebada.

La bebida puede ser una bebida no alcohólica, tal como cerveza no alcohólica u otros tipos de bebidas no alcohólicas, tales como bebidas de malta no alcohólicas, tal como maltina.

Preferentemente, sin embargo, dicha bebida es preparada a partir de una composición de malta preparada a partir de granos de cebada con doble LOX nula-MMT nula. Más preferentemente, dicha bebida es cerveza. Esta puede ser cualquier tipo de cerveza conocida por una persona experta en el arte. En una realización, la cerveza, por ejemplo una cerveza lager. La cerveza es preferentemente fabricada utilizando una composición de malta que comprende germinar cebada con doble LOX nula-MMT nula, más preferentemente dicha cerveza es fabricada utilizando una composición de malta preparada exclusivamente a partir de cebada germinada, con doble LOX nula-MMT nula. La composición de malta, sin embargo, puede también comprender otros componentes, por ejemplo otros cereales germinados o no germinados, tales como cebada de tipo salvaje, cebada con doble LOX nula-MMT nula, trigo y/o centeno, o materias primas no germinadas que comprenden azúcares, o composiciones derivadas de materias primas malteadas o no malteadas, incluyendo composiciones de jarabe. Preferentemente, sin embargo, toda cebada, tal como cebada totalmente malteada y/o no malteada y/o germinada y/o no germinada utilizada para la preparación de dicha cerveza es preferentemente cebada con doble LOX nula-MMT nula.

Por lo tanto, la invención también se refiere a procedimientos de producción de una bebida que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una composición de malta que comprende granos germinados con doble LOX nula-MMT nula;
- (ii) procesar dicha composición de malta hasta una bebida.

En una realización preferida, la bebida de acuerdo con la invención es cerveza que ha sido producida a partir de mosto preparado a partir de malta horneada (kilned) (preferentemente preparada como se describió en la presente memoria descriptiva anteriormente en la sección "Malteado"), más preferentemente mediante la maceración de dicha malta horneada (preferentemente como se describió en la presente memoria descriptiva anteriormente en la sección "Maceración"), donde dicha maceración puede también contener una etapa de asperjado. Adicionalmente, dicho mosto ha sido preferentemente calentado como se describió en la presente memoria descriptiva anteriormente en la sección "Calentamiento del mosto", aunque en ciertas realizaciones, el mosto puede ser calentado de un modo convencional mediante ebullición. La cerveza así producida puede ser también referida como "malteada" en la presente memoria descriptiva. Sin embargo, la bebida de acuerdo con la invención puede ser también preparada a partir de mosto de cebada. Tal cerveza es también referida como "cerveza de cebada".

En términos generales, las bebidas alcohólicas -tal como cerveza- pueden ser fabricadas a partir de granos de cebada malteados y/o no malteados. La malta, en adición al lúpulo y levadura, contribuye al sabor y color de la cerveza. Adicionalmente, la malta funciona como una fuente de azúcar fermentable y enzimas. Una representación esquemática de un proceso general de producción de cerveza se muestra en la **FIG. 9**, mientras que descripciones detalladas de ejemplos de procedimientos adecuados para maltear y fabricar cerveza pueden encontrarse, por ejemplo, en publicaciones de Briggs y col. (1981) y Hough y col. (1982). Están disponibles numerosos, regularmente actualizados, procedimientos para el análisis de cebada, malta y productos de cerveza, por ejemplo, pero sin limitarse a, American Association of Cereal Chemists (1995), American Society of Brewing Chemists (1992), European Brewery Convention (1998), e Institute of Brewing (1997). Es reconocido que muchos procedimientos específicos son empleados para una dada fabricación de cerveza, con las más significativas variaciones relacionadas con las preferencias de los consumidores locales. Cualquiera de tales procedimientos de producción de cerveza puede ser utilizado en la presente invención.

La primera etapa de producción de cerveza a partir de mosto preferentemente implica calentar dicho mosto como se describió en la presente memoria descriptiva anteriormente, seguido de una posterior fase de enfriado del mosto y opcionalmente descanso en remolino (whirlpool rest). Después de ser enfriado, el mosto es transferido a tanques de fermentación que contienen levadura. Preferentemente, dicha levadura es levadura para fabricación de cerveza, *Saccharomyces carlsbergensis*. El mosto fermentará durante un período de tiempo adecuado, en general en el rango de 1 a 100 días. Durante los diversos procesos de fermentación a lo largo de los días, el azúcar es convertido en alcohol y CO₂ concomitantemente con el desarrollo de algunas sustancias saborizantes.

Posteriormente, la cerveza puede ser adicionalmente procesada, por ejemplo enfriada. También puede ser filtrada y/o estacionada (lagered) -un proceso que desarrolla un agradable aroma y menos sabor a levadura. También pueden agregarse aditivos. Adicionalmente, puede agregarse CO₂. Finalmente, la cerveza puede ser pasterizada y/o filtrada, antes de ser envasada (por ejemplo embotellada o enlatada). En una realización preferida, la bebida comprende menos de 70%, preferentemente menos de 60%, más preferentemente menos de 50% de T2N potencial comparada con el T2N potencial de una bebida preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o cv. Quench o cv. Rosalina. Se prefiere también que las bebidas de acuerdo con la invención comprendan como máximo 2 ppb, más preferentemente como máximo 1,5 ppb de T2N potencial si el °P en el extracto original sobre el cual se basa la bebida está ajustado en el rango de 10 a 12°P, más preferentemente a 11°P.

En una realización preferida, la bebida comprende menos de 70%, preferentemente menos de 60%, más preferentemente menos de 50% de precursor de T2N comparado con los precursores de T2N de una bebida preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o cv. Quench o cv. Rosalina. Se prefiere también que las bebidas de acuerdo con la invención comprendan como máximo 2 ppb, más preferentemente como máximo 1,5 ppb de precursor de T2N si el °P en el extracto original sobre el cual está basada la bebida está ajustado en el rango de 10 a 12°P, más preferentemente a 11°P.

Dicha bebida -preferentemente cerveza- también comprende menos de 10 ppb de DMS.

En una realización específica, la bebida es cerveza de cebada, la cual comprende menos de 60%, preferentemente menos de 50% de T2N potencial comparado con el T2N potencial de una cerveza de cebada preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o Quench.

En otra realización específica, la bebida -preferentemente cerveza- es preparada a partir de mosto calentado, el cual ha sido solo tratado con calor durante un corto tiempo, tal como a una temperatura en el rango de 95 a 99,8°C o en el rango de 95 a 99°C durante un rango de 10 a 30 min. Preferentemente, dicho mosto calentado ha sido calentado como se describe en la presente memoria descriptiva anteriormente en la sección "Calentamiento del mosto". En realizaciones donde la bebida -preferentemente cerveza- es preparada a partir de tal mosto calentado, entonces dicha bebida -preferentemente cerveza- comprende menos de 60%, preferentemente menos de 50%, más preferentemente menos de 45% de T2N potencial comparado con el T2N potencial de una cerveza preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o cv. Quench o cv. Rosalina. En esta realización, se prefiere también que dicha bebida -preferentemente cerveza- comprenda menos de 60%, preferentemente menos de 50%, más preferentemente menos de 45% de precursor de T2N comparado con los precursores de T2N de una bebida -preferentemente cerveza- preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o cv. Quench o cv. Rosalina. En esta realización, se prefiere también que la cerveza de acuerdo con la invención comprenda como máximo 2 ppb, más preferentemente como máximo 1,5 ppb de T2N potencial. En esta realización, se prefiere además que la cerveza de acuerdo con la invención comprenda como máximo 2 ppb, más preferentemente como máximo 1,5 ppb de precursor de T2N si el °P en el extracto original sobre el cual está basada dicha bebida es ajustado en el rango de 10 a 12°P, más preferentemente a 11°P. Dicha bebida -preferentemente cerveza- también comprende menos de 10 ppb de DMS.

"Cualidades organolépticas" significa cualidades que apelan a los sentidos del gusto y del olfato humanos. Dichas cualidades son analizadas, por ejemplo, por un panel especialista en degustar cerveza. Preferentemente, dicho panel está entrenado en catar y describir sabores de cerveza, con foco especial en aldehídos, gusto a papel, gusto a viejo, ésteres, alcoholes superiores, ácidos grasos y componentes sulfurosos.

En general, el panel de degustación consistirá en un rango de 3 a 30 miembros, por ejemplo en el rango de 5 a 15 miembros, preferentemente en el rango de 8 a 12 miembros. El panel de degustación puede evaluar la presencia de diversos sabores, tales como sabores indeseables a papel, oxidado, envejecido y a pan, así como sabores de ésteres, de alcoholes superiores, de componentes de azufre y cuerpo de cerveza. En relación con la presente invención, se prefiere que los sabores indeseables a papel y/o a viejo sean particularmente reducidos, mientras que los sabores tales como aromático, de ésteres, alcohólicos/solventes, florales y/o de lúpulo pueden ser preferentemente aumentados en comparación con una bebida preparada a partir de cebada de tipo salvaje utilizando un procedimiento idéntico. Un procedimiento para determinar las "cualidades organolépticas" de una bebida es descrita en el Ejemplo 6 en la solicitud de patente internacional WO 2005/087934. Otro procedimiento para determinar las "cualidades organolépticas" de una bebida es descrita en los Ejemplos 8 y 9 en la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860). Aún otro ejemplo se describe en la presente memoria descriptiva más adelante en el Ejemplo 9. En realizaciones preferidas, las cualidades

organolépticas estables son al menos parcialmente, un resultado de bajos niveles de T2N o T2N potencial. El sabor aromático, a éster, alcohólico/solvente, floral, y/o a lúpulo puede ser preferentemente determinado como se describe en el Ejemplo 7 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288). En una realización preferida las bebidas de la invención tienen puntajes para sabor aromático, a éster, alcohólico/solvente, floral, y/o a lúpulo como se describe en la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288) en la pág. 41, línea 15 a pág. 44, línea 9.

Se prefiere que las bebidas de acuerdo con la presente invención estén caracterizadas por tener un menor gusto a papel comparado con una bebida similar preparada del mismo modo a partir de una planta de cebada de tipo salvaje (preferentemente cv. Quench o cv. Rosalina) después de almacenamiento durante al menos 1 semana en el rango de 30 a 40°C, tal como aproximadamente a 37°C. Preferentemente, dicho gusto a papel es menos de 90%, más preferentemente menos de 80%, tal como menos de 70% evaluado por un panel entrenado en degustación.

Se prefiere también que las bebidas de acuerdo con la presente invención tengan un reducido sabor a papel comparado con bebidas similares preparadas a partir de cebada de tipo salvaje después del almacenamiento a temperaturas elevadas. Cuando la propiedad de "sabor a papel" es determinada por un panel de degustación especializado, entrenado (como se describió precedentemente), un puntaje en una escala de 0 a 5 -en la cual 0 es ausente y 5 es extremo- se prefiere que las bebidas de la invención tengan uno, o preferentemente ambos de los siguientes puntajes para sabor a papel:

(i) un puntaje para sabor a papel de al menos 0,5, preferentemente al menos 0,7 menor que el puntaje para sabor a papel de una bebida preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Quench o cv. Rosalina después de incubación a 37°C durante una semana;

(ii) un puntaje para sabor a papel al menos 0,5, preferentemente al menos 0,7, más preferentemente al menos 0,8, al menos 1 más bajo que el puntaje para sabor a papel de una bebida preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Power o cv. Rosalina después de la incubación a 37°C durante dos semanas.

De manera interesante, la presente invención describe que el puntaje de sabor general de una bebida fabricada de acuerdo con la presente invención es mejorado comparada con bebidas preparadas a partir de cebada de tipo salvaje. Esto puede ser parcialmente atribuido al hallazgo de que el DMS puede enmascarar ciertos sabores deseables.

En consecuencia, se prefiere que las bebidas de la presente invención tengan un puntaje de sabor general que sea al menos 1, preferentemente al menos 1,5, más preferentemente al menos 2 más alto que el puntaje de sabor de una bebida preparada del mismo modo a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir del cv. Quench o cv. Rosalina, cuando dicha bebida ha sido preparada sin hervir el mosto correspondiente, preferentemente utilizando un calentamiento presurizado. Dicho puntaje de sabor deberá ser puntuado en una escala desde 1 a 9, donde 9 representa el mayor puntaje dado por un panel especialista en degustación de cerveza.

Se dice que una bebida tiene "cualidades organolépticas estables", cuando dicha bebida comprende muy bajos niveles de T2N libres, aún después del almacenamiento. En consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar bebidas (tal como cerveza con cualidades organolépticas estables), fabricadas utilizando una planta de cebada con doble LOX nula-MMT nula.

En consecuencia, se prefiere que las bebidas de la presente invención comprendan menos de 80%, preferentemente menos de 70%, más preferentemente menos de 65%, aún más preferentemente menos de 60% aún más preferentemente menos de 55% de T2N libre comparada con una bebida preparada de la misma manera a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de un cv. Quench o un cv. Rosalina -después de almacenamiento durante al menos 1 semana, preferentemente al menos 2 semanas, más preferentemente al menos 3 semanas, aún más preferentemente durante al menos 4 semanas a una temperatura en el rango de 30 a 40°C, preferentemente a 37°C. También se prefiere que las bebidas de la invención comprendan menos de 0,025 ppb de T2N libre después de almacenamiento durante 2 semanas a 37°C.

En otra realización específica, la bebida -preferentemente cerveza- es preparada a partir de mosto calentado, el cual ha sido tratado con calor solo por un corto tiempo, tal como una temperatura en el rango de 95 a 99°C durante un rango de 10 a 30 min. Preferentemente dicho mosto calentado ha sido calentado como se describió precedentemente en la presente memoria descriptiva en la sección "Calentamiento del mosto". En realizaciones donde la bebida -preferentemente cerveza- es preparada a partir de dicho mosto calentado, entonces dicha bebida -preferentemente cerveza- comprende menos de 80%, preferentemente menos de 70%, más preferentemente menos

de 65% de T2N libre comparada con una bebida preparada de la misma manera a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de un cv. Quench o un cv. Rosalina -después de almacenamiento durante al menos 1 semana, preferentemente al menos 2 semanas, más preferentemente al menos 3 semanas, aún más preferentemente durante al menos 4 semanas a una temperatura en el rango de 30 a 40°C, preferentemente a 37°C.

En particular, se prefiere que tales bebidas –preferentemente cerveza– preparadas a partir de dicho mosto calentado comprendan muy bajos niveles de T2N, preferentemente menos de 80%, preferentemente menos de 70%, más preferentemente menos de 65% de T2N libre comparada con una bebida preparada de la misma manera a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de un cv. Quench o un cv. Rosalina -después de almacenamiento durante 2 semanas a una temperatura en el rango de 30 a 40°C, preferentemente a 37°C en presencia de un nivel de sulfito que no excede de 10 ppm, preferentemente un nivel de sulfito en el rango de 1 a 10 ppm, más preferentemente en el rango de 1 a 8 ppm, más preferentemente en el rango de 2 a 6 ppm, aún más preferentemente en el rango de 3 a 6 ppm de sulfito.

Es también particularmente preferido que las bebidas de acuerdo con la invención -tal como cerveza, por ejemplo cerveza de cebada- comprendan muy bajos niveles de T2N, preferentemente menos de 80%, preferentemente menos de 70%, más preferentemente menos de 60%, aún más preferentemente menos de 5% de T2N libre comparada con una bebida preparada de la misma manera a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente de cv. Quench o cv. Rosalina -después de almacenamiento durante 8 semanas a 37°C.

En una realización, la descripción se refiere a una bebida, tal como cerveza, con bajos niveles de ciertos ácidos trihidroxi octadecenoicos (también denominados THAs), en particular una bebida con bajos niveles de 9,12,13-THA y 9,10,13-THA. Los THAs están caracterizados por un sabor amargo (Baur and Grosch, 1977; Baur y col., 1977), haciendo dichos compuestos indeseables en bebidas.

En consecuencia es deseable que el nivel de 9,12,13-THA y 9,10,13-THA sea tan bajo como sea posible, por ejemplo más bajo que 1,3 ppm, tal como más bajo que 1 ppm. De manera concordante, se prefiere que el nivel de 9,12,13-THA sea tan bajo como sea posible, por ejemplo más bajo que 1,3 ppm, tal como más bajo que 1 ppm. También se prefiere que el nivel de 9,10,13-THA sea tan bajo como sea posible, por ejemplo más bajo que 1,3 ppm, tal como más bajo que 1 ppm. Sin embargo, la concentración global de 9,12,13-THA y 9,10,13-THA en una bebida derivada de malta -tal como cerveza- también es dependiente de la cantidad de malta utilizada para la preparación de dicha bebida específica. Así, en general, una cerveza fuerte comprenderá más 9,12,13-THA y 9,10,13-THA que una cerveza ligera, haciendo que un mayor nivel global de 9,12,13-THA y 9,10,13-THA sea aceptable en una cerveza más fuerte. De manera concordante, se prefiere que la bebida de acuerdo con la invención comprenda un menor nivel de 9,12,13-THA y 9,10,13-THA que una bebida preparada de la misma manera a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de un cv. Power o a partir de un cv. Quench o de un cv. Rosalina. En particular, una bebida de acuerdo con la invención preferentemente tiene un nivel de 9,12,13 THA, que es como máximo 50%, preferentemente como máximo 40%, más preferentemente como máximo 30% comparado al nivel en una bebida preparada de la misma manera a partir de una cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de un cv. Power o un cv. Rosalina. Se prefiere adicionalmente que una bebida de acuerdo con la invención tenga un nivel de 9,10,13-THA, que es de como máximo 70%, preferentemente como máximo 60%, tal como como máximo 50%, por ejemplo como máximo 40% comparado al nivel en una bebida preparada de la misma manera a partir de una cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de un cv. Power o un cv. Quench o un cv. Rosalina. Tales bebidas pueden ser preparadas utilizando cebada doble LOX nula-MMT nula.

En una realización, las bebidas preparadas a partir de cebada doble LOX nula-MMT nula tienen mejorada calidad en la espuma. Esto es en particular relevante cuando la bebida es una cerveza. De manera concordante, es un objeto de la invención proporcionar bebidas, tal como cerveza, con superior calidad en la espuma. Preferentemente, las bebidas de la invención producen al menos 1,5 veces más, preferentemente al menos 2 veces más, aún más preferentemente al menos 3 veces más espuma en 60 a 80 min, preferentemente en 80 min comparada con una bebida preparada de la misma manera a partir de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de un cv. Quench. Dicha producción de espuma está determinada como se describe en el Ejemplo 8 más adelante en la presente memoria descriptiva.

Productos de plantas

Es un objeto de la presente invención proporcionar productos de planta de cebada caracterizados por bajos niveles de uno o más sabores indeseables. En particular, es un objeto de la invención proporcionar productos de plantas, preferentemente productos de planta de cebada, con bajos niveles de T2N, DMS y los correspondientes precursores de los mismos. Como se describe en la invención, tales productos de plantas pueden ser ventajosamente

preparados a partir de cebada doble LOX nula-MMT nula. Dicho producto de plantas puede ser malta, preferentemente cualquiera de las maltas descritas precedentemente en la presente memoria descriptiva en la sección "Malteado". El producto puede ser mosto, preferentemente cualquiera de los mostos descritos precedentemente en la presente memoria descriptiva en la sección "Mosto"; también puede ser una bebida, preferentemente cualquiera de las bebidas descritas precedentemente en la presente memoria descriptiva en la sección "Bebida". Sin embargo, el producto de plantas puede ser también otros productos de plantas que están caracterizados por bajos niveles de T2N, T2N potencial, DMS y DMSP preparados a partir de plantas de cebada con doble LOX nula-MMT nula, o partes de las mismas.

La presente invención se refiere así a productos de plantas, que son composiciones que comprenden las plantas de cebada descritas más adelante en la presente memoria descriptiva, o partes de las mismas, o composiciones preparadas a partir de dichas plantas de cebada, o partes de las mismas, tal como productos de plantas preparados a partir de dichas plantas de cebada, o partes de las mismas. Porque dichas plantas de cebada carecen de actividades de LOX-1, LOX-2 y MMT, las composiciones en general comprenden muy bajos niveles de sabores indeseables y sus moléculas precursoras y en particular de T2N, T2N potencial, DMS y DMSP. Se describen en la presente memoria descriptiva ejemplos de productos de plantas útiles que comprenden, o están preparados a partir de, plantas de cebada que tienen una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional, una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional y una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional.

Se prefiere que dicho producto de plantas comprenda uno o más de lo siguiente, preferentemente al menos dos de lo siguiente, aún más preferentemente todo lo siguiente:

- (i) menos de 60%, aún más preferentemente menos de 50%, aún más preferentemente menos de 40%, tal como menos de 30%, preferentemente menos de 20%, más preferentemente menos de 10%, de T2N libre;
- (ii) menos de 60%, aún más preferentemente menos de 50%, aún más preferentemente menos de 40%, tal como menos de 30%, preferentemente menos de 25% de T2N potencial;
- (iii) menos de 30%, preferentemente menos de 20%, más preferentemente menos de 15%, aún más preferentemente menos de 10% de DMS;
- (iv) menos de 30%, preferentemente menos de 20%, más preferentemente menos de 15%, aún más preferentemente menos de 10%, tal como menos de 5%, por ejemplo menos de 2% de SMM;
- (v) menos de 30%, preferentemente menos de 20%, más preferentemente menos de 15%, aún más preferentemente menos de 10% de DMSP;

comparada con un producto de plantas similar preparado de la misma manera a partir de plantas de cebada de tipo salvaje, preferentemente a partir de un cv. Power o un cv. Quench o un cv. Rosalina.

La presente invención se refiere, en un aspecto, a granos de cebada que tienen una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional, una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional y una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional. La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden dichos granos, y composiciones preparadas a partir de dichos granos, así como a productos de plantas preparados a partir de dichos granos.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a productos de plantas, que pueden ser composiciones de alimentos, composiciones para alimentación, y composiciones de materiales de partida para fragancias que comprenden plantas de cebada doble LOX nula-MMT nula, o partes de las mismas. Las composiciones de alimentos, por ejemplo, pueden ser, pero no están limitadas a, granos de cebada malteados o no malteados, cebada molida, alimentos de cebada, pan, gachas, mezclas de cereales que comprenden cebada, productos para la salud, tales como bebidas que comprenden cebada, jarabes de cebada, y composiciones de cebada en forma de hojuelas, molidas, micronizadas o extruidas. Las composiciones para alimentación, por ejemplo, incluyen composiciones que comprenden granos de cebada y/o harinas. Las composiciones para alimentación pueden por ejemplo ser puré. Las composiciones de materiales de partida para fragancias se describen más adelante en la presente memoria descriptiva.

La invención también se refiere a mezclas de varios productos de plantas de la invención. Por ejemplo, la invención se refiere a una composición preparada mediante una mezcla de:

- (i) una composición que comprende una planta de cebada, o una parte de la misma, que comprende una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional, una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional y una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional; y

(ii) una composición de malta preparada a partir de granos con doble LOX nula-MMT nula.

Diversos procedimientos están disponibles para determinar si una planta de cebada o un producto de plantas, es preparado a partir de una planta de cebada que lleva mutaciones en los genes para LOX-1, LOX-2 y MMT, que causan una pérdida total de LOX-1 funcional, una pérdida total de LOX-2 funcional y una pérdida total de MMT funcional, respectivamente. Los productos de plantas comprenderán, en general, al menos algo de ADN genómico de la planta utilizada para su producción. Así, la malta contendrá grandes cantidades de ADN genómico, pero incluso los extractos de cebada o malta, tal como mosto, pueden comprender ADN genómico o fragmentos del mismo de dicha cebada o malta. También las bebidas a base de malta, tal como cerveza, pueden comprender ADN genómico, o fragmentos del mismo de dicha planta. Mediante análisis de ADN en un producto de plantas, puede establecerse si la planta, a partir de la cual se preparó el producto de planta, lleva mutaciones en los genes LOX-1, LOX-2 y MMT, que causan una pérdida total de LOX-1 funcional, una pérdida total de LOX-2 funcional y una pérdida total de MMT funcional. Dichas mutaciones podrían, por ejemplo ser cualquiera de las mutaciones en los genes LOX-1 y LOX-2 descritos más adelante en la presente memoria descriptiva en la sección "Pérdida de LOX funcional". Dicha mutación en el gen MMT podría, por ejemplo ser cualquiera de las mutaciones en el gen MMT descrito precedentemente en la presente memoria descriptiva en la sección "Pérdida de MMT funcional". El ADN genómico puede ser analizado mediante cualquier procedimiento útil, tal como secuenciamiento o mediante procedimientos basados en amplificación, incluyendo procedimientos basados en PCR. Si se suponen mutaciones particulares en el gen LOX-1 y/o en el gen LOX-2 y/o en el gen MMT, entonces puede emplearse análisis de polimorfismo, por ejemplo análisis SNP. En relación con la determinación de una mutación en el gen LOX-1 y/o en el gen LOX-2, un ejemplo no limitativo de análisis SNP útil está descrito en la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860) en el Ejemplo 10. En relación con la determinación de una mutación en el gen MMT, un ejemplo no limitativo de análisis SNP útil está descrito en la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288) en los Ejemplos 13 y 17. La persona experta será capaz de adaptar el análisis SNP específico descrito en estos ejemplos para uso con otras mutaciones u otros materiales de partida..

Si los productos de planta mencionados precedentemente en la presente memoria descriptiva son preparados a partir de plantas de cebada, que son doble LOX nula-MMT nula, entonces la presencia vs. la ausencia de mRNA LOX-1, mRNA LOX-2 y mRNA MMT de cebada y/o proteína LOX-1, proteína LOX-2 y proteína MMT puede también ser indicativa de si dicho producto de plantas es preparado a partir de una planta de cebada doble LOX nula-MMT nula. El examen del producto de plantas puede también ser llevado a cabo mediante análisis Western Blot, u otro análisis de proteínas, o mediante RT-PCR, o mediante análisis Northern Blot, o mediante otros análisis de mRNA. Tales análisis con particularmente útiles cuando el producto de plantas es malta.

Planta de cebada

Se describen bebidas a base de cereales. Los cereales pueden por ejemplo ser seleccionados de entre el grupo que consiste en cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, sorgo, mijo, triticale, trigo sarraceno, mijo fonio y quinoa. Más preferentemente, el cereal es seleccionado de entre el grupo que consiste en cebada, trigo, centeno, avena, maíz y arroz, más preferentemente el cereal es cebada.

En consecuencia, la invención se refiere una bebida a base de cebada y plantas de cebada útiles para preparar las bebidas de la invención.

La cebada es una familia de plantas. La "Cebada salvaje", *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*, es considerada el progenitor de las formas de cebada cultivadas hoy día. Se cree que la transición de la cebada desde un estado salvaje a un estado cultivado coincidió con un cambio radical de frecuencias de alelos en numerosos loci. Los alelos raros y nuevos eventos mutacionales fueron seleccionados positivamente por los agricultores que rápidamente establecieron las nuevas características en poblaciones de plantas domesticadas, denominadas "cebadas autóctonas" (barley landraces). Estas son generalmente más íntimamente relacionadas a cultivares modernos que a la cebada salvaje. Hasta finales del siglo XIX, las cebadas autóctonas existieron como mezclas altamente heterogéneas de líneas endogámicas y segregados híbridos, incluyendo pocas plantas derivadas de cruces al azar en generaciones tempranas. La mayoría de las autóctonas fueron desplazadas en agriculturas avanzadas por cultivares de línea pura. Niveles intermedios o elevados de diversidad genética caracterizan las restantes autóctonas. Inicialmente, los cultivares de "cebada moderna" representaron selecciones a partir de autóctonas. Estas fueron después derivadas de ciclos sucesivos de cruzamientos entre líneas puras establecidas, tal como aquellas de orígenes geográficos distintos. Finalmente, el resultado fue un marcado estrechamiento de la base genética en muchas, probablemente todas, las agriculturas avanzadas. Comparados con los autóctonos, los cultivares de cebada moderna tienen numerosas propiedades mejoradas (Nevo, 1992; von Bothmer y col., 1992),

por ejemplo una o más, pero no limitadas a las siguientes: (i) granos cubiertos y desnudos; (ii) dormancia de semillas; (iii) resistencia a enfermedades; (iv) tolerancia ambiental (por ejemplo a sequía o pH del suelo); (v) cantidades de lisina u otros aminoácidos; (vi) contenido de proteínas; (vii) contenido de nitrógeno; (viii) composición de carbohidratos; (ix) contenido y composición de hordeína; (x) contenido de (1-3,1-4)- β -glucano y arabinoxilano; (xi) rendimiento; (xii) rigidez de la paja; y (xiii) altura de la planta.

Dentro de la presente invención, el término "planta de cebada" comprende cualquier planta de cebada, tal como cebadas autóctonas o cultivares de cebada moderna. Así, la invención se refiere a cualquier planta de cebada que comprende una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional, y una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional y una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional. Un ejemplo de una tal planta de cebada está descrito en los Ejemplos más adelante en la presente memoria descriptiva y denominados "Triple-Nula" o "Cebada Triple-Nula".

Sin embargo, las plantas de cebada preferidas para uso en la presente invención son cultivares de cebada moderna o líneas puras. El cultivar de cebada a ser utilizado en la presente invención puede, por ejemplo, ser seleccionado de entre el grupo que consiste en Sebastian, Quench, Celeste, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Harrington, Klages, Manley, Schooner, Stirling, Clipper, Franklin, Alexis, Blenheim, Ariel, Lenka, Maresi, Steffi, Gimpel, Cheri, Krona, Camargue, Chariot, Derkado, Prisma, Union, Beka, Kym, Asahi 5, KOU A, Swan Hals, Kanto Nakate Gold, Hakata No. 2, Kirin – choku No. 1, Kanto late Variety Gold, Fuji Nijo, New Golden, Satukio Nijo, Seijo No. 17, Akagi Nijo, Azuma Golden, Amagi Nijo, Nishino Gold, Misato golden, Haruna Nijo, Scarlett, Rosalina y Jersey preferentemente del grupo que consiste en Haruna Nijo, Sebastian, Quench, Celeste, Lux, Prestige, Saloon, Neruda y Power, preferentemente del grupo que consiste en 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 Nijo, Nishino Gold, Misato golden, Haruna Nijo, Scarlett y Jersey preferentemente del grupo que consiste en Haruna Nijo, Sebastian, Tangent, Lux, Prestige, Saloon, Neruda, Power, Quench, NFC Tipple, Barke, Class y Vintage.

En una realización de la invención, la planta de cebada es en consecuencia, un cultivar de cebada moderna (preferentemente un cultivar seleccionado de entre el grupo de cultivares de cebada listados precedentemente en la presente memoria descriptiva) que comprende una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional y una segunda mutación que produce una pérdida total de actividad LOX-2 funcional, y una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional. En esta realización, se prefiere en consecuencia que la planta de cebada no sea una cebada autóctona.

La planta de cebada puede estar en cualquier forma adecuada. Por ejemplo, la planta de cebada de acuerdo con la invención puede ser una planta de cebada viable, una planta secada, una planta homogeneizada o un grano de cebada molido. La planta puede ser una planta madura, un embrión, un grano germinado, un grano malteado, un grano malteado molido, un grano molido o similares.

Las partes de las plantas de cebada pueden ser cualquier parte adecuada de la planta, tal como granos, embriones, hojas, tallos, raíces, flores o fracciones de los mismos. Una fracción puede, por ejemplo, ser una sección de un grano, embrión, hoja, tallo, raíz o flor. Las partes de plantas de cebada pueden también ser una fracción de un homogeneizado o una fracción de una planta de cebada o grano molidos.

En una realización, las partes de plantas de cebada pueden ser células de dicha planta de cebada, tal como células viables que pueden ser propagadas in vitro en cultivos de tejidos. En otras realizaciones, sin embargo, las partes de las plantas de cebada pueden ser células viables que no son capaces de madurar en una planta de cebada entera, es decir células que no son material reproductivo.

Pérdida de LOX funcional

La presente invención se refiere a plantas de cebada -o partes de la misma, o productos de plantas de la misma- que tienen una primera, una segunda mutación y una tercera mutación, donde la primera mutación conduce a una pérdida total de LOX-1 funcional, y la segunda mutación conduce a una pérdida total de LOX-2 funcional. La tercera mutación conduce a una pérdida total de MMT funcional como se describe en mayor detalle en la sección "Pérdida de MMT funcional" más adelante en la presente memoria descriptiva.

La pérdida total de LOX-1 funcional y la pérdida total de LOX-2 funcional pueden independientemente estar basadas en diferentes mecanismos. Por ejemplo, la pérdida total de función de una o ambas actividades de LOX-1 y LOX-2

puede ser causada por mal funcionamiento de proteínas en la planta de cebada, es decir, mal funcionamiento de proteína LOX-1 y/o LOX-2, tal como proteína LOX-1 mutada sin actividad de formación de 9-HPODE detectable (donde 9-HPODE preferentemente puede ser determinada según lo descrito en el Ejemplo 4 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), véase más adelante), y/o una proteína LOX-2 mutada sin actividad de formación de 13-HPODE detectable (donde 13-HPODE preferentemente puede ser determinada según lo descrito en el Ejemplo 4 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), véase más adelante).

La pérdida total de LOX-1 y/o LOX-2 funcional puede ser causada por la carencia de proteína LOX-1 y/o LOX-2. Aparentemente la carencia de proteína LOX-1 conducirá a la pérdida de LOX-1 funcional, y la carencia de proteína LOX-2 conducirá a la pérdida total de LOX-2 funcional. En consecuencia, la planta de cebada puede preferentemente comprender nada -o sólo muy poco, más preferentemente no detectable- proteína LOX-1 y/o LOX-2. La(s) proteína(s) LOX-1 y/o LOX-2 puede(n) ser detectada(s) por cualquier medio conocido para la persona experta en el arte. Preferentemente, sin embargo, la(s) proteína(s) es(son) detectada(s) mediante técnicas donde la proteína LOX-1 es detectada mediante anticuerpos específicos de LOX-1 y LOX-2, tal como anticuerpos policlonales para LOX-1 y LOX-2. Dichas técnicas pueden ser, por ejemplo, Western blotting o ELISA. Dichos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Preferentemente, sin embargo, dichos anticuerpos son de naturaleza policlonal, reconociendo varios diferentes epítopos dentro de la proteína LOX-1 y LOX-2, respectivamente. La proteína LOX-1 y/o LOX-2 pueden también ser detectadas indirectamente, por ejemplo, mediante procedimientos que determinan actividad de LOX-1, o mediante procedimientos que determinan actividad LOX-2. En una realización preferida, la proteína LOX-1 es detectada utilizando los procedimientos reseñados en el Ejemplo 4 de la solicitud internacional de patente WO 2005/087934. La proteína LOX-2 puede ser detectada de una manera similar, utilizando anticuerpos que se unen a LOX-2 de cebada.

La pérdida total de función de una o ambas actividades LOX-1 y LOX-2 pueden ser el resultado de ninguna, o muy pequeña, preferentemente ninguna expresión de un transcripto de LOX-1 y/o un transcripto de LOX-2. La persona experta reconocerá que la ausencia de un transcripto de LOX-1 y/o LOX-2 también dará por resultado la ausencia de una proteína LOX-1 y/o LOX-2 traducida, respectivamente. Alternativamente, la pérdida total de LOX-1 funcional y LOX-2 funcional puede también ser la expresión resultante de un transcripto aberrante de LOX-1 y/o un transcripto aberrante de LOX-2. Un transcripto aberrante de LOX-1 y/o LOX-2 puede ser causado por splicing aberrante del transcripto, por ejemplo, debido a una mutación en un sitio de splicing. En consecuencia, las plantas de cebada de la invención pueden llevar una mutación en un sitio de splicing, tal como un sitio de splicing 5' o un sitio de splicing 3', por ejemplo en uno de los dos nucleótidos más 5' de un intrón, o en uno de los nucleótidos más 3' de un intrón. Un ejemplo de un mutante con splicing aberrante del transcripto de LOX-1 se describe como mutante A618 en la WO2005/087934. La expresión de transcriptos que codifican LOX-1 o LOX-2 puede, por ejemplo, ser detectada mediante Northern blotting o experimentos RT-PCR.

Las mutaciones han causado la pérdida total de enzimas LOX-1 y LOX-2 funcionales de las plantas de cebada de la presente invención. En consecuencia, las plantas de cebada de la presente invención en general llevan una mutación en el gen LOX-1. Dicha mutación puede estar en las regiones reguladoras, por ejemplo dentro del promotor o de intrones, o dicha mutación puede estar en la región codificante. La mutación puede ser también una delección del gen LOX-1 o parte del mismo, tal como delección de la región codificante completa. Similarmente, las plantas de cebada de la presente invención en general llevan una mutación en el gen LOX-2. Dicha mutación puede estar en las regiones reguladoras, por ejemplo dentro del promotor o de intrones, o dicha mutación puede estar en la región codificante. La mutación puede ser también una delección del gen de LOX-2 o parte del mismo, tal como delección de la región codificante completa. En consecuencia, la causa de la pérdida total de enzimas LOX-1 y/o LOX-2 funcionales pueden también ser detectadas por la identificación de mutaciones en el gen que codifica LOX-1, o en el gen que codifica LOX-2. Las mutaciones en los genes que codifican LOX-1 y LOX-2 pueden, por ejemplo, ser detectadas secuenciando dichos genes. Preferentemente, después de identificar una mutación, la pérdida total de función es confirmada ensayando las actividades de LOX-1 y/o LOX-2.

Se entiende que el término "proteína LOX-1" cubre la longitud completa de la proteína LOX-1 de cebada como se establece en la SEQ ID NO:3 (que corresponde con WO 2005/087934), o en la SEQ ID NO:7 de WO 2005/087934, o un homólogo funcional de las mismas. El sitio activo de LOX-1 está situado en la parte del C-terminal de la enzima. En particular, se anticipa que los residuos de aminoácidos de la región que abarca 520-862, o parte de los mismos, (preferentemente la región completa de aminoácidos de los nos. 520-862) son relevantes para la actividad de LOX-1. En consecuencia, en una realización, la cebada con LOX-1 nula preferentemente comprende un gen que codifica una forma mutada de LOX-1 que carece de algunos o todos los aminoácidos 520-862 de LOX-1. Dicho LOX-1 mutado puede también carecer de otros residuos aminoácidos, los cuales están presentes en el LOX-1 de tipo salvaje.

En consecuencia, cebada con doble LOX nula de la invención puede comprender una forma truncada de LOX-1, que no es funcional -tal como una forma truncada de N- o C-terminal. Preferentemente, dicha forma truncada comprende no más de 800, más preferentemente no más de 750, aún más preferentemente no más de 700, aún más preferentemente no más de 690, aún más preferentemente no más de 680, aún más preferentemente no más de 670 aminoácidos consecutivos de LOX-1, tal como no más de 665, por ejemplo no más de 650, tal como no más de 600, por ejemplo no más de 550, tal como no más de 500, por ejemplo no más de 450, tal como no más de 425, por ejemplo no más de 399 aminoácidos consecutivos de LOX-1 de SEQ ID NO:3 de WO 2005/087934. Preferentemente, dicha forma truncada comprende solamente un fragmento N-terminal de LOX-1, preferentemente como máximo los 800, más preferentemente como máximo los 750, aún más preferentemente como máximo los 700, aún más preferentemente como máximo los 690, aún más preferentemente como máximo los 680, aún más preferentemente como máximo los 670, aún más preferentemente como máximo los 665 aminoácidos N-terminal de la SEQ ID NO:3 de WO 2005/087934, tal como no más de 665, por ejemplo no más de 650, tal como no más de 600, por ejemplo como máximo los 550, tal como como máximo los 500, por ejemplo como máximo los 450, tal como como máximo los 425, por ejemplo como máximo los 399 aminoácidos N-terminal de la SEQ ID NO:3 de WO 2005/087934. En adición al fragmento de LOX-1, dicha forma truncada puede opcionalmente comprender secuencias C-terminal que no están presentes en el LOX-1 de tipo salvaje. Este puede ser en particular el caso si la forma truncada ha aparecido a partir del splicing aberrante. Preferentemente, dichas secuencias adicionales de C-terminal consisten en como máximo 50, más preferentemente como máximo 30, aún más preferentemente como máximo 10, aún más preferentemente como máximo 4, o como máximo 1 aminoácido.

En una realización muy preferida, la forma truncada puede consistir en aminoácidos 1-665 de la SEQ ID NO:3 de WO 2005/087934.

En una realización preferida, la planta de cebada comprende un gen que codifica LOX-1 que está transcrito en ARNm, el cual comprende un codón sin sentido o un codón de terminación corriente arriba del codón de terminación del ARNm de tipo salvaje de LOX-1. Tal codón sin sentido es en la presente memoria descriptiva indicado un codón sin sentido prematuro. Preferentemente, todos los genes que codifican LOX-1 transcritos en ARNm de dicha planta comprenden un codón sin sentido prematuro o un codón de terminación. El codón sin sentido o codón de terminación está situado preferentemente como máximo 800, más preferentemente como máximo 750, aún más preferentemente como máximo 700, aún más preferentemente como máximo 690, aún más preferentemente como máximo 680, aún más preferentemente como máximo 670, aún más preferentemente como máximo 665 codones aguas abajo del codón de inicio. La secuencia de ADN genómica de tipo salvaje que codifica LOX-1 está dada en la SEQ ID NO:1 de WO 2005/087934 o la SEQ ID NO:5 de WO 2005/087934.

En una realización preferida, la planta de cebada comprende un gen que codifica LOX-1, donde el correspondiente pre-ARNm transcrito a partir de dicho gen comprende la secuencia correspondiente a la SEQ ID NO:2 (correspondiente a la SEQ ID NO:2 de WO 2005/087934).

En una realización muy preferida, el gen que codifica LOX-1 mutante de la planta de cebada con doble LOX nula de acuerdo con la invención comprende una mutación sin sentido, dicha mutación correspondiendo a una sustitución G→A en la posición 3574 de SEQ ID NO:1 (correspondiente a la SEQ ID NO: 1 de WO 2005/087934).

El término "proteína LOX-2" significa que cubre la proteína LOX-2 de cebada de longitud completa como se establece en la SEQ ID NO:5 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), o un homólogo funcional de la misma. El sitio activo de LOX-2 está situado en la parte C-terminal de LOX-2. En particular, se anticipa que los residuos de aminoácidos de la región que abarca de 515-717, o parte de los mismos, son relevantes para la actividad de LOX-2. Con base en un examen de la estructura cristalina de LOX-1 de poroto de soja, los tramos de secuencia anticipada de la hendidura del sitio activo de la enzima LOX-2 de cebada están representados por los residuos de aminoácidos 515-525 y 707-717. Una proteína LOX-2 mutada, traducida, es decir una forma truncada C-terminalmente de LOX-2 de cebada con doble LOX mutante nula A689 contiene como máximo 684 residuos, y por lo tanto no tendrá el segundo tramo de secuencia de la hendidura del sitio activo -haciéndola inactiva. De acuerdo con una realización, la cebada con doble LOX nula de la invención comprende preferentemente un gen que codifica una forma mutante de LOX-2 que carece de algunos, o todos los aminoácidos 515-717 de LOX-2, preferentemente carecen de algunos o de todos de los aminoácidos 707 a 717, aún más preferentemente careciendo de los aminoácidos 707-717. Dicho LOX-2 mutante puede también carecer de otros residuos de aminoácidos, los cuales están presentes en LOX-2 de tipo salvaje.

Por consiguiente, la cebada con LOX doble nula puede comprender una forma truncada de LOX-2, que no es funcional, tal como una forma truncada N-terminal o C- terminal. Preferentemente, dicha forma truncada comprende

no más de 800, más preferentemente no más de 750, aún más preferentemente no más de 725, aún más preferentemente no más de 700, aún más preferentemente no más de 690, aún más preferentemente no más de 684 aminoácidos consecutivos de LOX-2 de la SEQ ID NO:5 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860). Preferentemente, dicha forma truncada comprende solo un fragmento N-terminal de LOX-2. Por lo tanto, preferentemente dicha forma truncada comprende como máximo los 800, más preferentemente como máximo los 750, aún más preferentemente como máximo los 725, aún más preferentemente como máximo los 700, aún más preferentemente como máximo los 690, aún más preferentemente como máximo los 684 aminoácidos N-terminal de la SEQ ID NO:5 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860). En adición al fragmento de LOX-12, dicha forma truncada puede opcionalmente comprender secuencias C-terminal adicionales no presentes en LOX-2 de tipo salvaje. Este puede ser en particular el caso si la forma truncada ha surgido de un splicing aberrante. Preferentemente, dichas secuencias C-terminal adicionales consisten en como máximo 50, más preferentemente como máximo 30, aún más preferentemente como máximo 10, aún más preferentemente como máximo 4, o como máximo 1 aminoácido.

En una realización muy preferida, la forma truncada puede consistir en aminoácidos 1-684 de la SEQ ID NO:5 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860).

En una realización preferida, la planta de cebada comprende un gen transcripto en ARNm para LOX-2, donde dicho ARNm comprende un codón sin sentido o un codón de terminación corriente arriba del codón de terminación del ARNm de LOX-2 de tipo salvaje. Tal codón sin sentido es designado en la presente memoria descriptiva como un codón sin sentido prematuro. Preferentemente todos los genes transcritos en ARNm que codifican LOX-2 de dicha planta comprenden un codón sin sentido prematuro o un codón de terminación. El codón sin sentido o codón de terminación está preferentemente situado como máximo 800, más preferentemente como máximo los 750, aún más preferentemente como máximo los 725, aún más preferentemente como máximo los 700, aún más preferentemente como máximo los 690, aún más preferentemente como máximo los 684 codones corriente abajo del codón de inicio. La secuencia de ADN genómico de tipo salvaje que codifica LOX-2 está dada en la SEQ ID NO:1 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860).

En una realización muy preferida, el gen que codifica LOX-2 mutado de la planta de cebada con doble LOX nula comprende una mutación sin sentido, donde dicha mutación corresponde a una sustitución a G→A en la posición 2689 de la SEQ ID NO:1 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860).

La planta de cebada de acuerdo con la invención puede ser preparada mediante cualquier procedimiento adecuado conocido para la persona experta en el arte, preferentemente mediante uno de los procedimientos indicados en la presente memoria descriptiva más adelante en la sección "Preparación de cebada doble LOX nula-MMT nula".

Pérdida de MMT funcional

La presente invención se refiere a plantas de cebada -o partes de las mismas, o productos de plantas de las mismas- que tienen una primera, una segunda mutación y una tercera mutación, donde la primera mutación conduce a una pérdida total de LOX-1 funcional, y la segunda mutación conduce a una pérdida total de LOX-2 funcional -ambas descritas precedentemente en la presente memoria descriptiva en más detalle en la sección "Pérdida de LOX funcional". La tercera mutación conduce a una pérdida total de MMT funcional.

La pérdida total de un MMT funcional puede basarse en diferentes mecanismos. Por ejemplo, la pérdida total de MMT funcional puede resultar en una proteína que funcione mal en dicha planta, es decir una enzima MMT que funciona mal, tal como una proteína MMT mutante con actividad no detectable. Por ejemplo, la proteína MMT del mutante puede ser una proteína truncada. La pérdida de actividad de MMT puede estar basada similarmente en diferentes mecanismos, por ejemplo causada por un malfuncionamiento de la proteína MMT.

Preferentemente, la actividad de una proteína MMT mutada es determinada por su capacidad para catalizar la transferencia de un grupo metilo desde SAM a Met, formando de este modo SMM. Esto puede, por ejemplo, ser asumido como se describe en el Ejemplo 4 en la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288). Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de una MMT mutada es obtenida determinando la secuencia traducida del correspondiente ADNc de cebada aislado. Esto puede ser hecho esencialmente como se describe en el Ejemplo 8 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288). Alternativamente, el MMT mutado de una planta de cebada de la invención es obtenido mediante expresión heteróloga en un cultivo de células bacterianas como se describe en el Ejemplo 11 y el Ejemplo 12 en la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288),

seguido de verificación de que la proteína recombinante es inactiva como una enzima MMT.

La pérdida total de MMT funcional puede ser comprendida por la carencia de proteína MMT. La pérdida de proteína MMT conducirá a la pérdida de la función de MMT. Entonces, la planta de cebada puede no comprender o solo muy poca, preferentemente ninguna proteína MMT detectable. La presencia o ausencia de proteína MMT puede ser detectada por cualquier medio conocido para la persona experta en el arte. Sin embargo, la(s) proteína(s) es(son) preferentemente analizada(s) mediante técnicas donde la proteína MMT es detectada mediante anticuerpos específicos que reconocen MMT. Dichas técnicas pueden, por ejemplo, ser Western Blotting o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, y dichos anticuerpos específicos pueden ser monoclonales o policlonales. Preferentemente, sin embargo, dichos anticuerpos son policlonales que reconocen diversos epítomos diferentes dentro de la proteína MMT. Estos pueden ser también detectados indirectamente, por ejemplo, mediante procedimientos de determinación de actividad de MMT. En consecuencia, en la invención, una planta de cebada se dice que lleva una mutación en el gen que codifica MMT, causando así una pérdida total de actividad de MMT, cuando no hay proteína MMT detectable en dicha planta. En particular, este es el caso cuando no hay proteína MMT detectable con una masa aproximada de 120 kDa, $\pm 10\%$, en dicha planta de planta de cebada -preferentemente en granos de dicha planta de cebada, analizada por Western Blotting.

La pérdida total de MMT funcional puede también ser un resultado de ninguna o muy poca, preferentemente ninguna transcripción de un ARNm de MMT. La persona experta reconocerá que la ausencia de un transcripto de MMT resultará también en la ausencia de proteína MMT.

Preferentemente, sin embargo, la pérdida total de MMT funcional es el resultado de la expresión de un transcripto de MMT aberrante. Dicho transcripto puede ser preferentemente causado por un evento de splicing de un transcripto primario, por ejemplo, debido a una mutación en un sitio de splicing. La expresión de transcriptos que codifican MMT puede, por ejemplo, ser detectada por Northern blotting, o por procedimientos RT-PCR.

La pérdida total de MMT funcional en las plantas de cebada de la presente invención es causada por una o más mutaciones. Así, las plantas de cebada de la presente invención, en general, llevan al menos una mutación en el gen de MMT. Dicha(s) mutación(es) pueden estar en regiones reguladoras, por ejemplo dentro del promotor, o intrones, o dicha(s) mutación(es) puede(n) estar en la región codificante de la proteína. La mutación puede ser también una delección del gen MMT o parte de la misma, por ejemplo delección de la región codificante del gen MMT. Así, la pérdida de MMT funcional puede también ser detectada analizando mutaciones en el gen que codifica MMT. Las mutaciones en el gen que codifica MMT pueden, por ejemplo, ser detectadas secuenciando dicho gen, seguida por la comparación con la secuencia de tipo salvaje, preferentemente la secuencia de tipo salvaje del cv. Prestige dada en la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288) como SEQ ID NO:3, o aquella del cv. Sebastian (SEQ ID NO:16 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)). Preferentemente, después de identificar una mutación, la pérdida de función es confirmada ensayando la actividad de MMT, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 2 o Ejemplo 4 (véase más adelante) de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288).

Mediante el término proteína MMT se quiere significar que cubre la proteína MMT de cebada de longitud completa como se establece en la SEQ ID NO:6 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288), o un homólogo funcional de la misma. En este contexto, un homólogo funcional es una proteína MMT con el mismo nivel de actividad de MMT, $\pm 25\%$, así como aquella de la proteína MMT de cebada como se establece en la SEQ ID NO:13, donde la actividad de MMT es determinada como se describe en el Ejemplo 2 o en el Ejemplo 4 (véase más adelante) de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288).

La planta de cebada que lleva una tercera mutación que causa una pérdida total de actividad de MMT puede comprender una forma de MMT truncada, no funcional, tal como una forma truncada N-terminal o C-terminal. Una planta de cebada puede comprender más de una forma truncada de MMT, tal como 2, o por ejemplo 3, o tal como más de 3 diferentes formas truncadas de MMT, la cual puede resultar a partir de transcriptos con splicing en forma aberrante. Dichas formas truncadas comprenden solamente un fragmento N-terminal de MMT. En adición al fragmento N-terminal de MMT tipo salvaje, dichas formas truncadas de MMT pueden comprender secuencias C-terminal adicionales no encontradas en MMT de tipo salvaje. Dichas secuencias C-terminal adicionales, pueden por ejemplo, ser secuencias intrón traducidas, tal como aquellas comprendidas en el ARNm mutante debido a splicing aberrante. Preferentemente, dichas formas de MMT comprenden como máximo los 500, más preferentemente como máximo los 450, aún más preferentemente como máximo los 400, aún más preferentemente como máximo los 350, aún más preferentemente como máximo los 320, aún más preferentemente como máximo 311, o como máximo 288 residuos aminoácidos N-terminal de la SEQ ID NO:6 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315

(publicada como WO 2010/063288). Este es en particular el caso cuando dicha planta de cebada tiene una pérdida total de actividad de MMT. Sin embargo, la MMT puede también comprender menos, tal como no más de 300, por ejemplo no más de 250, tal como no más de 200, por ejemplo como máximo los 150, por ejemplo no más de 147, o no más de 133 aminoácidos N-terminal de la SEQ ID NO:6 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288).

En una realización muy preferida, la forma truncada de MMT puede consistir de los aminoácidos 1-311 o aminoácidos 1-288 de la SEQ ID NO:6 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288) y opcionalmente secuencias C-terminal adicionales no presentes en MMT de tipo salvaje. Preferentemente, dichas secuencias C-terminal consisten en como máximo 50, más preferentemente como máximo 30, aún más preferentemente como máximo 10, aún más preferentemente como máximo 4, o como máximo 1 aminoácido. En una realización muy preferida, la forma truncada de MMT puede ser la proteína de acuerdo con la SEQ ID NO:18 (correspondiente a la SEQ ID NO:11 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288), o la SEQ ID NO:19 (correspondiente a la SEQ ID NO:13 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288), o la SEQ ID NO:20 (correspondiente a la SEQ ID NO:15 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)). Ninguna de las proteínas de SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 o SEQ ID NO: 20 (correspondientes respectivamente a SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO:15 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288) representan enzimas MMT funcionales.

En otra realización muy preferida, la forma de MMT truncada puede consistir de los aminoácidos 1-147, o de los aminoácidos 1-133, de la SEQ ID NO:18 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288), y opcionalmente secuencias C-terminal adicionales no presentes en MMT de tipo salvaje. Preferentemente, dichas secuencias C-terminal adicionales consisten en como máximo 50, más preferentemente como máximo 40, aún más preferentemente como máximo 39, o como máximo 33, o como máximo 30 aminoácidos. En una realización muy preferida, la forma de MMT truncada puede ser una proteína de acuerdo con la SEQ ID NO:22, o la SEQ ID NO:24, o la SEQ ID NO:26 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288), respectivamente. Ninguna de las proteínas de SEQ ID NO:22, o SEQ ID NO:24, o SEQ ID NO:26 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288), respectivamente, son enzimas de MMT funcional.

Las formas truncadas de MMT pueden, por ejemplo estar presentes en plantas de cebada que llevan una mutación en el gen de MMT, donde dicha mutación introduce un codón de terminación prematuro dando por resultado un gen que codifica las formas anteriormente mencionadas de MMT.

En una realización preferida, la planta de cebada comprende un gen de MMT que es transcrito en ARNm, el cual comprende algunos, pero no todos los genes de MMT de tipo salvaje con splicing juntos sin intervención (la estructura intrón-exón del gen de MMT de cebada de tipo salvaje es mostrada en la FIG. 9 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)). En una realización es en consecuencia preferido que el ARNm de MMT de la planta de cebada de acuerdo con la invención comprenda como máximo exones 1, 2, 3, 4, y 5 con splicing juntos sin intervención, o por ejemplo como máximo los exones 1 y 2 con splicing juntos sin intervención. En adición a dichos exones con splicing juntos, los ARNms de MMT de la planta de cebada de acuerdo con la invención pueden comprender secuencias adicionales 3' terminal derivadas de intrones y/o exones, donde los intrones separan secuencias de exones. Ejemplos preferidos de ARNms aberrantes de MMT de plantas de cebada de acuerdo con la invención -determinado mediante RT-PCR y en consecuencia con longitudes de fragmentos en bp- se ilustran en la FIG. 12 y la FIG. 16 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288). Más preferentemente, los ARNms aberrantes de plantas de cebada de acuerdo con la invención son aquellos ilustrados en la FIG. 12 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288), comprendiendo además los exones 1 y 2 en el extremo 5', o los ARNms ilustrados en la FIG. 16 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288), comprendiendo además el exón 1 en el extremo 5'.

En una realización muy preferida, la planta de cebada que lleva una tercera mutación en el gen para MMT que causa una pérdida total de MMT funcional comprende una mutación en un sitio de splicing dentro del gen MMT, que produce ARNm con splicing en forma aberrante. Más preferentemente, dicha mutación está posicionada en un intrón del gen MMT, aún más preferentemente en el sitio de splicing 5' de un intrón, tal como en el sitio de splicing 5' del intrón 1 (el intrón que separa los exones 1 y 2), tal como en el sitio de splicing 5' del intrón 2 (el intrón que separa los exones 2 y 3), tal como en el sitio de splicing 5' del intrón 3 (el intrón que separa los exones 3 y 4), tal como en el sitio de splicing 5' del intrón 4 (el intrón que separa los exones 4 y 5), tal como en el sitio de splicing 5' del intrón 5 (el intrón que separa los exones 5 y 6), tal como en el sitio de splicing 5' del intrón 6 (el intrón que separa los exones 6 y

7), lo más preferentemente en el sitio de splicing 5' del intrón 2 o del intrón 5.

Se prefiere que dicha mutación sea una mutación G→A de la base 5' terminal de los intrones mencionados precedentemente. Así, una mutación muy preferida es una mutación G→A de la base 5' terminal del intrón 2, o una mutación G→A de la base más 5' del intrón 5.

La planta de cebada de acuerdo con la invención puede ser preparada mediante cualquier procedimiento adecuado conocido para la persona experta en el arte, preferentemente mediante el procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva a continuación en la sección "Preparación de cebada doble LOX nula-MMT nula".

Preparación de cebada doble LOX nula-MMT nula

La planta de cebada de acuerdo con la invención puede ser preparada mediante cualquier procedimiento adecuado conocido para la persona experta en el arte. Preferentemente, la planta de cebada de la invención es preparada mediante un procedimiento que comprende las etapas de mutagenia de plantas de cebada o partes de las mismas, por ejemplo granos de cebada, seguido por el análisis y selección de plantas de cebada caracterizadas por una pérdida total de LOX-1 funcional, pérdida total de LOX-2 funcional y/o pérdida total de MMT funcional.

Las plantas de cebada de acuerdo con la invención comprenden al menos 3 mutaciones. De manera concordante, las plantas pueden ser preparadas preparando plantas de cebada separadas que comprenden solo una de las mutaciones y a continuación cruzando dichas plantas de cebada para obtener una planta de cebada con las 3 mutaciones -o introduciendo sucesivamente las mutaciones dentro de una planta de cebada o mediante combinación de estos procedimientos.

En consecuencia, la planta de cebada de acuerdo con la invención puede ser preparada mediante mutagenia de una planta de cebada o partes de las mismas, por ejemplo granos de cebada, seguido por el análisis y selección de plantas de cebada caracterizadas por una pérdida total de LOX-1 funcional, y mutagenia de otra planta de cebada o partes de la misma, por ejemplo granos de cebada, seguido por el análisis y selección de plantas de cebada caracterizadas por una pérdida total de LOX-2 funcional y mutagenia de aún otra planta de cebada o partes de las mismas, por ejemplo granos de cebada, seguido por el análisis y selección de plantas de cebada caracterizadas por una pérdida total de MMT funcional. Las plantas de cebada seleccionadas pueden finalmente ser cruzadas en varias rondas para obtener plantas de cebada que llevan las tres mutaciones.

Alternativamente, la planta de cebada de la presente invención puede ser preparada mediante mutagenia de plantas de cebada o partes de las mismas, por ejemplo granos de cebada, seguido por el análisis y selección de plantas de cebada caracterizadas por una pérdida total de XX funcional. Dichas plantas de cebada seleccionadas pueden opcionalmente ser propagadas y después estas plantas de cebada -o partes de las mismas, por ejemplo granos de cebada- pueden ser sometidas a mutagenia, seguido por el análisis y selección de plantas de cebada caracterizadas por una pérdida total de YY funcional. Dichas plantas de cebada seleccionadas, o partes de las mismas, pueden opcionalmente ser propagadas y después:

(i) estas plantas de cebada -o partes de las mismas, por ejemplo granos de cebada- pueden ser sometidas a mutagenia, seguido por el análisis y selección de plantas de cebada caracterizadas por una pérdida total de ZZ funcional; o

(ii) estas plantas de cebada pueden ser cruzadas con una planta de cebada caracterizadas por pérdida total de ZZ funcional.

En los cruzamientos mencionados precedentemente, XX, YY y ZZ cada una indica alguna de LOX-1, LOX-2 o MMT, donde XX es diferente de YY, que es diferente de ZZ.

En una realización preferida, la planta de cebada puede ser preparada mediante un procedimiento que implica la mutagenia de plantas de cebada, o partes de las mismas, por ejemplo granos de cebada, donde dichas plantas de cebada ya llevan una mutación que causa una pérdida total de enzima LOX-1 funcional seguido por el análisis y selección de plantas de cebada que llevan adicionalmente una mutación que causa una pérdida total de LOX-2 funcional (es decir LOX-1 nula-LOX-2 nula, o plantas doble-LOX nula). Este procedimiento implica adicionalmente la mutagenia de otras plantas de cebada, o partes de las mismas y el análisis y selección de plantas de cebada con pérdida total de MMT funcional y finalmente el cruce de estas plantas de cebada con las plantas de cebada LOX-1 nula-LOX-2 nula.

Las plantas de cebada LOX-1 nula adecuadas están, por ejemplo, descritas en la solicitud de patente internacional

WO 2005/087934.

Se prefiere que el procedimiento de análisis utilice embriones germinados como material de partida para la identificación de las plantas de cebada caracterizadas por una pérdida total de LOX-2 funcional. De manera interesante, se ha hallado que es menos preferible el uso de embriones maduros como material de partida para el análisis de actividad LOX-2, con base en el análisis de una cantidad de 21.000 embriones maduros, que no revelaron un solo mutante de cebada LOX-2 nula.

Es un objeto de la presente descripción proporcionar procedimientos de preparación de una planta de cebada doble-LOX nula-MMT-nula que comprenden las etapas de: (i) preparar una planta de cebada doble-LOX nula; y (ii) preparar una planta de cebada MMT-nula; (iii) cruzar dicha planta de cebada doble-LOX nula y dicha planta de cebada MMT-nula; (iv) seleccionar plantas de cebada doble-LOX nula-MMT nula.

La preparación de dichas plantas de cebada doble-LOX nula puede ser realizada preferentemente mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar una planta de cebada, o partes de la misma, con una pérdida total de función de actividad LOX-1, tal como pérdida total de enzima LOX-1 funcional; y
- (ii) someter a mutagenia dicha planta de cebada, y/o células de cebada, y/o tejido de cebada, y/o granos de cebada, y/o embriones de cebada de dicha planta de cebada, obteniendo de este modo cebada generación M0; y
- (iii) mejorar dichas plantas mutagenizadas de cebada, granos, y/o embriones durante al menos 2 generaciones, obteniendo de este modo Mx generaciones de plantas de cebada, donde x es un entero ≥ 2 ; y
- (iv) obtener embriones a partir de dichas Mx plantas de cebada; y
- (v) germinar dichos embriones, y
- (vi) determinar las actividades de LOX-1 y LOX-2 en dichos embriones germinados, o partes de los mismos; y
- (vii) seleccionar plantas con una pérdida total de actividad de LOX-1 y de actividad de LOX-2 en los embriones germinados, y
- (viii) analizar en cuanto a una mutación en el gen de LOX-1 y en el gen de LOX-2; y
- (ix) seleccionar plantas portadoras de una mutación en el gen de LOX-1 y en el gen de LOX-2, es decir plantas con doble-LOX nula;

obteniendo de este modo una planta de cebada portando mutaciones en los genes para LOX-1 y LOX-2, que causa una pérdida total de LOX-1 funcional y LOX-2 funcional.

Preparar dichas plantas de cebada con MMT nula puede preferentemente ser llevado a cabo utilizando un procedimiento que comprende las etapas de:

- (i) mutagenizar plantas de cebada, y/o células de cebada, y/o tejido de cebada, y/o granos de cebada, y/o embriones de cebada, obteniendo de este modo cebada generación M0; y
- (ii) propagar, por ejemplo mediante mejoramiento, dichas plantas de cebada, granos, y/o embriones mutagenizados durante ≥ 2 generaciones, obteniendo de este modo plantas de cebada de Mx generaciones, donde x es un entero ≥ 2 ; y
- (iii) obtener una muestra de dichas Mx plantas de cebada; y
- (iv) determinar el nivel de SMM en dicha muestra, y
- (v) seleccionar las plantas donde la muestra comprende menos de 10 ppb de SMM, preferentemente menos de 5 ppb de SMM, más preferentemente SMM no detectable; y
- (vi) secuenciar al menos parte del gen de MMT; y
- (vii) seleccionar plantas portadoras de una mutación en el gen de MMT.

La planta de cebada anteriormente mencionada con una pérdida total de actividad de LOX-1 puede, por ejemplo, ser cualesquiera de las plantas de cebada con una pérdida total de actividad de LOX-1 descrita en WO 2005/087934, preferentemente la mutante D112, o las plantas progenie de ellas.

Las etapas de mutagenia en los procedimientos anteriormente mencionados pueden implicar material vivo mutagenizado seleccionado de entre el grupo que consiste en plantas de cebada, células de cebada, tejido de cebada, granos de cebada, y embriones de cebada -preferentemente seleccionado de entre el grupo que consiste en plantas de cebada, granos de cebada, y embriones de cebada, más preferentemente granos de cebada.

La mutagenia puede ser llevada a cabo mediante cualquier procedimiento adecuado. En una realización, la mutagenia es llevada a cabo incubando una planta de cebada, o una parte de la misma -por ejemplo granos de

cebada o células individuales a partir de cebada- con un agente de mutagenia. Dicho agente es conocido para la persona experta en el arte, incluyendo, por ejemplo, pero no limitado a, azida de sodio (NaN_3), metansulfonato de etilo (EMS), azidoglicerol (AG, 3-azido-1,2-propano-diol), metil nitrosourea (MNU), y hidrazida del ácido maleico (MH).

En otra realización, la mutagenia es llevada a cabo mediante irradiación, por ejemplo con UV, de una planta de cebada o una parte de la misma, tal como el grano. En realizaciones preferidas, la mutagenia es llevada a cabo de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva más adelante en la sección "Mutagenia química". Un ejemplo no limitativo de un protocolo de mutagenia adecuado es dado en el Ejemplo 2 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860).

Se prefiere que la mutagenia sea realizada de una manera tal que la frecuencia esperada de mutantes deseada sea al menos 0,5, tal como en el rango de 0,5 a 5, por ejemplo en el rango de 0,9 a 2,3 por 10.000 granos, cuando se examina cebada de la generación M3. En una realización preferida, la mutagenia es llevada a cabo sobre granos de cebada. Los granos aplicados al mutágeno son designados como generación M0 (ver también la **FIG. 8**).

La actividad de LOX puede ser determinada en una muestra que consiste en embriones de cebada germinada, preferentemente en un extracto líquido de un embrión de cebada germinada. Dicha muestra, tal como dicho extracto puede ser preparada a partir de cualquier parte adecuada de dicho embrión germinando. En general, la muestra de cebada debe ser homogeneizada utilizando cualquier procedimiento adecuado antes de la preparación de un extracto de dicha muestra y la determinación de actividad de LOX-2. En particular, se prefiere que un extracto de proteína sea preparado a partir de embrión germinando, o parte del mismo, y que la actividad de LOX sea determinada utilizando dicho extracto. La homogeneización puede, por ejemplo, ser llevada a cabo utilizando fuerzas mecánicas, por ejemplo mediante agitación o batido, tal como agitación en presencia de una perla, tal como una perla de vidrio o de arena.

En una realización preferida, el embrión germinado es de generación Mx, donde x es un entero ≥ 2 ; preferentemente x es un entero en el rango de 2 a 10, más preferentemente en el rango de 3 a 8. En una realización muy preferida, la actividad de LOX es determinada en embriones germinados de generación M3, o una muestra derivada de dichos embriones. En esa realización, se prefiere que los granos mutagenizados de cebada de generación M0 sean crecidos para obtener plantas de cebada, los cuales son cruzados para obtener granos de generación M1. El procedimiento es repetido hasta que se dispone de granos de generación M3 (ver también la **FIG. 8**).

La determinación de la actividad de LOX puede ser llevada a cabo utilizando cualquier ensayo adecuado, preferentemente mediante uno de los procedimientos descritos de aquí en adelante. En particular, se prefiere que el ensayo provea datos sobre la dioxigenación de ácido linoleico a 9-HPODE y 13-HPODE mediante LOX-1 y LOX-2. En general, por lo tanto, ensayar implicará las etapas de:

- (i) proporcionar un extracto proteico preparado a partir de un embrión de cebada germinado o parte del mismo; y
- (ii) proporcionar ácido linoleico; y
- (iii) incubar dicho extracto proteico con dicho ácido linoleico; y
- (iv) detectar la dioxigenación de ácido linoleico a 9-HPODE y 13-HPODE.

La etapa (iv) del procedimiento preferentemente comprende determinar el nivel de 9-HPODE y 13-HPODE en dichos embriones germinantes, preferentemente en un extracto proteico preparado a partir de dichos embriones germinantes. La etapa puede comprender una determinación directa o indirecta de los niveles de 9-HPODE y 13-HPODE. Puede ser determinado el nivel de todos los HPODEs, en cuyo caso se prefiere que se lleven a cabo mediciones específicas de 9-HPODE y 13-HPODE para confirmación. Un procedimiento podría, por ejemplo, ser un procedimiento donde los extractos proteicos a partir de los embriones germinantes sean incubados con ácido linoleico como sustrato para la formación de 9-HPODE y 13-HPODE. Dichos HPODEs pueden después ser detectados por distintos procedimientos. Un procedimiento implica la generación de un compuesto detectable, tal como un colorante. Por ejemplo el procedimiento puede ser el acoplamiento oxidativo del ácido 3-dimetilaminobenzoico y 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona en presencia de hemoglobina catalizada por los HPODEs formados para formar el colorante indamina, el cual puede ser medido a A_{595} utilizando un espectrofotómetro. Un ejemplo de tal procedimiento se describe en los Ejemplos 1 y 2 en la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860). Utilizando este ensayo, una lectura de absorción de menos de 0,2 unidades de A_{595} es considerado como indicativo de la ausencia de LOX-1 y la ausencia de actividades de LOX-2. Sin embargo, un procedimiento más preciso para determinar actividades de LOX-1 y LOX-2 es incubar un extracto proteico de embriones germinantes con ácido linoleico, seguido de la determinación de los

contenidos de 9-HPODE y 13-HPODE. Los contenidos de 9-HPODE y 13-HPODE pueden, por ejemplo, ser determinados utilizando análisis basado en HPLC.

La dioxigenación de ácido linoleico a 9-HPODE y 13-HPODEs puede ser medida directamente o indirectamente. Cualquier procedimiento de detección adecuado puede ser utilizado en la presente invención. En una realización, son detectados los hidroperóxidos del ácido linoleico. Los 9-HPODE y 13-HPODE pueden ser detectados directamente, por ejemplo, mediante procedimientos cromatográficos, tales como HPLC como se describe en el Ejemplo 4 en la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), véase más adelante.

Ciertos aspectos del procedimiento para la extracción de proteína a partir del embrión germinante para la determinación de la actividad de LOX son de gran importancia. Así, se prefiere que la proteína sea extraída utilizando un buffer ácido, preferentemente un buffer con un pH en el rango de 2 a 6, más preferentemente en el rango de 3 a 5, aún más preferentemente en el rango de 3,5 a 5, aún más preferentemente en el rango de 4 a 5, aún más preferentemente un pH de 4,5. El buffer utilizado para la extracción está preferentemente basado en un ácido orgánico, más preferentemente un buffer de ácido láctico. Lo más preferentemente, el extracto de proteína es preparado utilizando un buffer de ácido láctico 100 mM, pH 4,5.

Ciertos procedimientos para la detección de plantas con LOX-1 nula y LOX-2 nula que implican hacer reaccionar 9-HPODE y 13-HPODE con un colorante, por ejemplo 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona. Preferentemente, dicho colorante, por ejemplo 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona, es agregado al extracto proteico después de la adición de ácido linoleico. Preferentemente, el colorante es agregado al menos 1 min, más preferentemente al menos 5 min, aún más preferentemente al menos 10 min, tal como en el rango de 1 a 60 min, por ejemplo en el rango de 5 a 30 min, tal como en el rango de 10 a 20 min después de poner en contacto el extracto proteico con el ácido linoleico.

Los procedimientos preferidos para seleccionar plantas de cebada de acuerdo con la invención son detallados en el Ejemplo 2 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860).

El proceso de selección puede ser ajustado para procedimientos de ensayo basados en placas de microtítulo, u otros formatos de ensayo de alto rendimiento, repetitivos, conocidos para permitir rápido análisis de muchas muestras. Se prefiere que sean analizadas en cuanto a actividades LOX-1 y LOX-2 al menos 5000, tal como al menos 7500, por ejemplo al menos 10.000, tal como al menos 15.000, por ejemplo al menos 20.000, tal como al menos 25.000 plantas de cebada mutagenizadas.

La determinación de una mutación en el gen que codifica LOX-1 puede ser llevada a cabo mediante varios procedimientos diferentes. Por ejemplo, el gen LOX-1 puede ser secuenciado completamente o parcialmente, y la secuencia comparada con la SEQ ID NO:1 de la WO 2005/087934 o con la SEQ ID NO:5 de la WO 2005/087934. Si se busca alguna mutación específica, puede aplicarse el análisis SNP. La persona experta en el arte será capaz de diseñar cebadores útiles para la detección de una mutación específica dada, tal como una que conduce a un codón de terminación prematuro en la secuencia codificadora para LOX-1 (por ej. cualquiera de los codones terminación prematuro descritos precedentemente en la presente memoria descriptiva). Un ejemplo de cómo llevar a cabo un análisis SNP está descrito en el Ejemplo 10 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), con cebadores que son útiles para detectar una mutación G→A en nucleótidos en posición 3474 del gen LOX-1.

La determinación de una mutación en el gen que codifica LOX-2 puede ser llevada a cabo mediante varios procedimientos diferentes. Por ejemplo, el gen LOX-2 puede ser secuenciado completamente o parcialmente, y la secuencia comparada con la SEQ ID NO:1 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860). Si se busca una mutación específica, puede utilizarse el análisis SNP. La persona experta será capaz de diseñar cebadores útiles para la detección de una mutación específica dada, tal como una que conduce a un codón de terminación prematuro en secuencia que codifica LOX-2 (por ej. cualquiera de los codones terminación prematuro descritos precedentemente en la presente memoria descriptiva). Un ejemplo de cómo llevar a cabo un análisis SNP está descrito en el Ejemplo 10 en la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), como son los cebadores útiles para detectar una mutación G→A en la posición del nucleótido 2689 del gen para LOX-2.

Las etapas (viii) y (ix) del procedimiento de preparación de una planta de cebada doble LOX-nula, como se detalla precedentemente en esta sección, pueden ser llevadas cabo antes de las etapas (vi) y (vii), en cuyo caso el procedimiento comprenderá las etapas (i), (ii), (iii), (iv), (v), (viii), (ix), (vi), y (vii) en ese orden. En particular, este podría ser el caso cuando se busca una mutación específica, por ejemplo en plantas de progenie de plantas de

cebada ya identificadas como doble LOX-nula.

Preferentemente, la selección de plantas de cebada con pérdida total de MMT funcional comprende obtener una muestra a partir de una planta de cebada mutagenizada, preferentemente a partir de una planta de cebada mutagenizada germinante, aún más preferentemente a partir de una planta de cebada mutagenizada, que ha germinado durante 4 días. Se prefiere que la muestra sea de un coleoptilo y/o una hoja primaria, preferentemente a partir de una hoja. Así, la muestra puede, por ejemplo, estar en el rango de 1 cm a 3 cm de tejido de hoja.

La muestra puede ser extraída y analizada siguiendo un protocolo multi-etapa novedosamente desarrollado, como se describe en la presente memoria descriptiva, que implica el uso sucesivo de diferentes solventes y materiales de unión. En general, la muestra puede ser extraída, por ejemplo con un solvente o una mezcla de solventes, preferentemente agua y/o solventes orgánicos. El solvente orgánico puede, por ejemplo, ser un alcohol, preferentemente metanol –o el solvente orgánico puede por ejemplo ser un haluro de alquilo, preferentemente cloroformo. En una realización preferida, el solvente es una mezcla de agua, metanol y cloroformo. Dicha extracción puede ventajosamente ser llevada a cabo mientras se mezcla, por ejemplo, utilizando un agitador o un mezclador. Puede agregarse un soporte sólido a la mezcla solvente/muestra –por ejemplo una cuenta, tal como una cuenta de vidrio.

En una realización preferida, la muestra de hoja precedentemente mencionada para determinación de actividad de MMT es tomada de granos generación M_x, donde x es un entero ≥ 2 , preferentemente en el rango de 2 a 10, más preferentemente en el rango de 3 a 8. En una realización muy preferida, el nivel de SMM es determinado en plantas germinadas M₃, o en muestras de las mismas (tal como hojas). En dicha realización, se prefiere que granos de cebada mutagenizada de generación M₀ sean hechos crecer para obtener plantas de cebada, que posteriormente son cruzadas para obtener granos de generación M₁. El procedimiento es repetido hasta que están disponibles granos de generación M₃ (ver **FIG. 8**).

La determinación del nivel SMM está preferentemente basada en el novedoso procedimiento descrito más adelante. De manera interesante, este procedimiento permite análisis de alto rendimiento, permitiendo identificar plantas de cebada caracterizadas por una pérdida total de MMT funcional.

En términos generales, el procedimiento preferentemente implica hacer reaccionar la muestra, o preferentemente un extracto de dicha muestra, preparada como se describe precedentemente, con un compuesto capaz de unirse a SMM. Se halló que el reactivo OPA (Sigma, no. cat. P7914; ver FIG. 2 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)), de aquí en adelante referido como OPA, es particularmente útil para determinar niveles de SMM. OPA reacciona, entre otros, con SMM para formar la molécula referida como SMM-OPA (ver FIG. 2 de la solicitud internacional de patente PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)). La reacción preferentemente implica incubar OPA con un extracto de la muestra preparada como se describe precedentemente. Además, se prefiere agregar ácido 3-mercaptopropiónico a la mezcla de reacción. La mezcla es preferentemente mantenida en un pH alcalino, preferentemente en el rango de pH 8 a pH 11, más preferentemente en el rango de pH 9 a pH 11, aún más preferentemente en el rango de pH 9,5 a pH 10,5, tal como a pH 10. La incubación es preferentemente llevada a cabo a una temperatura en el rango de 0°C a 10°C, preferentemente en el rango de 1°C a 8°C, aún más preferentemente en el rango de 2°C a 6°C, aún más preferentemente en el rango de 3°C a 5°C, tal como a 4°C. El tiempo de incubación es preferentemente ≥ 10 min.

Con base en la observación de que SMM-OPA absorbe y emite luz de 340 nm y 450 nm, respectivamente, su detección fue posible utilizando espectroscopia de fluorescencia. El proceso inicial de detección implica preferentemente la separación del extracto sobre una columna, preferentemente en una columna de 30 x 2 mm Gemini 3 μ C18 (Phenomenex, no. cat. 00A-4439-80; Phenomenex, 2006), seguido por detección de fluorescencia utilizando un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento, preferentemente Cromatografía Líquida de Ultra Performance (sistema UPLC, Waters), diseñado para identificar y medir el nivel de fluorescencia de moléculas que tienen excitación a 340 nm y emisión a 450 nm. Cuando se utiliza este procedimiento, "SMM no detectable" significa la ausencia de compuestos detectables que co-eluyen con SMM. En este contexto, un pequeño "hombro" en un pico del cromatograma es considerado un pico de artefacto. Un pequeño hombro en el lado derecho del pico Asn/Ser, ver **FIG. 2**, de manera concordante, no es considerado que represente un pico de SMM. Así, a modo de ejemplo, se considera que los dos cromatogramas superiores mostrados en la **FIG. 2B** ilustran "SMM no detectable", mientras que el cromatograma inferior en dicha figura representa la separación de una muestra que comprende SMM.

La detección de SMM puede ser realizada preferentemente como se describe en el Ejemplo 2 o Ejemplo 4. Un procedimiento preferido para seleccionar plantas de cebada de acuerdo con la invención se describe más adelante en el Ejemplo 2. El tejido para análisis es preferentemente tomado como muestra a partir de una planta de cebada

germinante, aún más preferentemente de una planta de cebada, que ha germinado durante 4 días. Debe notarse que el procedimiento de análisis precedentemente mencionado es particularmente útil. Antes que nada, el procedimiento analítico es novedoso. Adicionalmente, es una ventaja significativa del procedimiento precedente que es establecido para la determinación de niveles de SMM en plantas de cebada germinante, tal como hojas de plantas de cebada germinante. El tiempo de muestreo a partir de la cebada germinante hace una preparación inesperadamente limpia para la detección con base en UPLC de SMM. Otras muestra, por ejemplo, muestras de mosto de granos similares como se describe precedentemente son demasiado complejas en composición, y generalmente no pueden ser utilizadas en el procedimiento de cromatografía mencionado para la determinación de niveles de SMM.

Posterior a la identificación de una planta de cebada que tiene menos de 10 ppb de SMM, preferentemente SMM no detectable, el correspondiente gen MMT, o parte del mismo, es típicamente secuenciado para determinar si la planta de cebada en cuestión puede ser clasificada como teniendo una mutación en el gen MMT. Entonces se seleccionan las plantas de cebada caracterizadas por tener SMM no detectable, y donde una o más bases del gen que codifica MMT son diferentes cuando se compara con la secuencia de tipo salvaje. En este contexto, la secuencia de tipo salvaje es preferentemente la secuencia hallada en el correspondiente cultivar de cebada tipo salvaje, preferentemente la secuencia dada como SEQ ID NO:3 en la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288). Las mutaciones preferidas se describen precedentemente en la presente memoria descriptiva.

Las mutantes de cebada seleccionadas pueden ser adicionalmente propagadas, y plantas de las generaciones posteriores ser re-analizadas en cuanto a contenido de SMM. Después de selección de las plantas de cebada útiles, estas pueden ser incluidas en programas de mejoramiento que utilizan aquellos procedimientos convencionales que se describen en la presente memoria descriptiva más adelante, en la sección "Mejoramiento de plantas"

Una vez que se ha identificado una planta de cebada doble LOX nula-MMT nula, que contiene una mutación particular en el gen LOX-1 y una mutación particular en el gen LOX-2 y una mutación particular en el gen MMT (tal como cualquiera de las mutaciones mencionadas precedentemente), pueden generarse plantas de cebada adicionales con mutaciones idénticas generadas mediante procedimientos de mejoramiento vegetal convencionales, tales como aquellos bien conocidos para la persona experta en el arte. Por ejemplo, dicha planta de cebada doble-LOX nula puede ser retrocruzada con orto cultivar de cebada.

Posteriormente a la selección de plantas de cebada útiles con pérdida total de LOX-1, LOX-2 y MMT funcionales, pueden opcionalmente llevarse a cabo uno o más análisis adicionales. Por ejemplo, mutantes seleccionadas pueden ser adicionalmente propagadas, y plantas de nuevas generaciones pueden ser ensayadas en cuanto a la pérdida total de LOX-1, LOX-2 y MMT funcionales.

En una realización, se prefiere que la planta de cebada doble LOX nula-MMT nula de acuerdo con la presente invención tenga una fisiología de crecimiento de la planta y desarrollo de grano similares a la de la cebada de tipo salvaje. En consecuencia se prefiere que la planta de cebada doble- LOX-1-nula-MMT-nula sea similar a la cebada de tipo salvaje (preferentemente al cv. Power o cv. Quench o cv. Rosalina) con respecto a la altura de la planta, número de vástagos por planta, comienzo de la floración y/o números de granos por espiga.

Además, se prefiere que la planta de cebada doble LOX nula-MMT nula de acuerdo con la presente invención sea similar a la cebada de tipo salvaje, en particular similar al cv. Power o cv Quench con respecto a la altura de la planta, fecha de espigamiento, resistencia a enfermedades, encamado, rotura de espigas, tiempo de maduración, y rendimiento. En el presente contexto debe entenderse "similar" como lo mismo $\pm 10\%$ en caso de números. Estos parámetros pueden ser determinados como se describe en la presente memoria descriptiva en el Ejemplo 5.

En una realización muy preferida, la planta de cebada es preparada cruzando la cebada Línea A689 (ATCC Designación Depósito Patente: PTA-9640), con la cebada Línea 8063 (ATCC Designación Depósito Patente: PTA-9543) y opcionalmente seguido por mejoramiento vegetal adicional.

Se depositaron semillas de cebada Línea A689 el 4 de diciembre de 2008 bajo el nombre "Barley, Hordeum vulgare L.; Line A689" en la American Type Culture Collection (ATCC), Patent Depository, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, EE.UU. (número de depósito PTA-9640).

Se depositaron semillas de cebada Línea 8063 el 13 de octubre de 2008 en la American Type Culture Collection (ATCC), Patent Depository, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, EE.UU. y se denominaron "Barley, Hordeum vulgare; Line 8063" (ATCC Designación Depósito Patente: PTA-9543).

Mutagenia química

Con el fin de generar plantas de cebada con doble LOX nula-MMT nula de acuerdo con la presente invención, se prepara un muy gran número de mutantes de cebada – típicamente en múltiples rondas – mediante cualquier procedimiento de mutagenia adecuado, por ejemplo mediante el uso de mutagenia química de granos de cebada. Este procedimiento es conocido porque introduce mutaciones al azar. La mutagenia de cebada puede ser llevada a cabo utilizando cualquier agente químico mutagenizante. Sin embargo, este es preferentemente llevado a cabo tratando a los granos con NaN_3 , dejando que los granos que sobreviven germinen, seguido del análisis de las plantas descendientes. La generación de plantas que crecen a partir de los granos mutagenizados, referidos como M0, contiene quimeras heterocigota para cualquier mutación dada. Las plantas de la progenie recolectadas después de la auto-polinización son referidas como la generación M1, en la cual una dada mutación se segrega dentro de los correspondientes heterocigotas y homocigotas (ver **FIG. 8**).

El tratamiento de los granos con NaN_3 no es equivalente a tratar una única célula, porque los granos después del tratamiento contendrán algo de células no mutantes y una variedad de células que tienen mutaciones en el ADN. Dado que las mutaciones en las líneas celulares que no conducen a la línea germinal serán perdidas, el objetivo es dirigir el mutágeno a las pocas células que se desarrollan como tejidos reproductivos que contribuyen al desarrollo de la generación M1.

Para evaluar la eficiencia de la mutación global, las quimeras albinas y plantas albinas pueden ser contadas en las generaciones M0 y M1. Registrar el número de mutantes como una función de las plantas que sobreviven brinda un estimado de la eficiencia de mutación, mientras que registrar el número de mutantes como una función de las semillas tratadas mide la combinación de, tanto eficiencia de mutación como muerte del grano.

Es sorprendente que las células tengan mecanismos de aseguramiento de la calidad virtualmente cada etapa de la expresión de genes, posiblemente para moderar los efectos de mutaciones dañinas. Un ejemplo bien estudiado en eucariotas es la degradación mediada sin sentido del ARNm, indicada como NMD, la cual evita la síntesis de proteínas prematuramente truncadas, potencialmente perjudiciales (Maquat and Carmichael, 2001; Wu y col., 2007). En la NMD, un codón de terminación es identificado como prematuro por su posición relativa a elementos desestabilizantes corriente abajo. Las mutaciones que generan codones de terminación prematura (sin sentido) codones (PTCs) a veces incrementan los niveles de transcritos alternativamente cortados y con splicing que se escapan de las mutaciones culpables, salvando así potencialmente la función de la proteína (Mendell y Dietz, 2001).

Mejoramiento vegetal

En una realización, el objeto es proporcionar plantas de cebada útiles agronómicamente que comprenden el rasgo doble-LOX nula-MMT-nula. El desarrollo de cultivos es a menudo un proceso prolongado y dificultoso que comienza con la introducción del nuevo rasgo. Desde una perspectiva de un mejorador vegetal, sin embargo, esta etapa casi siempre produce una planta que tiene un perfil global menos deseable de rasgos agronómicos que las variedades comerciales actuales.

Además del rasgo doble-LOX nula-MMT nula, existen factores adicionales que también pueden ser considerados en el arte de generar una variedad comercial de cebada útil para malteado y/o elaboración y/o como base para bebidas, por ejemplo rendimiento y tamaño de grano, y otros parámetros que se refieren al desempeño de malteado o desempeño de elaboración. Dado que muchos -si no todos- los rasgos relevantes han mostrado estar bajo control genético, la presente descripción también proporciona cultivares modernos, homocigotos, con elevado rendimiento de malteado, los cuales pueden ser preparados a partir de cruzamientos con plantas de cebada con rasgo doble-LOX nula-MMT nula que están desveladas en la presente solicitud. El mejorador de cebada experto será capaz de seleccionar y desarrollar plantas de cebada, las cuales -siguiendo los cruzamientos cebada con doble-LOX-nula cebada con MMT-nula- resultarán en cultivares superiores. Alternativamente, el mejorador de cebada puede utilizar plantas de la presente invención para mutagenia adicional para generar nuevos cultivares derivados de cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula.

Un procedimiento para asegurar que el rasgo doble-LOX-nula-MMT-nula sea mantenido en las líneas de progenie trata sobre el análisis SNP del gen de LOX-1, el gen de LOX-2 y el gen de MMT. Preferentemente, las actividades de LOX-1, LOX-2 y MMT también son determinadas.

Las plantas de cebada de acuerdo con la presente invención pueden ser introducidas en cualquier esquema de

mejoramiento vegetal adecuado.

Otro objeto es proporcionar plantas de cebada de elite agronómica que comprenden el rasgo doble-LOX-nula-MMT-nula. En consecuencia, esta descripción también está dirigida a procedimientos para producir una nueva planta de cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula mediante cruzamiento de una primera planta de cebada parental con una segunda planta de cebada, donde la primera o segunda planta es una cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula. Adicionalmente, las plantas de cebada parentales primera y segunda pueden venir de una variedad de cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula. Por lo tanto, cualesquiera de dichos procedimientos que utilizan la variedad de cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula son parte de esta descripción: autopolinización, retrocruzamiento, cruzamiento con poblaciones, y similares. Todas las plantas producidas utilizando una variedad de cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula como parental están dentro del alcance de esta invención, incluyendo aquellas plantas desarrolladas a partir de variedades derivadas a partir de una variedad de cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula. La cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula puede también ser utilizada para transformación genética en casos tales donde ADN exógeno es introducido y expresado en la planta o tejido vegetal con doble-LOX-nula-MMT-nula.

Los procedimientos de retrocruzamiento pueden ser utilizados con la presente invención para introducir dentro de otro cultivar el rasgo doble-LOX-nula-MMT-nula de una planta de cebada mutada, por ejemplo del cv. Scarlett, o cv. Jersey, o cv. Quench, o cv. Rosalina, los cuales son cultivares de cebada, contemporáneos, de malteado de elevado rendimiento. En un protocolo de retrocruzamiento estándar, la variedad original de interés, i.e. la planta parental recurrente, es cruzada con una segunda variedad (planta parental no-recurrente), que lleva los genes LOX mutantes de interés a ser transferidos. Las plantas de la progenie resultante con doble-LOX-nula a partir de este cruzamiento son posteriormente cruzadas con la planta parental recurrente, siendo el proceso repetido hasta que una planta de cebada es obtenida donde esencialmente todas las características especificadas por el parental recurrente son recuperadas en la planta generada - además del rasgo doble-LOX-nula-MMT-nula de la planta parental no recurrente. Finalmente, la última planta generada, retrocruzada es autopolinizada para rendir una planta de progenie de mejoramiento vegetal con doble-LOX-nula-MMT-nula pura.

Una forma de acelerar el proceso de mejoramiento vegetal comprende la multiplicación inicial de mutantes generadas mediante aplicación de cultivo de tejidos y técnicas de regeneración. Por lo tanto, otro aspecto de la presente descripción es proporcionar células, las cuales al crecer y diferenciarse producen plantas de cebada que tienen el rasgo doble-LOX-nula-MMT-nula. Por ejemplo, el mejoramiento puede incluir cruzamientos tradicionales, preparación de plantas derivadas de anteras fértiles o utilización de cultivos de microesporas.

Productos de la ruta de LOX

En diversas realizaciones, la presente descripción se refiere a plantas de cebada, y productos de las mismas, que comprenden bajos niveles de T2N y de T2N potencial. Las enzimas LOX catalizan la dioxigenación de ácidos grasos poliinsaturados con un sistema cis-1,cis-4 pentadieno. En cebada, los ácidos grasos poliinsaturados de C₁₈ ácido linoleico (18:2^{Δ9,12}) y ácido α-linolénico (18:3^{Δ9,12,15}) son los sustratos principales de LOX. La ruta de la lipooxigenasa del metabolismo de ácido graso es iniciada mediante la adición de oxígeno molecular en la posición C-9 (mayormente catalizada por LOX-1) o en la posición C-13 (mayormente catalizada por LOX-2) de la cadena de acilo, rindiendo los correspondientes ácidos 9- y 13-HPODEs [9- y 13-hidroperoxi octadecatrienoicos (HPOTEs) son productos cuando el sustrato es ácido α-linolénico, pero los HPOTEs no funcionan como precursores para T2N]. En la rama de la hidroperóxido liasa de la ruta de LOX, tanto los 9- como los 13-HPODEs pueden ser escindidos a oxoácidos y aldehídos de cadena corta (ver **FIG. 1A**). En particular, 9- HPODE puede ser escindido para formar cis-nonenal que es convertido a T2N, mientras que 13-HPODE es el precursor de 2-E-hexenal. Por lo tanto, el 13-HPODE, el producto principal de la dioxigenación catalizada por LOX-2 de ácido linoleico no fue anticipada como un componente corriente arriba en la ruta que conduce a la formación del sabor rancio de T2N.

Es reconocido que la presente descripción abarca la producción influyente de metabolitos corriente abajo de la catálisis de LOX-1 y LOX-2, los cuales no son producidos como un producto directo de una reacción catalizada por LOX-1 o LOX-2, sino como resultado de una serie posterior de reacciones. Estas incluyen isomerizaciones y conversiones espontáneas, inducidas por factores, o catalizadas por enzimas. Por lo tanto, la producción de estos metabolitos corriente abajo podría ser influenciada mediante modulación de la expresión de otros componentes de la ruta, por ejemplo hidroperóxido liasa (HPL).

T2N y DMS y precursores de los mismos

La presente invención se refiere a procedimientos para preparar bebidas con bajos niveles de uno o más sabores indeseables y precursores de los mismos. Preferentemente, dichos sabores indeseables son de T2N y DMS y dichos

precursores de los mismos son el T2N potencial y DMSP, respectivamente.

Un objeto de la presente invención es por lo tanto reducir o eliminar el T2N potencial. Por lo tanto, es un objeto de la presente invención reducir la formación de precursores de T2N y aductos de aldehído. A pesar de que varias reacciones químicas relacionadas con el enranciamiento de la cerveza permanecen difíciles de elucidar, la generación de T2N libre a partir del T2N potencial es reconocida como una causa principal del desarrollo de sabor rancio en productos de cerveza (Kuroda y col., supra). Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar bebidas con bajo nivel de T2N potencial, así como también bebidas con bajo nivel de precursores de T2N.

La mayor parte del T2N potencial es transferido desde el mosto a la cerveza terminada, en la cual el T2N libre puede ser liberado (Liégeois y col., 2002), siendo las condiciones de acidez y temperatura factores importantes en este proceso. Con referencia a la presente invención, el T2N potencial está definido como se describe anteriormente en la presente memoria descriptiva en las definiciones. Otros procedimientos para determinar el nivel del T2N potencial también están disponibles. Con el fin de evitar confusión, el significado de "T2N potencial" en el presente contexto es tal como se describe en la presente memoria descriptiva anteriormente en las definiciones. Las sustancias químicas que tienen la capacidad de liberar T2N o de ser convertidas en T2N son denominadas "precursores de T2N" en la presente memoria descriptiva, y los precursores de T2N determinados o medidos mediante procedimientos alternativos distintos del procedimiento para determinar el T2N potencial son referidos como "precursores de T2N". Los precursores de T2N pueden en particular ser determinados mediante primer tratamiento de una muestra de forma tal que esencialmente todas (preferentemente todas) sus sustancias químicas, que tienen la capacidad de liberar T2N o de ser convertidas en T2N, de hecho liberen T2N y/o se conviertan en T2N, respectivamente. De allí en adelante, se determina el nivel de T2N.

Los granos de cebada de la presente invención no comprenden actividades de LOX-1 y LOX-2 además de no tener actividad de MMT. Interesantemente, dichos granos de cebada contienen muy poco T2N potencial.

Las cervezas producidas utilizando granos de cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula poseerán por lo tanto no solo un muy bajo nivel de T2N, sino también un muy bajo nivel de T2N potencial. Dentro del alcance de la presente descripción están los granos de cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula, los cuales rinden productos de cerveza que contienen muy bajos niveles de T2N potencial, preferentemente menos de 60%, más preferentemente menos de 50% del nivel del T2N potencial de un producto de cerveza similar producido en la misma forma a partir de cerveza de tipo salvaje (preferentemente del cv. Power).

Asimismo, se prefiere que los productos vegetales derivados de granos de cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula posean un muy bajo nivel de precursores de T2N. Dentro del alcance de la presente invención hay productos vegetales preparados a partir de granos de cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula, conteniendo dichos productos vegetales menos de 60%, más preferentemente menos de 50% de precursores de T2N de un producto vegetal similar producido de la misma forma a partir de cebada tipo salvaje (preferentemente del cv. Power).

Es sorprendente que los valores de T2N medidos sean a menudo superiores en muestras de, y en productos a partir de, una materia prima micro-malteada, que aquellos a partir de una materia prima producida en mayor escala, por ejemplo, a partir de una muestra grande malteada a escala piloto de 30-kg. Sin embargo, los valores relativos, experimentales de T2N entre experimentos a gran y a pequeña escala son en general similares.

Similarmente, es sorprendente que los T2N potenciales y los precursores de T2N medidos, a menudo sean superiores en muestras de, y en productos a partir de, una materia prima micro-malteada, que aquellos a partir de una materia prima producida en mayor escala, por ejemplo a partir de una muestra grande malteada a escala piloto de 30-kg. Sin embargo, los valores relativos, experimentales de T2N potenciales entre experimentos a gran y a pequeña escala son en general similares.

Es también un objeto de la presente invención reducir o eliminar el DMS y el DMSP, donde el DMSP es preferentemente SMM.

La cantidad de SMM y de DMS en un producto vegetal puede ser determinada mediante cualquier procedimiento adecuado. El SMM puede ser determinado como se describe en la presente memoria descriptiva anteriormente en la sección "Preparación de plantas de cebada con doble-LOX-nula-MMT-nula", donde se describe la determinación de niveles de SMM en una muestra de cebada. Por lo tanto, el SMM puede ser determinado mediante acoplamiento del mismo a un compuesto, tal como OPA, y determinando fluorescencia, por ejemplo, utilizando un sistema UPLC. Para una medición cuantitativa, se puede determinar el área del cromatograma que corresponde a un pico de SMM.

Para una medida más precisa, las cantidades de DMS y DMSP (tal como SMM), el último compuesto medido como DMS después de la activación, son preferentemente determinadas utilizando cromatografía gaseosa por capilaridad de alta resolución. El DMS total en muestras de mosto o cerveza esta definido en la presente memoria descriptiva como la suma cuantitativa de DMS libre y sus formas precursoras, denominadas DMSP. Utilizando esta definición, la cantidad de DMSP en una muestra de mosto o cerveza puede ser determinada como la diferencia entre el DMS total (medido en la muestra hervida, preferentemente en una muestra hervida en condiciones alcalinas durante 1 h), y DMS libre (medido en una muestra no hervida). El ejemplo 4 detalla modos preferibles para medir los niveles de DMS total y libre.

La cantidad de DMSP y también de SMM en la presente memoria descriptiva esta dada como la concentración de DMS que puede ser liberado a partir de dicho DMSP o dicho SMM hirviendo en condiciones alcalinas durante 1 h.

EJEMPLOS

Los ejemplos de la presente ilustran la invención y no deberán ser considerados como limitantes para la invención.

A menos que sea indicado de otro modo, las técnicas biológicas moleculares básicas fueron llevadas a cabo para manipular ácidos nucleicos y bacterias tal como se describe en Sambrook y Russel (2001).

Ejemplo 1

Relevamiento de la baja actividad de LOX-2 en embriones de cebada germinantes

Material de relevamiento mejorado. Los granos recolectados a partir de plantas de cebada de la línea con LOX-1-nula Ca211901 -generada mediante los cruzamientos (mutante D112 con LOX-1-nula x Jersey) x Sebastian - fueron incubados con el mutágeno NaN₃ de acuerdo con los detalles provistos por Kleinhofs y col. (1978). La mutante de cebada D112 con LOX-1-nula está descrita en WO 2005/087934 y depositada en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110, USA el 11 de Septiembre de 2003, bajo el número PTA-5487.

El procedimiento fue elegido dado que es conocido que induce mutaciones en el ADN genómico de la cebada, confiriendo finalmente sustituciones o truncaciones de residuos de aminoácidos en proteínas codificadas por el ADN mutagenizado. En los experimentos de mutagenia de la presente solicitud, se eligió propagar granos mutados de generación M1 en parcelas de campo a través de dos generaciones posteriores, rindiendo eventualmente una elevada proporción de plantas homocigotas para fines de relevamiento (ver **FIG. 8**). Mientras que los granos de la generación M2 no fueron relevados, principalmente porque se esperaba que éstos contuvieran una relativamente elevada proporción de mutaciones puntuales heterocigotas, los granos mutantes de la generación M3 fueron utilizados como material para relevamiento, esperando 0,9-2,3 mutaciones cada 10000 granos (Kleinhofs y col., supra).

Sorprendentemente, los inventores de la presente encontraron que el análisis de los embriones germinantes proveía resultados de ensayo muy mejorados en comparación con los análisis de extractos de embriones maduros (tal como se describe en el Ejemplo 1 de la solicitud internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860)). Un procedimiento de relevamiento de elevado rendimiento fue por lo tanto establecido para medir la actividad de LOX-2 en los embriones germinantes, incluyendo su tejido de escutelo.

Se aislaron dos embriones a partir de granos maduros de 35125 espigas de cebada (20977 líneas de generación M4 de la mutante D112 con LOX-1-nula, y 14148 líneas de generación M3 de la línea Ca211901 con LOX-1-nula), y se transfirieron a placas para almacenamiento de 96 pocillos (ABgene). La germinación de los embriones fue iniciada siguiendo a la adición de 20 µl de agua a cada pocillo, el cual fue cubierto con un papel tissue Kimnett húmedo y una tapa plástica. Las placas fueron incubadas en bolsas de plástico a 20°C durante 48 h. Después de la incubación, se extrajo la enzima LOX-2; se agregó primero a cada pocillo una perla de vidrio de 5 mm y 200 µl de buffer para extracción (solución de ácido láctico 100 mM, pH 4,5), seguido de molienda durante 35 seg a una frecuencia de 27 seg⁻¹ en un molino de laboratorio MM 300 (Retsch). Posteriormente, la placa fue centrifugada a 4000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga Allegra 6R (Beckman-Coulter), para precipitar el material insoluble. La actividad de LOX-2 fue determinada básicamente como se describe para el análisis de la actividad de LOX-2 de extractos de embriones maduros (ver Ejemplo 1 en la solicitud internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860)), difiriendo solamente en el uso de solamente 30 µl de extracto por ensayo, en lugar de 40 µl.

Identificación de mutantes potenciales. Como se describe anteriormente, dos granos de cada una de las 35125 líneas de cebada mencionadas anteriormente, fueron analizadas en cuanto a actividad de LOX-2, con el objeto de identificar granos altamente reducidos en dicha actividad cuando son comparados con los granos con LOX-1-nula y de tipo salvaje. Se identificaron un total de 7 mutantes potenciales de partida en la generación M3 de la línea Ca211901. Estas fueron adicionalmente propagadas en el invernadero, cosechadas, y después relevadas nuevamente en busca del rasgo relacionado con muy baja actividad de LOX. Finalmente, solamente una mutante de la línea Ca211901, denominada mutante A689, demostró no exhibir esencialmente actividad de LOX-2. Mediciones detalladas de la actividad total de LOX fueron llevadas a cabo con extractos de embriones germinados en los cuales la actividad de LOX era conferida casi exclusivamente por LOX-2 (Schmitt y van Mechelen, 1997). Para embriones germinados de granos M3 de la mutante A689, la actividad total de LOX – tal como se determina mediante el ensayo colorimétrico de LOX – fue de $0,163 \pm 5,5\%$ U A₅₉₅/embrión germinado, mientras que para la variedad madre Ca211901 con LOX-1-nula fue de $1,224 \pm 3,8\%$ U A₅₉₅/embrión germinado (el valor correspondiente para la mutante de partida D112 con LOX-1-nula fue de $1,215 \pm 6,0\%$ U A₅₉₅/embrión germinado). Las semillas de la línea de cebada A689 han sido depositadas el 4 de Diciembre de 2008 con el nombre "Barley, Hordeum vulgare L.; Línea A689" en la American Type Culture Collection (ATCC), Depositario para Patentes, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, United States (número de depósito PTA-9640).

Se describe un análisis para HPODE en la mutante A689 en el Ejemplo 4 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), véase más adelante.

Las propiedades de la mutante A689 están descritas en el Ejemplo 5 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860).

La secuenciación del gen para LOX-2 en la mutante de cebada A689 se describe en el Ejemplo 10 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860) y la Tabla 7 de la misma resume las mutaciones en los genes de LOX-1 y LOX-2 de la mutante A689.

Un procedimiento para detectar la mutante A689 con doble-LOX-nula se describe en el Ejemplo 11 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860). El procedimiento es un procedimiento basado en SNP para detectar la mutación en LOX-1 y la mutación en LOX-2.

Ejemplo 2

Relevamiento para mutantes de cebada con MMT-nula

Los granos recolectados a partir de plantas de cebada del cv. Prestige y cv. Sebastian fueron incubados separadamente con el mutágeno NaN₃, siguiendo los detalles experimentales provistos por Kleinhofs y col. (1978). Este procedimiento fue elegido debido a su conocido potencial para inducir mutaciones puntuales en el ADN genómico de la cebada.

En los experimentos, los granos mutados de la generación M1 fueron propagados en parcelas de campo a través de dos generaciones posteriores, rindiendo finalmente una elevada proporción de plantas homocigotas de generación M3 para fines de relevamiento. Se esperaba que los granos mutados de la generación M3 contuvieran mutaciones de gen con una frecuencia de 0,9-2,3 cada 10000 granos (Kleinhofs y col., supra). Es sorprendente que los granos M2 no fueron relevados.

Interesantemente, la presente descripción describe un procedimiento de relevamiento rápido de elevado rendimiento para la detección de granos de cebada mutantes M3 que carezcan de actividad de MMT, proveyendo falta de síntesis de SMM detectable durante el malteado. Así, los inventores encontraron que el SMM se acumulaba principalmente en el coleóptido y la hoja primaria de la cebada germinante, y que la detección de SMM puede ser llevada a cabo mediante extracción de aminoácidos a partir de tejido foliar aplastado de granos germinados de 4 días de edad, seguido de reacción de los aminoácidos extraídos con OPA para formar productos altamente fluorescentes (ver FIG. 2).

En términos prácticos, cada ensayo fue llevado a cabo mediante germinación - en una bolsa de plástico cerrada con una porción de papel de filtro Whatman #1 (296 x 20,9 mm) - de dos granos de cada una de las 94 mutantes potenciales y dos plantas de tipo salvaje. El ensayo fue repetido para granos múltiples, mutantes potenciales (ver a continuación). Al comienzo de la germinación, se agregaron 25 ml de agua de red a dicha caja plástica, seguido de 15 ml adicionales de agua de red a los 2 días de la germinación. Después de 4 días de germinación, se transfirieron

1-3 cm de tejidos foliares a placas para almacenamiento (ABgene), en las cuales cada uno de los 96 pocillos de 1,2-ml contenía una perla de vidrio de 5 mm de diámetro y 500 µl de una mezcla 12:5:6 (v/v/v) de agua:metanol:cloroformo. La placa fue después agitada durante 45 seg a una frecuencia de 30 Hz en un molino de laboratorio MM 300 (Retsch). Posteriormente, la placa fue transferida a una centrífuga (Rotanta 460R, Hettich), y girada a 4000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente para precipitar el material insoluble. Se transfirieron 10 µL del sobrenadante a una placa para almacenamiento de 96 pocillos (Waters, cat no. 186002481), y se mezclaron con 200 µl de H₂O y 60 µl de una solución de reacción que contiene una mezcla 15000:45 (v/v) de reactivo OPA (Sigma, cat.no. P7914):ácido 3-mercaptopropiónico (Aldrich, cat.no. M5801). La mezcla fue incubada a 4°C durante al menos 10 min para obtener una derivatización cuantitativa de aminoácidos de la muestra con OPA. Utilizando un sistema UPLC basado en Waters equipado con un detector de fluorescencia, se separaron 2 µl de la mezcla derivatizada sobre una columna de C18 Gemini de 2,1 x 30 mm de partículas de 3 µm (Phenomenex, cat.no. 00A-4439-80), utilizando elución por gradiente mezclando fase móvil A (un buffer NaH₂PO₄ 40-mM, ajustado a pH 7,8) y fase móvil B [una solución 45:45:10 (v:v:v) de acetonitrilo:metanol:agua tal como se describe (Phenomenex, 2006). La excitación de los derivados de OPA eluidos fue a 340 nm, mientras que la emisión de luz fue medida a 450 nm. Un ejemplo de un cromatograma se muestra en la **FIG. 2** para ilustrar el perfil de elución de ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser) y SMM. El último compuesto fue incluido, dado que el objetivo global del proyecto fue identificar una planta de cebada que careciera de la capacidad de sintetizar SMM, es decir una planta para la cual el correspondiente pico de cromatograma fue muy pequeño o preferentemente ausente.

Un total de 10248 y 3858 granos de cebada del cv. Prestige y del cv. Sebastian, respectivamente, mutados con NaN₃ fueron relevados en cuanto a contenido de SMM, con el objeto de identificar aquellos altamente reducidos en dicho contenido cuando se los comparaba con los granos de tipo salvaje. Solamente 2 mutantes potenciales de la generación M3 fueron identificados, a saber, granos de la muestra no. 8063 (derivados a partir del cv. Prestige, y, de aquí en adelante, denominado Mutante 8063, una designación también utilizada para granos de generaciones posteriores), y granos de la muestra no. 14018 (derivados a partir del cv. Sebastian, y, de aquí en adelante, denominado Mutante 14018, una designación también utilizada para granos de generaciones posteriores). Los granos de cada una de las mutantes fueron propagados a la generación M4, después cosechados, y finalmente re-analizados. El resultado verificó que los granos de la Mutante 8063 y de la Mutante 14018 tenían contenidos de SMM extremadamente bajos, posiblemente carecieran totalmente de SMM.

El análisis de Western blot ha verificado que la Mutante 8063 y la Mutante 14018 carecían de la enzima MMT (ver Ejemplo 3 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)).

Asimismo, las mediciones de actividad de MMT han verificado que la Mutante 8063 carece de actividad de MMT (ver Ejemplo 4 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)).

La secuenciación del gen para MMT en la mutante de cebada 8063 como se describe en el Ejemplo 9 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288) reveló una transición de bases G→A en la primera base del intrón 5 (nucleótido no. 3076 de la SEQ ID NO:8 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)). La secuenciación del gen para MMT en la mutante de cebada 14018 como se describe en el Ejemplo 14 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288) reveló una transición de bases G→A en un sitio de splicing inmediatamente corriente abajo del exón 2 en la primera base del intrón 2, más específicamente en el nucleótido no. 1462.

Se ha confirmado adicionalmente que el ARNm de MMT está truncado en la mutante 8063 (ver Ejemplo 11 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)) y que la proteína MMT mutante codificada por dicho ARNm truncado no tiene actividad de MMT (ver Ejemplo 12 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)). También se ha confirmado que el ARNm de MMT está truncado en la mutante 14018 (ver Ejemplo 15 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)) y que la proteína MMT mutante codificada por dicho ARNm truncado no tiene actividad de MMT (ver Ejemplo 16 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)).

Un procedimiento para detectar la presencia de la mutación en el gen de MMT de la mutante 8063 se describe en el Ejemplo 11 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288), y un procedimiento para detectar la presencia de la mutación en el gen de MMT de la mutante 14018 se describe en el Ejemplo 17 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288).

Ejemplo 3

Cruzamientos de cebada

La **FIG. 3** resume cómo la línea de cebada con doble-LOX nula-MMT nula de la presente invención fue desarrollada mediante primero cruzamiento de la línea de cebada A689 [doble LOX-nula ver solicitud de patente PCT no PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860)] con la línea 8063 [MMT-nula ver Solicitud de Patente PCT No. PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288)]. Utilizando técnicas de mejoramiento estándar, las líneas doble haploides fueron desarrolladas, y propagadas en el invernadero. De éstas, las líneas con mejor desempeño con respecto al desempeño agronómico - así como también una ausencia de actividad de LOX-1 (ver Ejemplo 2 en la Patente de EE.UU. No. 7.420.105 de Breddam, K. y col.), una ausencia de actividad de LOX-2 (ver Ejemplo 2 en la Solicitud PCT No. PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860), y Ejemplo 1 de la presente), así como también una ausencia de SMM y de actividad de MMT (Ejemplos 2 y 4 (véase más adelante) en la Solicitud PCT No. PCT/DK2009/050315 ((publicada como WO 2010/063288), y Ejemplo 2 de la presente) - fueron seleccionadas para propagación y análisis adicional. Estas líneas son denominadas en la presente memoria descriptiva "Triple-Nula". En general para determinaciones de actividad de LOX, las semillas de líneas doble haploides fueron cosechadas y seguidas de análisis de 12 granos para cada línea y variedades control, brindando una desviación estándar <5% para las mediciones (**FIG. 4**).

Ejemplo 4

Determinación de los niveles de SMM

Se llevó a cabo la medición de SMM esencialmente como se describe en la Solicitud PCT PCT/DK2009/050315 (publicada como WO 2010/063288). Primero, se extrajo el SMM a partir de secciones de hojas de cebada de 1-3-cm de largo que fueron ubicadas en pocillos de 1,2-ml de placas de microtítulo, en las cuales cada pocillo contenía una perla de vidrio de 5 mm de diámetro y 500 µl de una mezcla 12:5:6 (v/v/v) de agua:metanol:cloroformo. La placa fue después incubada durante 45 seg en un molino de laboratorio MM 300 (Retsch), electrónicamente ajustado para agitar a una frecuencia de 30 Hz. Después de la centrifugación, se transfirieron 10 µl del sobrenadante a una placa para almacenamiento de 96 pocillos (Waters, cat no. 186002481), y se mezcló con 200 µl de agua y 60 µl de una solución de reacción que contiene una mezcla 15000:45 (v/v) de reactivo OPA (Sigma, cat. No. P7914):3-ácido mercaptopropiónico (Aldrich, cat. No. M5801). La mezcla fue incubada a 4°C durante al menos 10 min para derivatizar cuantitativamente aminoácidos de la muestra con OPA. Utilizando un sistema UPLC (Waters) equipado con un fluorómetro, se separaron 2 µl de la mezcla derivatizada en una columna C18 Gemini de 2,1 x 30 mm de partículas de 3 µm (Phenomenex, cat. No. 00A-4439-80), utilizando un buffer fosfato de Na 40 mM, ajustado a pH 7,8, y conteniendo una solución 45:45:10 (v:v:v) de acetonitrilo:metanol:agua como la fase móvil (Phenomenex 2006). La excitación de los derivados de OPA fue a 340 nm, mientras que la emisión de luz fue medida a 450 nm. Un ejemplo de un cromatograma se muestra en la **FIG. 5** para ilustrar el perfil de elución de ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser) y SMM a partir del tipo salvaje y la mutante Triple-Nula. Se observó una sorprendente falta de capacidad para sintetizar SMM para la mutante Triple-Nula.

Ejemplo 5

Desempeño agronómico

Los cultivares comerciales de cebada Quench y Power, así como también las plantas LOX-1-nula, MMT-nula, LOX-1 nula-LOX-2 nula (doble-LOX-nula), LOX-1 nula-MMT nula y Triple-Nula, fueron evaluadas en ensayos a campo para comparar sus desempeños agronómicos. Los datos fueron regularmente obtenidos para altura de la planta, fecha de espigado, resistencia a enfermedad, encamado, tiempo de maduración y rendimiento (ver **Tabla 1**).

Los ensayos fueron llevados a cabo de acuerdo con procedimientos estándar para ensayos a campo. En consecuencia, cantidades iguales de granos de variedades comerciales y las líneas mutantes fueron sembradas en macetas de 7,88 m² en 2 ubicaciones, cada una comprendiendo 3 replicaciones. No se observaron diferencias importantes con respecto a los rasgos agronómicos entre mutantes y las variedades comerciales. El análisis de calidad de la cebada de las diferentes líneas mutantes demostró que todos los granos cosechados poseían propiedades buenas y aceptables con respecto a malteado y elaboración de cerveza.

Ejemplo 6

Micro-malteados y micro-maceraciones

Instalación experimental

Se llevaron a cabo experimentos de micro malteados y micro maceraciones con las siguientes seis líneas y cultivares de cebada (**FIG. 6A**), el cual ilustra también el flujo de trabajo experimental descrito en la presente memoria descriptiva más adelante: (1) Triple-Nula; (2) LOX-1 nula-MMT nula; (3) LOX-1 nula-LOX-2 nula (línea de cebada A689); (4) MMT- nula (línea de cebada 8063); (5) LOX-1 nula (línea de cebada D112); (6) cv. Power.

Se realizó un experimento de micro malteado con tres muestras de cebada de 225 g a partir de las líneas o cultivares anteriormente mencionados. El remojo y la germinación fueron llevados a cabo como sigue:

(i) remojo a 16°C: 3 h húmedo; 21 h seco; 3 h húmedo; 21 h seco; 3 h húmedo; 21 h seco; contenido final de agua 45%;

(ii) germinación: 48-72 h a 16°C hasta modificación >95%.

Después de la germinación, las tres muestras fueron sometidas a diferentes regímenes de secado (indicado como secado en horno en la **FIG. 6A**):

(i) 85°C - Secar: 12,5 h comenzar a 30°C y aumentar a 55°C seguido de 7,5 h aumentando hasta 85°C; 1,5 h a 85°C;

(ii) 75°C - Secar: 12,5 h comenzar a 30°C y aumentar a 55°C seguido por 7,5 h aumentando hasta 75°C; 1,5 h a 75°C;

(iii) 40°C - Secar: 48 h a 40°C.

Las muestras secadas a 85°C y a 40°C fueron procesadas inmediatamente después de la germinación mientras las muestras restantes fueron congeladas durante 2 días, descongeladas y posteriormente secadas a 75°C como se describió anteriormente.

Se llevó cabo una micro-maceración mezclando muestras de 90 g de una malta molida con 270 ml de agua de red, seguido de incubación en botellas de 500 ml a 40°C durante 20 min. La temperatura fue aumentada a 65°C en 25 min, seguido de una pausa de sacarificación de 60 min de duración a 65°C. A continuación, la temperatura fue elevada a 78°C en un lapso de 13 min antes de una fase de detención de la maceración de 10 min de duración a 78°C. El mosto resultante fue después enfriado sobre hielo, diluido con 700 ml de agua de red enfriada con hielo y filtrada a través de un filtro plegado MN-616¼ (Macherey-Nagel). 400 ml de mosto fueron transferidos a una botella de 500 ml, tapada ajustadamente y calentada durante 60 min en un baño de agua hirviendo. Las botellas fueron dejadas en el baño de agua sin calentamiento adicional durante un período adicional de 60 min.

Datos de los niveles de DMSP

Para examinar cómo diversas temperaturas de horno afectan el contenido de DMSP en maltas de tipo salvaje y mutantes de la presente solicitud, los granos fueron primero micro-malteados y posteriormente separados en alícuotas antes de hornear a diferentes tres temperaturas, 40°C, 75°C y 85°C.

Los granos de líneas de cebada que contienen el gen MMT de tipo salvaje fueron caracterizados por elevados niveles de DMSP en la malta final. Sin embargo, se midieron reducidos niveles a continuación de hornear a más elevadas temperaturas (**Tabla 2**). En contraste, notablemente, se midieron bajos niveles de DMSP en todas las maltas de genotipos con MMT nula.

Los niveles de DMSP fueron después medidos en los mostos producidos a partir de las maltas anteriormente mencionadas, dando niveles de DMSP en correspondencia con aquellos medidos en las maltas. El hallazgo está en línea con los resultados previos de Dickenson y Anderson (1981), que describen una ajustada correlación entre el contenido de DMSP de malta y mosto. Para todos los genotipos de MMT nula, se midieron notablemente bajos niveles de DMSP en los correspondientes mostos, independientemente de la temperatura de secado en horno con la cual fue hecha la malta.

Datos de los niveles de precursores de T2N y de T2N libre

Para examinar cómo diversas temperaturas de secado en horno afectan los niveles de T2N libre y de precursores de T2N, se determinaron las concentraciones de dichos compuestos en mosto dulce y mosto enfriado producido mediante micro-malteados y micro-maceraciones como se describieron precedentemente en la presente memoria descriptiva. Los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

Para mosto de malta de tipo salvaje, la temperatura de secado en horno tuvo un notable efecto sobre la concentración de T2N y de precursores de T2N. Fue absolutamente necesaria una elevada temperatura de horneado para evitar una elevada producción de precursores de T2N cuando se utilizó una malta de tipo salvaje.

La temperatura de horneado tuvo menos efecto en la generación de T2N y su aducto de malta LOX-1 nula-MMT nula.

Es también notable que para los mostos de malta Triple-Nula, las concentraciones de T2N libre y sus precursores fueron bajas en todas las muestras, independientemente de la temperatura de secado en horno.

Ejemplo 7

Micro-maceraciones con cebada no malteada

Se lograron micro-maceraciones con cebada no malteada del cv. Power y Triple-Nula mezclando muestras de 90 g de cebada molida con 270 ml de agua de red así como 0,12 g de la mezcla de enzimas para fabricación de cerveza de cebada Onda Pro (Novozymes), seguido de incubación en botellas de 500 ml a 54°C durante 30 min. La temperatura fue incrementada a 64°C en 10 min, seguido de una pausa de sacarificación durante 45 min de duración a 64°C. Esto fue seguido por un incremento de 14 min a 78°C antes de una fase de detención de la maceración de 10 min de duración a dicha temperatura. Se llevaron a cabo posteriores procedimientos de enfriado, dilución, filtración y calentamiento como se describió para las micro-maceraciones (ver Ejemplo 4).

Se midieron los niveles de DMSP en los mostos producidos a partir de harinas de cebada del cv. Power y Triple-Nula (**Tabla 4**). Fue evidente que los contenidos de DMSP en mosto producido de cebada Triple-Nula fueron marcadamente más bajos que aquellos del tipo salvaje, cv. Power. Este fue un hallazgo sorprendente ya que la cebada no se considera que contenga DMSP (Yang, B. y col.: Factors involved in the formation of two precursors of dimethylsulphide during malting, J. Am. Soc. Brew. Chem. 56:85-92, 1998).

Como se mostró en la Solicitud de patente PCT No. PCT/DK2009/050355 (publicada como WO 2010/075860) (ver FIG. 12 y Ejemplo 9 en dicha solicitud), los niveles de precursores de T2N de mostos hervidos, de fabricación de cebada y normales, fueron notoriamente bajos en las muestras de doble LOX nula. En consecuencia, se espera que una propiedad similar caracterice los mostos de cebada Triple-Nula, haciendo de la cebada Triple-Nula una materia prima premium para bebidas de fabricación de cerveza de cebada bajas en, o completamente carentes de, los sabores indeseables de T2N y DMS.

Ejemplo 8

Malteado y fabricación de cerveza en escala piloto

Instalación experimental

Los análisis en el malteado y la fabricación de cerveza con malta de Triple-Nula y del cv. Quench (malta de referencia) implicaron los siguientes pasos: (i) malteado; (ii) preparación del mosto; (iii) separación del mosto; (iv) hervido del mosto; (v) fermentación del mosto con la levadura *Saccharomyces carlsbergensis*; (vi) estacionado de la cerveza; (vii) filtración de la cerveza brillante; y (viii) embotellado de la cerveza (ver **FIG. 6B,C**).

Los experimentos en el malteado fueron llevados a cabo con granos de Triple-Nula y del cv. Quench en escalas de 20 kg, realizados en una fábrica de malta como sigue:

- (i) remojar a 16°C: 1 h húmedo; 1 h seco; 1 h húmedo; 1 h seco; 1 h húmedo; contenido final de agua 45%;
- (ii) germinar durante 120 h, comienzo a 16°C y descendiendo a 14°C;
- (iii) secar durante 14 h, comenzando a 65°C y aumentando a 85°C; 3 h a 85°C.

Para la maceración de ambos Triple-Nula y del cv. Quench (el último utilizado como referencia), se utilizaron muestras de malta de 25 kg. Siguiendo a la molienda de las muestras individuales de malta, se agregó agua de red para dar volúmenes de 146 l. El comienzo de la maceración fue realizado a 40°C durante 20 min, seguido por un ascenso de 25 min desde 40°C a 65°C. La pausa de sacarificación a 65°C fue de 60 min, seguido de una fase de 13 min de calentamiento a 78°C, y 10 min de detención de la maceración a 78°C.

Una muestra de mosto del cv. Quench tipo salvaje y una de Triple-Nula fueron hervidas separadamente durante 60 min a 101°C (dando por resultado un 6,7% de evaporación), mientras que las restantes dos muestras fueron calentadas a 98°C durante 60 min (dando por resultado un 3,9% de evaporación). Las restantes etapas de fabricación como se refirió en la presente memoria descriptiva anteriormente –es decir filtración, separación por remolino, fermentación, estacionado y envasado en botellas de vidrio verde – se realizaron de acuerdo con prácticas estándar de fabricación de cerveza.

Los niveles de DMSP y DMS fueron medidos esencialmente como se describe en Hysert y col. (1980), con la detección de azufre específico utilizando cromatografía de gas de espacio en cabeza sobre un detector de quimioluminiscencia de azufre 350B (Sievers). El muestreo del espacio en cabeza fue realizado utilizando un equipo automatizado HS-40 (Perkin Elmer).

Los niveles totales de DMS, es decir, la suma de DMS y DMSP libres, en mosto y extractos de malta verde y horneada, fueron obtenidos hirviendo muestras respectivas en condiciones alcalinas durante 1h. Las muestras hervidas y no hervidas fueron después sometidas a un análisis del espacio en cabeza para la determinación de los niveles de DMS. La diferencia entre DMS total (medido en las muestras hervidas) y DMS libre (medido en las muestras no hervidas) fue definido como igual a la cantidad de DMSP presente en las muestras. La cantidad de DMS libre en la cerveza fue determinada esencialmente como tal en el mosto (Hysert y col., supra).

Datos de los niveles de DMSP / DMS y precursor de T2N/ T2N libre en muestras de mosto

Utilizando equipamiento de fabricación de cerveza moderno, se requiere normalmente la evaporación de 6-10% del mosto con el objeto de lograr niveles de DMS satisfactorios en la correspondiente cerveza terminada, -es decir, [DMS]<50 ppb, que es el nivel de umbral de gusto humano para sabor indeseable. Con base en estos hechos, se diseñaron ensayos de fabricación de cerveza pilotos como se describe precedentemente. El objetivo era ensayar el efecto del ingreso reducido de energía, tal como la no ebullición durante incubación presurizada, sobre los niveles de DMS en los mostos y en la cerveza final. De manera concordante, el desarrollo experimental incluyó una comparación con ebullición del mosto de acuerdo con condiciones estándar.

Se midieron elevados niveles de DMSP y DMS libre durante el calentamiento de los mostos del cv. Quench, con un incremento en los niveles de DMS libre observados con el transcurso del tiempo en el mosto presurizado. En contraste, el mosto hervido, evaporado, acumuló menos DMS hasta el final de la ebullición, después de lo cual el DMS libre se acumulaba nuevamente. En paralelo con los resultados siguientes a las micro-maceraciones como se describe precedentemente en la presente memoria descriptiva, los mostos de malta Triple-Nula a escala piloto fueron caracterizados por extremadamente bajos niveles de DMSP y DMS libre comparados con muestras similares derivadas a partir del cv. Quench (ver **Tabla 5**). Vale la pena notar que incluso en el mosto, dichos niveles de DMS de la malta Triple-Nula estuvieron bien por debajo del nivel de umbral de sabor de 50 ppb.

Las concentraciones de precursores de T2N y T2N libre en mosto y cerveza a partir de malta de tipo salvaje del cv. Quench y Malta Triple-Nula fueron determinadas mediante GC-MS siguiendo derivatización de carbonilos con O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina, esencialmente como descrito por Gronqvist y col. (1993).

Se midieron elevadas concentraciones de precursores de T2N durante el calentamiento de mosto del cv. Quench, con un máximo hallado en el comienzo del tratamiento de ebullición/calor (**Tabla 6**). Para mosto hecho a partir de la malta Triple- Nula se hallaron niveles notablemente inferiores de precursores de T2N (aproximadamente 40% de aquellos cuando se utiliza material de partida de tipo salvaje) –también con un máximo en el comienzo del tratamiento de ebullición/calor. Un régimen de calentamiento de baja energía (es decir, aplicación de un tratamiento de calor presurizado) tuvo sólo menores efectos en los niveles de precursores de T2N para ambos tipos de malta. En todas las muestras de mosto, se determinaron bajos niveles de T2N libre.

Es notable que el efecto beneficioso de las mutaciones LOX-1-nula y LOX-2-nula es claramente visible, incluso cuando se aplica un reducido ingreso de energía durante el calentamiento del mosto.

Datos de los niveles de DMS y precursores de T2N / T2N libre en muestras de cerveza

Se midió la concentración de DMS en la cerveza fresca hecha a partir de malta Triple- Nula así como a partir de malta de tipo salvaje del cv. Quench utilizando los dos regímenes diferentes de ebullición/calentamiento como se describen precedentemente en la presente memoria descriptiva. Los resultados se resumen en la **Tabla 7**.

La cerveza producida a partir de malta de tipo salvaje del cv. Quench utilizando un régimen de ebullición estándar

contiene 65 ppb de DMS, es decir, levemente por encima del umbral de sabor de 50-ppb. Utilizando un procedimiento de ahorro de energía tal como “sin ebullición a través de incubación presurizada” como se describe precedentemente en la presente memoria descriptiva con malta de tipo salvaje dio por resultado una muy elevada concentración de DMS (151 ppb) en la cerveza final.

En contraste, la cerveza producida a partir de la malta Triple-Nula contenía muy bajos niveles de DMS, independientemente del proceso de calentamiento.

Independientemente del procedimiento aplicado de preparación del mosto, la cerveza producida a partir de malta Triple-Nula contenía muchos menos precursores de T2N, (dando como resultado una reducción de 56 a 58%) que la cerveza producida a partir de malta de tipo salvaje del cv. Quench independientemente del procedimiento de ebullición (**Tabla 7**).

Los niveles de T2N libre en cerveza fresca fueron bajos en las cuatro cervezas frescas ensayadas (es decir, utilizando malta del cv. Quench o Triple-Nula combinada con preparación del mosto con evaporación permitida o presurizada), pero después de envejecimiento forzado durante 2 semanas a 37°C, se observó una marcada diferencia. Mientras ambas cervezas producidas a partir de malta de tipo salvaje producidas con ebullición estándar o calentamiento presurizado, contenían 0,041 ppb y 0,061 ppb de T2N, respectivamente, los valores correspondientes para cervezas producidas a partir de malta Triple-Nula fueron inferiores, es decir, reducidos a 95% y 64%, respectivamente. (Tabla 7).

Datos en espuma de cerveza

Se compararon cerveza fabricada en forma piloto, producida con evaporación o presurización en el calentamiento del mosto, del cv. Quench (ver **FIG. 6B**) y maltas Triple-Nula (ver **FIG. 6C**). Las cervezas fueron tomadas en el punto de muestra 9 (ver **FIG. 6B,C**), desgasificadas durante 20 min en un baño ultrasónico antes que se agregaran 50 ml de H₂O a 150 ml de cerveza. La mezcla fue vertida lentamente dentro de una torre de espuma, consistente en un tubo de vidrio de 16 cm de longitud, 7 cm de ancho (con un filtro de vidrio y conector en el fondo y en la parte superior, respectivamente). Se burbujeó gas N₂, a un caudal de 400 ml/min, a través de la mezcla desde el fondo para generar espuma de cerveza. Esta fue conducida a través de un tubo y recolectada en un cono de sedimentación graduado posicionado sobre una balanza.

Se registró el peso de espuma total para cada una de las cuatro cervezas a intervalos de 5 min hasta que cesó el desarrollo de espuma (**FIG. 7**). Los niveles de espuma fueron similares, en forma irrespectiva de los procedimientos de evaporación o presurización. Sin embargo, el desarrollo de espuma fue notablemente mejorado en aquellas cervezas donde se utilizó malta Triple-Nula como materia prima.

Degustación de cerveza

Un panel de expertos catadores evaluaron las cuatro cervezas producidas (es decir utilizando malta del cv. Quench o Triple-Nula combinada con preparación de mosto con evaporación permitida o presurizada), tanto cerveza fresca como después de envejecimiento forzado durante 1 y 2 semanas a 37°C (**Tabla 8**).

La cerveza fresca producida a partir de malta Triple-Nula obtuvo el mayor Puntaje de Sabor Total, independientemente del procedimiento de ebullición. En contraste, un Puntaje de Sabor Total levemente inferior fue obtenido por la cerveza producida a partir de malta de tipo salvaje y utilizando el régimen de ebullición estándar; se la consideró “levemente DMS”. La aplicación de la técnica de calentamiento presurizada dio por resultado una cerveza con un muy bajo Puntaje de Sabor Total, y fue considerada “Fuertemente DMS”.

Después de envejecimiento forzado durante 1 o 2 semanas a 37°C las cervezas producidas a partir de malta Triple-Nula obtuvieron puntajes de envejecimiento total marcadamente inferiores que las cervezas producidas a partir de malta de tipo salvaje, especialmente debido a un puntaje reducido para el atributo “sabor a papel” (papery), originado a partir de bajas concentraciones del componente de envejecimiento T2N.

Ejemplo 9

Malteado y fabricación de cerveza en escala piloto

Disposición experimental

Los análisis de malteado y fabricación de cerveza con malta Triple-Nula (doble LOX nula-MMT nula), y cv. Rosalina (referencia de tipo salvaje), implicaron las siguientes etapas: (i) malteado; (ii) preparación de mosto; (iii) separación del mosto; (iv) ebullición del mosto; (v) fermentación del mosto con la levadura *Saccharomyces carlsbergensis*; (vi) estacionamiento (lagering) de la cerveza; (vii) filtración de la cerveza brillante; y (viii) embotellado de la cerveza.

Los experimentos de malteado fueron llevados a cabo con granos de Triple-Nula y cv. Rosalina en experimentos a gran escala de 21 kg, en una maltería como sigue:

- (i) remojado a 16°C: 1 h húmeda; 1 h seca; 1 h húmeda; 1 h seca; 1 h húmeda; escurrido de agua durante 36 h hasta un contenido de agua final de 45%;
- (ii) germinación durante 120 h, partiendo a 16°C y descendiendo hasta 14°C;
- (iii) el secado/horneado de los granos germinados fue con un programa de temperatura normal o un programa de baja temperatura en un horno piloto;
- (iv) programa de secado/horneado normal, partiendo desde 45°C con aumento hasta 85°C durante 14 h, seguido por incubación durante 2 h a 85°C;
- (v) programa de secado/horneado a baja temperatura, comenzando a 45°C y con aumento hasta 75°C durante 12 h, seguido por incubación durante 2 h a 75°C.

Para maceraciones de ambos Triple-Nula y cv. Rosalina, se utilizaron muestras de malta de 34 kg. Siguiendo a la molienda de las muestras individuales de malta, se agregó agua de red para dar volúmenes de 180 l. El comienzo de la maceración fue llevado cabo a 60°C durante 20 min, seguido de un incremento de 5 min desde 60°C a 65°C. La pausa de sacarificación a 65°C fue de 60 min, seguida de una fase de calentamiento durante 13 min hasta 78°C, y 10 min de detención de la maceración a 78°C.

Las muestras de mosto de cv. Rosalina tipo salvaje y de Triple-Nula fueron o bien hervidas separadamente, durante 60 min a 100°C en un recipiente abierto (dando por resultado un 4,5% de evaporación), o bien calentadas a 99,5°C y mantenidas a 99,5°C durante 60 min en un recipiente cerrado (dando por resultado un 0% de evaporación).

Se prepararon seis mostos diferentes con diferentes combinaciones de cultivar, condiciones de horneado y condiciones de cocción (ver **Tabla 9**).

Las restantes etapas de fabricación de cerveza como han sido referidas en la presente memoria descriptiva anteriormente, - es decir separación por remolino, fermentación, estacionado, filtración y envasado en botellas de vidrio verde - fueron de acuerdo con especificaciones para la práctica estándar de fabricación de cerveza.

Los niveles de DMSP y DMS fueron medidos como se describió precedentemente en la presente memoria descriptiva en el Ejemplo 8.

Datos de niveles de DMSP / DMS en muestras de malta

En una planta moderna de malteado, es normalmente requerido el secado de granos con una temperatura de curado a 85°C durante al menos 2 h con el fin de reducir DMSP en malta a un nivel bajo - es decir menos de 4,5 mg/kg de malta - con el fin de obtener una malta a partir de la cual se pueda obtener un mosto con un nivel de DMS satisfactorio (ver más adelante).

Con base en estos hechos, se han diseñado ensayos piloto de malteado como se describió anteriormente. El objetivo fue ensayar el efecto de ingreso reducido de energía, tal como baja temperatura de secado, en los niveles de DMS y DMSP en las maltas, mostos y cerveza final. En consecuencia, la instalación experimental incluyó una comparación con granos secados de acuerdo con condiciones estándar.

En la malta preparada con cv. Rosalina utilizando secado estándar a 85°C, el DMSP fue medido a 4,7 mg/kg de malta. En la malta de cv. Rosalina preparada con secado a 75°C, el DMSP fue medido a 16,2 mg/kg (**Tabla 10**). En la malta preparada con granos de Triple-Nula, se obtuvieron niveles extremadamente bajos de DMSP, realmente por debajo del límite de detección, independientemente de la temperatura de secado.

Datos de niveles de DMSP / DMS en muestras de mosto

Utilizando moderna tecnología de fabricación de cerveza, normalmente se requiere al menos una hora de cocción con una evaporación de 4,5-10% del mosto con el fin de lograr niveles de DMS satisfactorios en la correspondiente

cerveza terminada - preferentemente [DMS]<50 ppb. Con base en estos hechos los ensayos en la fabricación de cerveza fueron diseñados como se describió anteriormente. El objetivo fue ensayar el efecto del aporte reducido de energía, tal como baja temperatura de secado de granos o tratamiento de calor sin evaporación en un recipiente cerrado, sobre los niveles de DMS en los mostos y en la cerveza final. En consecuencia, la instalación experimental incluyó una comparación con secado de grano y cocción de mosto de acuerdo con condiciones estándar.

Se midieron elevados niveles de DMSP y DMS libre durante el calentamiento de mostos de cv. Rosalina preparados con secado normal. Se observó un aumento en los niveles de DMS libre a lo largo del tiempo en el recipiente cerrado. En contraste, el mosto hervido, evaporado acumuló menos DMS hasta el final de la cocción, después de la cual se acumuló DMS libre nuevamente. (**Tabla 11**) Utilizando un secado a baja temperatura con cv. Rosalina los niveles de DMSP y DMS fueron mucho más altos que con secado normal. En los tres mostos preparados con cv. Rosalina el mosto final tuvo un nivel de DMS superior a 50 ppb.

En paralelo con otros resultados descritos precedentemente en la presente memoria descriptiva, el mosto de malta Triple-Nula se caracterizó por niveles extremadamente bajos de DMSP y DMS libre comparado con muestras similares derivadas a partir de un cv. Rosalina. Es destacable que aún en el mosto, dichos niveles de DMS de malta Triple-Nula estuvieron bien por debajo de 50 ppb independientemente de los regímenes de horneado y cocción.

Datos de los niveles de precursor de T2N/T2N libre en muestras de mosto

Las concentraciones de precursores de T2N y T2N libre en mosto y cerveza a partir de malta de tipo salvaje del cv. Rosalina y malta Triple-Nula fueron determinadas mediante GC-MS siguiendo a la derivatización de carbonilos con O-(2,3,4,5,6- pentafluorobencil)-hidroxilamina, esencialmente como descrito por Groenqvist y col. (1993).

Se midieron elevadas concentraciones de precursores de T2N en el mosto de cv. Rosalina (**Tabla 12**). Para mosto preparado a partir de malta Triple-Nula, se hallaron particularmente menores niveles de precursores de T2N, ~40% de aquellos cuando se utiliza una materia prima de tipo salvaje. El régimen de calentamiento de baja energía, es decir, baja temperatura de horneado o tratamiento de calor del mosto sin evaporación en un recipiente cerrado, solo tuvo un pequeño efecto en los niveles de precursores de T2N para ambos tipos de malta. En todas las muestras de mosto, se determinaron bajos niveles de T2N libre.

Debe notarse que el efecto beneficioso de las mutaciones LOX-1 nula y LOX-2 nula es claramente visible, incluso cuando se aplica un reducido aporte de energía.

Datos de los niveles de DMS y precursores de T2N/T2N libre en muestras de cerveza

Se midieron las concentraciones de DMS en cerveza fresca preparada a partir de malta Triple-Nula, así como a partir de malta de tipo salvaje del cv. Rosalina utilizando los dos diferentes regímenes de secado y cocción/calentado del grano como se describe precedentemente en la presente memoria descriptiva. Los resultados se resumen en la **Tabla 13**.

La cerveza producida utilizando un régimen de cocción estándar a partir de malta de tipo salvaje del cv. Rosalina, producida utilizando condiciones de secado estándar, contenía 117 ppb de DMS, es decir, por encima de 50 ppb. Utilizando un procedimiento con ahorro de energía, tal como "sin evaporación en un recipiente cerrado" como se describe precedentemente en la presente memoria descriptiva, con la malta de tipo salvaje dio por resultado 174 ppb de DMS, es decir, una muy elevada concentración de sabores indeseables en la cerveza final,

En contraste, la cerveza producida a partir de la Malta Triple-Nula contenía muy bajos niveles de DMS, independientemente de los procedimientos de cocción y horneado.

Los niveles de T2N libre en cerveza fresca fueron bajos en todas las cervezas ensayadas (es decir, utilizando malta de cv. Rosalina o Triple-Nula combinada con cocción con evaporación permitida o tratamiento térmico sin evaporación en un recipiente cerrado), pero se apreció una marcada diferencia después de envejecimiento forzado durante 2 semanas a 37°C. Mientras la cerveza preparada a partir de malta de tipo salvaje producida con cocción estándar y tratamiento con calor sin evaporación en un recipiente cerrado contenía 0,055 ppb y 0,035 ppb de T2N, respectivamente, los correspondientes valores para cervezas producidas a partir de malta Triple-Nula fueron marcadamente inferiores, es decir reducidos a 67% y 51%, respectivamente (ver **Tabla 13**).

Degustaciones de cerveza

Un panel degustador experto evaluó las 6 cervezas producidas (es decir utilizando malta de cv. Rosalina o Triple-Nula combinada con cocción con evaporación permitida o tratamiento con calor sin evaporación en un recipiente cerrado o secado estándar o a baja temperatura), tanto la cerveza fresca como aquella sometida a envejecimiento forzado durante 2 semanas a 37°C (**Tabla 14**).

La cerveza fresca producida a partir de malta Triple-Nula obtuvo el mayor puntaje de sabor total, independientemente de los procedimientos de horneado y cocción. En contraste, se obtuvieron puntajes de sabor total mucho más bajos para la cerveza producida a partir de malta de tipo salvaje horneada a 85°C y utilizando el régimen de cocción estándar; fue considerada "marcadamente DMS". La aplicación de tratamiento de calor sin evaporación en un recipiente cerrado en la preparación del mosto dio por resultado una cerveza con aún más bajo puntaje de sabor total, que fue considerada "fuertemente DMS".

Después de envejecimiento forzado durante 2 semanas a 37°C, la cerveza producida con cocción normal a partir de malta Triple-Nula horneada a 85°C tuvo puntajes de envejecimiento marcadamente inferiores que la correspondiente cerveza producida a partir de malta de tipo salvaje, especialmente debido al puntaje reducido para el atributo "sabor a papel" originado de bajas concentraciones del componente de envejecimiento T2N.

Para la cerveza producida a partir de malta de tipo salvaje, la evaluación de la característica sabor rancio no fue realmente posible, principalmente debido al marcado-a-fuerte sabor indeseable a DMS.

Ejemplo 10

Comparaciones de THAs en cervezas elaboradas con cebada y en cerveza normal

Los THAs específicos de cerveza derivados de ácido linoleico fueron ya descritos hace varias décadas atrás (Drost y col., 1974). Desde entonces, diversos informes han verificado que el contenido total de THAs en cerveza está en el rango de ~5-12 ppm (Hamberg, 1991; y referencias en ella). Mientras 9,12,13-THA normalmente constituye el 75-85% de los THAs en la cerveza, aquel de 9,10,13-THA constituye el 15- 25%; otros isómeros se encuentran en cantidad de trazas.

En cervezas producidas a partir de mosto preparadas a partir de malta de cebada Triple-Nula (ver Ejemplo 9), la concentración de 9,12,13-THA fue reducida en 80-87% comparado con la cerveza control preparada a partir de malta del cv. Rosalina (**Tabla 15**). Para el isómero 9,10,13-THA se observó una reducción de 65-72%. Estas mediciones fueron llevadas a cabo utilizando análisis de espectrometría de masa HPLC estándar (Hamberg, supra).

Ejemplo 11

Amplificación de ADN derivado de la materia prima en cerveza

Donde la metodología PCR puede ser utilizada para establecer la presencia o ausencia de secuencias específicas de ADN de especie en mezclas de harina de malta, la autenticación de muestras de cerveza ha sido más desafiante. En la producción de cerveza, los efectos combinados de nucleasas derivadas de materia prima, las elevadas temperaturas y las filtraciones proporcionan productos de cerveza que contienen solo bajos niveles de ADN intacto para la amplificación de fragmentos de genes de plantas. Se describe en la presente memoria descriptiva un novedoso efectivo procedimiento para la extracción y amplificación combinados de ADN en cantidad suficiente para visualización.

Se ha desarrollado un novedoso protocolo de cuatro etapas para la autenticación de materia prima de muestras de cerveza. Se utilizan de un modo consecutivo los reactivos y protocolos de tres kits biomoleculares, que causan finalmente la amplificación de los fragmentos de ADN para visualización:

(i) extracción de ADN a partir de cerveza a través de la unión a perlas magnéticas [siguiendo las recomendaciones en las instrucciones para muestras líquidas del ADN Extraction Kit, Speciation (Tepnel Biosystems Ltd., Cat. No. 901040N)];

(ii) amplificación de ADN mediante desplazamiento isotérmico de hebra (Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit, GE Healthcare, Cat. No. 25-6600-30);

(iii) PCR con cebadores para la detección de mutaciones específicas de ADN, utilizando el REExtract-N-Amp PCR ReadyMix (Sigma, Cat. No. XNAP-1KT);

(iv) electroforesis en gel de agarosa para separar los productos de amplificación, seguido de marcado con bromuro de etidio para su visualización.

La etapa (i) anterior se refiere a la purificación de ADN a partir de alícuotas de 400- μ l de las siguientes muestras:

- (a) Tuborg Grøn Pilsner, producido utilizando harina de una mezcla 75%:25% de malta:cebada de tipo salvaje (Carlsberg Breweries A/S; inscripción de etiqueta 26.11.11 704);
- (b) cerveza producida en escala piloto utilizando una mezcla que comprende 50% de malta con LOX-1 nula (Carlsberg, identificador de ensayo 2C10084);
- (c) mosto no cocido de fábrica de cerveza en escala piloto utilizando maltas producidas a partir de cebada Triple-Nula (Carlsberg, identificador de ensayo 2C11001);
- (d) mosto cocido en una fabrica de cerveza en escala piloto utilizando malta Triple-Nula (Carlsberg, identificador de ensayo 2C11001), es decir mosto procesado a partir de aquél descrito en (c) anterior.

El ADN purificado a partir de cada una de las muestras mencionadas (a), (b), (c) y (d) fue finalmente re-suspendido en 50 μ l de un buffer 10-mM Tris-EDTA, pH 7.4.

En la etapa (ii) anterior, alícuotas de muestra de 1- μ l de ADN derivado de mosto o cerveza - purificado como se detalló en (i) - fue sometida a amplificación. El ADN fue desnaturalizado con calor brevemente y después enfriado en una muestra de buffer conteniendo hexámeros al azar que se unen de una manera no específica al ADN. Se agregó una mezcla principal conteniendo polimerasa de ADN, hexámeros al azar, nucleótidos, sales y buffers, y se llevó a cabo amplificación isotérmica a 30°C durante 2,0 h, empleando un volumen de reacción final de 20 μ l. Posteriormente, la polimerasa fue inactivada con calor durante una incubación de 10 min a 65°C.

Con respecto a la etapa (iii) anterior, los parámetros de las amplificaciones por PCR de 14- μ l -incluyendo alícuotas de 1,0 o 4,2 μ l de muestras molde preparadas como se describe en (ii) anterior, y 7 pmol de cada cebador FL820 (SEQ ID NO: 10 de WO 2010/075860) y FL823 (SEQ ID NO:11 de WO 2010/075860) para detectar la mutación de LOX-1 nula; ver FIG. 18B en WO 2010/075860 de Skadhauge, B. y col. - fueron como sigue:

- (i) 1 ciclo con desnaturalización a 96°C durante 2 min;
- (ii) 30 ciclos con:
 - (a) desnaturalización a 95°C durante 1 min;
 - (b) hibridación a 68°C durante 1 min;
 - (c) extensión a 72°C durante 1 min
- (iii) extensión final a 72°C durante 10 min
- (iv) conservación

La etapa (iv) anterior consistió en una separación electroforética de la mezcla de PCR completa en un gel de agarosa al 2% (p/v) donde fue incorporado bromuro de etidio. A continuación de la electroforesis, el gel fue irradiado con luz UV y se tomó una fotografía (FIG. 10).

El análisis del patrón de bandas de ADN mostrado en la FIG. 10 no reveló amplificación del producto a partir de una alícuota de cerveza Tuborg, un resultado esperado en tanto que la materia prima era de origen tipo salvaje, es decir no derivado de cebada con LOX-1 nula. Sin embargo, los productos de amplificación de la longitud esperada podrían ser muestras detectadas a partir de cerveza fabricada con una mezcla que comprende 50% con LOX-1 nula. Similarmente, pero más pronunciado, el marcado se obtuvo en el mosto no hervido preparado a partir de malta Triple-Nula. Posiblemente debido al daño por calor y siguiente precipitación, se amplificó menos producto de PCR en la muestra de mosto hervido de materia prima Triple-Nula.

Utilizando los productos amplificados descritos anteriormente en (ii) con el par de cebadores FL1034-FL1039 (SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:8 de WO 2010/075860, respectivamente; ver también la FIG. 18 en WO 2010/075860 de Skadhauge y col.), el conjunto de cebadores 20 (SEQ ID NO:77 y SEQ ID NO:81 de WO 2010/063288), y el conjunto de cebadores 21 (SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:82 de WO 2010/063288; ver también FIG.15 en WO 2010/063288 A2 de Knudsen y col.) en PCRs separados, pero en condiciones similares a aquellas detalladas en el presente ejemplo, se verifica si la muestra de mosto o cerveza es producida mediante el uso de una materia prima Triple-Nula.

Ejemplo 4 de PCT/DK2009/050355 (publicado como WO2010/075860)

Análisis basado en HPLC de HPODE en cebada germinada y micro-malteada

El análisis de los HPODE de la cebada se realizó esencialmente tal como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2005/087934, con la salvedad de que se usaron embriones en germinación en lugar de maduros.

Los granos de la generación M4 se hicieron germinar durante 48 h tal como se describe en el Ejemplo 2 de PCT/DK2009/050355 (publicada como WO2010/075860). Los granos de la generación M5 se sometieron a un procedimiento de micromalteado realizado esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 6 de PCT/DK2009/050355 (publicado como WO2010/075860), pero los niveles de HPODE específicos se determinaron después de 72 h de germinación, y se omitió el procedimiento de horneado. Los niveles de HPODE 9 y 13 se determinaron dejando que los extractos de proteína en crudo procedentes de embriones germinantes de las generaciones M4 y M5 del mutante A689 y las muestras de control se incubaran con el ácido linoleico del sustrato. Los productos de reacción se analizaron mediante HPLC.

Los embriones germinados se diseccionaron a partir de los granos de cebada usando un escalpelo para cortar entre el escutelo y el endospermo. A continuación se colocó cada muestra de 4 embriones entre dos piezas de papel de pesada, y se machacaron suavemente para producir una harina homogénea. Esta se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml; se añadieron 600 µl de un tampón de ácido láctico 200 mM, pH 4,5, y se colocó el tubo en hielo durante 10 min antes de homogeneización adicional usando un mortero de plástico (Kontes). Posteriormente, se añadieron 600 µl de H₂O a cada tubo, y se centrifugaron las muestras durante 2 min a 20.000xg. Se transfirió una parte alícuota de 100 µl del sobrenadante resultante a un tubo de centrífuga de 15 ml (Cellstar: nº cat.188271), para preparar el análisis de los productos de reacción después de la acción de LOX 2 ml de un tampón de fosfato de Na 100 mM, pH 6,5, que contenía 260 µM de ácido linoleico [este sustrato se preparó mezclando 10 ml de un tampón de fosfato de Na 100 mM, pH 6,5, con 100 µl de una solución de reserva de ácido linoleico 24 Mm]. Esta última se preparó mezclando primero 155 µl de ácido linoleico (correspondiente a 134 mg de ácido libre; L-1376, Sigma) y 257 µl de Tween-20, añadiendo después H₂O hasta completar el volumen de 5 ml, seguido por la adición de 600 µl de NaOH 1 M, y cuando la solución se hizo transparente, ajustando el volumen a 20 ml con H₂O. Después de una incubación de 15 min a ~ 30 rpm en un rotador de tubo de sangre, se añadieron 2 ml de acetato de etilo, y se mezcló el contenido de la muestra con agitación vigorosa durante 5 s para extraer HPODE 9 y 13. A continuación se centrifugó la muestra durante 10 min a 800xg, y se transfirió 1 ml de acetato de etilo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, en el que se evaporó el acetato de etilo bajo una corriente de gas nitrógeno. Posteriormente, se resuspendieron los HPODE en 300 µl de metanol, y se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm (Millex-HN filter. Millipore). El análisis del contenido de HPODE se realizó por HPLC. Se inyectó un total de 15 µl de cada muestra en un aparato de HPLC (HP 1100 Series, Hewlett Packard), equipado con una columna Symmetry C18 de 4,6 x 250 mm (Waters). La fase móvil usada fue una mezcla de 16:12:12:10:0.5 (v:v:v:v:v) de agua:metanol:acetonitrilo:tetrahidrofurano:ácido trifluoroacético. El flujo de la fase móvil fue de 1 ml min⁻¹, y la presión medida delante de la columna fue de 140 bar. La separación se realizó a 30°C. La detección de hidroperóxidos de ácido linoleico con dobles enlaces conjugados se llevó a cabo a 234 nm.

Ejemplo 4 de PCT/DK2009/050315 (publicado como WO2010/063288)

Medidas de actividad de MMT de Mutante 8063

La enzima MMT cataliza la transferencia de un grupo metilo desde SAM a Met, formando SMM (v. FIG. 1B de PCT/DK2009/050315 (publicado como WO2010/063288)). Usando [³H]SAM como sustrato, en el que el grupo metilo se marca con tritio, es posible llevar un seguimiento de la transferencia de dicho grupo metilo por recuento por centelleo después de la eliminación del [³H]SAM restante con carbón activado. Este último compuesto se une al sustrato, pero no al producto SMM marcado y recién sintetizado (Pimenta y col., 1995). Esto permitió determinar las actividades de MMT y el contenido de SMM, el segundo determinado tal como se describe en el Ejemplo 2 de PCT/DK2009/050315 (publicado como WO2010/063288), en extractos de 15 brotes de cada uno de Mutante 8063 y cv. Prestige (FIG. 4 de PCT/DK2009/050315 (publicado como WO2010/063288)). El examen de los datos verificó que el MMT catalizó la formación de SMM en granos de tipo salvaje, una propiedad que estaba ausente en los granos de la Mutante 8063.

Tabla 1. Comparación de datos agronómicos [ensayos de campo en 2009 (en Fyn, Dinamarca)]

	cv. Quench	cv. Power	LOX-1 nula	MMT nula	LOX-1 nula- LOX-2 nula	LOX-1-0 nula- MMT	Triple nula
Fecha de siembra	4 abril 18 junio	4 abril 15 junio	4 abril 16 junio	4 abril 15 junio	4 abril 16 junio	4 abril 16 junio	4 abril 17 junio
Fecha de espigado	81	84	87	80	87	85	81
Longitud del tallo en la madurez (cm)	0	5	0	0	0	0	0
Mocho polvoriento	2	3	3	4	2	3	3
Mancha borrosa (Spot blotch) ¹	8	1	3	3	3	3	4
Roya de la hoja ¹	2	6	4	4	2	3	3
Encamado ¹	3 agosto	31 julio	1 agosto	31 julio	1 agosto	1 agosto	2 agosto
Fecha de maduración	103	98	92	93	103	100	101
Rendimiento relativo (%) ²	49	48	53	54	53	47	49
Peso de 1000 granos (g)	10,5	10,2	10,6	10,5	10,5	10,4	10,5
Proteína (%) ³	63,0	62,1	62,5	62,9	62,4	63,1	62,7
Almidón (%) ³	95,7	92,4	96,8	94,6	99,2	99,1	95,3
Tamaño del grano (%>2,5 mm)							

¹ En una escala de 0 a 9, en donde 0 representa sin infección o encamado y 9 representa extrema infección o encamado.
² El rendimiento relativo de la replicación tres a dos ubicaciones diferentes, fue comparado con la mezcla de variedad oficial Danish Spring en 2009. El rendimiento de la mezcla estándar fue establecido en un rendimiento relativo de 100%.
³ Medido mediante espectroscopia de transmitancia de infrarrojo cercano (NIR).

Tabla 2. Niveles de DMSP en micro-malteados y micro-macerados

	Tipo de cebada	Descriptor de muestreo (v. FIG. 6A)			
		1 Malta	2 Mosto dulce	3 Mosto hervido	4 Mosto enfriado
		$\mu\text{g/g}$		$\mu\text{g/l}$	
Secado en horno a 40°C	Triple-Nula	0,2	8	6	-
	LOX-1 nula-MMT nula	0,4	37	19	-
	LOX-1 nula-LOX-2 nula	21,3	-	-	-
	MMT nula	-	-	-	-
	LOX-1 nula	17,3	-	-	-
	cv. Power tipo salvaje	21,3	2348	950	-
Secado en horno a 75°C	Triple-Nula	0,2	9	7	-
	LOX-1 nula-MMT-nula	0,1	9	8	-
	LOX-1 nula-LOX-2 nula	11,9	-	-	-
	MMT nula	-	-	-	-
	LOX-1 nula	8,8	-	-	-
	cv. Power tipo salvaje	7,7	1017	393	-
Secado en horno a 85°C	Triple-Nula	0,1	4	5	-
	LOX-1 nula-MMT nula	0,1	7	6	-
	LOX-1 nula-LOX-2 nula	5,7	656	247	-
	MMT-nula	0,1	5	4	-
	LOX-1 nula	6,5	684	212	-
	cv. Power tipo salvaje	7,1	880	286	-

Tabla 3. Niveles de T2N y precursores de T2N (T2N pre.) en micro-malteados y micro-macerados

	Tipo de cebada	Descriptor de muestreo (v. FIG. 6A)			
		1 Malta		4 Mosto enfriado	
		T2N	T2N pre.	T2N	T2N pre.
		<i>ppb</i>			
Secado en horno a 40°C	Triple-Nula	0,0	2,3	0,1	3,6
	LOX-1 nula-MMT nula	0,0	4,3	0,1	7,5
	LOX-1 nula-LOX-2 nula	-	-	-	-
	MMT nula	-	-	-	-
	LOX-1 nula	-	-	-	-
	cv. Power tipo salvaje	0,1	8,3	0,4	15,7
Secado en horno a 75°C	Triple-Nula	0,1	2,3	0,2	3,3
	LOX-1 nula-MMT-nula	0,1	3,1	0,2	4,9
	LOX-1 nula-LOX-2 nula	-	-	-	-
	MMT nula	-	-	-	-
	LOX-1 nula	-	-	-	-
	cv. Power tipo salvaje	0,2	5,2	0,3	8,2
Secado en horno a 85°C	Triple-Nula	0,1	1,8	0,1	2,5
	LOX-1 nula-MMT nula	0,1	2,1	0,1	3,1
	LOX-1 nula-LOX-2 nula	0,1	1,8	0,1	2,5
	MMT-nula	0,4	4,2	0,4	6,4
	LOX-1 nula	0,1	2,2	0,1	6,6
	cv. Power tipo salvaje	0,2	4,8	0,1	9,0

Tabla 4. Niveles de DMSP en micro-macerados

	Descriptor de muestreo			
Tipo de cebada	2 Mosto dulce	3 30 min mosto hervido	3 60 min mosto hervido	4 Mosto enfriado
	<i>µg/L</i>			
cv. Power tipo salvaje	10,9	12,0	6,3	3,8
Triple-Nula	0,1	0,6	0,6	0,3

Tabla 5. Niveles de DMSP y DMS en dos tipos de maceraciones en escala piloto.

Tipo de cebada	Descriptor de muestreo (v. FIG. 6B,C)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	Calentamiento de mosto dulce con evaporación permitida (min;°C)							
	Malta	0; 67	22; 99	37; 101	52; 101	67; 101	82; 101	142; 90
	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$						
cv. Quench tipo salvaje	DMSP	4,7	725	682	516	369	288	219
	DMS	4,3	93	85	50	47	33	31
	DMSP	0,1	3	2	3	2	1	1
	DMS	0,1	14	13	11	12	11	12
cv. Quench tipo salvaje	DMSP	4,7	564	508	408	340	273	219
	DMS	4,8	51	51	60	64	76	80
	DMSP	0,0	15	5	3	3	3	2
	DMS	0,1	20	20	19	18	19	20

Tabla 6. Niveles de precursor de T2N (T2N pre) y de T2N libre en dos tipos de maceraciones en escala piloto.

Tipo de cebada		Descriptor de muestreo (v. FIG. 6B,C)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
		Malta	Calentamiento de mosto dulce con evaporación permitida (min;°C)						
			0; 67	22; 99	37; 101	52; 101	67; 101	82; 101	142; 90
		<i>ppb</i>							
cv. Quench tipo salvaje	T2N pre.	-	3,6	4,8	4,3	4,2	3,9	3,9	3,7
	T2N	-	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
Triple-Nula	T2N pre.	-	1,7	1,9	1,6	1,4	1,4	1,2	1,4
	T2N	-	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
		Calentamiento presurizado de mosto dulce (min;°C)							
			0; 69	22; 99	37; 98	52; 98	67; 98	82; 98	142; 80
cv. Quench tipo salvaje	T2N pre.	-	3,8	4,0	3,9	3,8	3,8	3,8	3,3
	T2N	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Triple-Nula	T2N pre.	-	1,6	1,8	1,8	1,6	1,5	1,4	1,5
	T2N	-	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabla 7. DMS, Precusores de T2N y T2N libre en cerveza fresca y envejecida.

Tipo de cebada	Tipo de cocción	Condiciones de incubación de la cerveza				
		Fresca				2 semanas a 37°C
		DMS (ppb)	Precusores de T2N (ppb)	T2N libre (ppb)	SO ₂ (ppm)	T2N libre (ppb)
cv. Quench tipo salvaje	Calentamiento de mosto dulce con evaporación permitida	65	3,0	0,025	5	0,041
Triple-Nula		2	1,3	0,018	3	0,039
cv. Quench tipo salvaje	Calentamiento presurizado de mosto dulce	151	3,3	0,024	6	0,061
Triple-Nula		3	1,4	0,020	4	0,039

Tabla 8. Evaluación sensorial de cerveza fresca y envejecida producidas a partir de malta del cv Quench tipo salvaje y de Triple-Nula.

Tipo de cebada	Tipo de cocción	Condiciones de incubación de la cerveza					
		Fresca		1 semana a 37°C		2 semanas a 37°C	
		Puntaje de sabor ¹	Comentarios	Puntaje envejecimiento ²	Puntaje sabor papel ²	Puntaje envejecimiento	Puntaje sabor papel
cv. Quench tipo salvaje	Calentamiento de mosto dulce con evaporación permitida	4,4	Perceptiblemente ácido Levemente oxidado Levemente DMS Levemente sulfídico Levemente estérico	3,1	2,4	2,4	2,1
Triple-Nula		4,8	Levemente sulfídico Levemente ácido graso Levemente granulado	2,1	1,6	1,9	1,3
cv. Quench tipo salvaje	Calentamiento presurizado de mosto dulce	2,8	Levemente estérico Levemente envejecido Fuertemente DMS Levemente felino Levemente granulado	3,5	2,3	3,3	2,4
Triple-Nula		4,8	Levemente granulado Levemente frutal Levemente ácido Levemente rancio	2,6	1,9	1,9	1,1

5

¹ En una escala de 1-9, donde 9 es lo mejor

² En una escala de 0-5, donde 0 designa una cerveza fresca, y 5 una cerveza muy envejecida

³ En una escala de 0-5, donde 5 designa una cerveza con sabor extremo a papel

Tabla 9. Resumen experimental.

Nº fabricación	Cultivar	Secado/horneado		Cocción	
		Programa	Temperatura de curado (°C)	Recipiente	Evaporación (%)
1	Rosalina	Normal	85	Abierto	4,5
2	Triple-Nula	Normal	85	Abierto	4,5
3	Rosalina	Normal	85	Cerrado	0
4	Triple-Nula	Normal	85	Cerrado	0
5	Rosalina	Baja temperatura	75	Abierto	4,5
6	Triple-Nula	Baja temperatura	75	Abierto	4,5

Tabla 10. DMS y DMSP en muestras de malta.

Cultivar	Secado/horneado		DMS (mg/kg)	DMSP (mg/kg)
	Programa	Temperatura de curado (°C)		
Rosalina	Normal	85	4,1	4,7
Rosalina	Baja temperatura	75	2,8	16,2
Triple-Nula	Normal	85	<DL*	<DL*
Triple-Nula	Baja temperatura	75	<DL*	<DL*
* por debajo del límite de detección				

Tabla 11. Niveles de DMSP y DMS en dos tipos de cocción en escala piloto.

Secado normal del grano a 85°C y calentamiento con evaporación permitida del mosto en recipiente abierto.							
Tipo de cebada		Descriptor de la muestra (v. FIG. 6)					
		1	2	3	4	5	7
		Calentamiento del mosto dulce (min;°C)					
		0; 67	22; 99	37; 100	52; 100	82; 100	142;90
		$\mu\text{g/L}$					
cv. Rosalina tipo salvaje	DMSP	1245	1257	882	759	415	208
	DMS	212	190	102	56	31	178
Triple-Nula	DMSP	traza	-	-	-	-	traza
	DMS	traza	-	-	-	-	traza
Secado normal del grano a 85°C y calentamiento del mosto en recipiente cerrado sin evaporación.							
Tipo de cebada		Descriptor de la muestra (v. FIG. 6)					
		1	2	3	4	5	7
		Calentamiento del mosto dulce (min;°C)					
		0; 67	22; 99	37; 100	52; 100	82; 100	142; 90
		$\mu\text{g/L}$					
cv. Rosalina tipo salvaje	DMSP	1180	1061	732	576	398	274
	DMS	183	227	410	412	471	709
Triple-Nula	DMSP	traza	-	-	-	-	traza
	DMS	traza	-	-	-	-	traza
Secado de grano a baja temperatura a 75°C y calentamiento del mosto con evaporación permitida en recipiente abierto.							
Tipo de cebada		Descriptor de la muestra (v. FIG. 6)					
		1	2	3	4	5	7
		Calentamiento del mosto dulce (min;°C)					
		0; 67	22; 99	37; 100	52; 100	82; 100	142;90
		$\mu\text{g/L}$					
cv. Rosalina tipo salvaje	DMSP	1825	1665	1262	1005	611	376
	DMS	155	178	74	32	27	154
Triple-Nula	DMSP	11	-	-	-	-	2
	DMS	4	-	-	-	-	4

Tabla 12. Niveles de precursores de T2N (T2N pre) y de T2N libre en mostos de escala piloto producidos utilizando regímenes variables de horneado y cocción.

Tipo de cebada	Tipo de cocción *)	Al comienzo del calentamiento		Mosto calentado	
		T2N (ppb)	T2N pre (ppb)	T2N (ppb)	T2N pre (ppb)
<i>Secado normal a 85°C</i>					
cv. Rosalina tipo salvaje	Recip ab.; evap.	0,39	5,3	0,21	4,2
Triple-Nula	Recip ab.; evap.	0,24	1,8	0,08	1,8
cv. Rosalina tipo salvaje	Rec. cerr.; no evap.	0,40	5,3	0,36	4,1
Triple-Nula	Rec. cerr.; no evap.	0,28	2,2	0,11	1,8
<i>Secado a baja temperatura a 75°C</i>					
cv. Rosalina tipo salvaje	Recip ab.; evap.	0,21	4,4	0,27	4,7
Triple-Nula	Recip ab.; evap.	0,31	1,9	0,18	1,8
*) Abreviaturas: Recipiente abierto (recip. ab.) o cerrado (recip. cerr.); no evaporación (no. evap.) o evaporación permitida (evap.)					

Tabla 13. DMS y T2N libre en cerveza fresca y envejecida.

Tipo de cebada	Tipo de cocción *)	DMS (ppb)	T2N libre **) (ppb)	SO ₂ (ppm)	T2N libre ***) (ppb)
<i>Secado normal a 85°C</i>					
cv. Rosalina tipo salvaje	Recip ab.; evap.	117	0,011	5	0,055
Triple-Nula	Recip ab.; evap.	1	0,011	5	0,018
cv. Rosalina tipo salvaje	Rec. cerr.; no evap.	326	0,011	5	0,035
Triple-Nula	Rec. cerr.; no evap.	2	0,012	4	0,017
<i>Secado a baja temperatura a 75°C</i>					
cv. Rosalina tipo salvaje	Recip ab.; evap.	174	-	10	-
Triple-Nula	Recip ab.; evap	5	-	5	-
*) Abreviaturas: Recipiente abierto (recip. ab.) o cerrado (recip. cerr.); no evaporación (no. evap.) o evaporación permitida (evap.) **) En cerveza fresca ***) En cerveza incubada durante 2 semanas a 37°C					

Tabla 14 Evaluación sensorial de cerveza fresca y envejecida producidas a partir de malta del cv. Rosalina tipo salvaje y de Triple-Nula.

Tipo de cebada	Tipo de cocción *)	Condiciones de incubación de la cerveza			
		Fresca		2 semanas a 37°C	
		Puntaje de sabor ¹	Comentarios	Puntaje envejecimiento ²	Puntaje sabor papel ³
<i>Normal secado de granos a 85°C</i>					
cv. Rosalina tipo salvaje	Recip ab.; evap.	3,4	Levemente sulfídico		
			Marcadamente DMS		
Triple-Nula	Recip ab.; evap.	5,7	Levemente amargo posterior	2,4	1
cv. Rosalina tipo salvaje	Rec. cerr.; no evap.	3,1	Fuertemente DMS		
Triple-Nula	Rec. cerr.; no evap.	5,0	Levemente ácido	2,7	2,0
			Levemente lupuloso		
			Levemente ácido-amargo		
			Levemente granulado		
<i>Secado a baja temperatura de granos a 75°C</i>					
cv. Rosalina tipo salvaje	Recip ab.; evap.	4,8	Levemente frutal Marcadamente DMS		
Triple-Nula	Recip ab.; evap.	5,2	Levemente amargo	2,1	0,7
			Levemente ácido		
*) Abreviaturas: Recipiente abierto (recip ab) o cerrado (rec. cerr.); no evaporación (no. evap.) o evaporación permitida (evap.) ¹ En una escala de 1-9, donde 9 es lo mejor ² En una escala de 0-5, donde 0 designa una cerveza fresca, y 5 una cerveza muy envejecida ³ En una escala de 0-5, donde 5 designa una cerveza con sabor extremo a papel					

Tabla 15. THA en cervezas producidas a partir de malta del cv Rosalina y mutante Triple-Nula.

Tipo de cebada	Tipo de cocción *)	9.12.13-Hodea (mg/l)	9.10.13-Hodea (mg/l)	9.12.13-Hodea/ 9.10.13-Hodea
<i>Secado normal a 85°C</i>				
cv. Rosalina tipo salvaje	Recip ab.; evap.	3,68	0,84	4,4
Triple-Nula	Recip ab.; evap.	0,75	0,29	2,5
cv. Rosalina tipo salvaje	Rec. cerr.; no evap.	3,28	0,78	4,2
Triple-Nula	Rec. cerr.; no evap.	0,51	0,23	2,2
<i>Secado a baja temperatura a 75°C</i>				
cv. Rosalina tipo salvaje	Recip ab.; evap.	3,77	0,8	4,7
Triple-Nula		0,49	0,22	2,2
*) Abreviaturas: Recipiente abierto (recip ab) o cerrado (rec. cerr.); no evaporación (no. evap.) o evaporación permitida (evap.)				

Tabla 16 Listado de secuencias

SEQ ID NO	Corresponde a	Descripción
SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:1 de la solicitud de patente internacional WO2005/087934	ADNg de cebada del cv. Barke que abarca los codones inicio y terminación del gen que codifica LOX-1
SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:2 de la solicitud de patente internacional WO2005/087934	ADNg de cebada del mutante D112 que abarca la región entre los codones inicio y terminación del gen correspondiente que codifica LOX-1 del cv. Barke
SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:3 de la solicitud de patente internacional WO2005/087934	Secuencia proteica de la extensión completa de la proteína LOX-1 del cv. Barke
SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:4 de la solicitud de patente internacional WO2005/087934	Secuencia proteica de LOX-1 truncada, inactiva del mutante D112
SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:1 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 publicada como WO2010/075860	La secuencia de ADN genómico de tipo salvaje que codifica LOX-2 a partir del cv. Barke.
SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:2 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 publicada como WO2010/075860	La secuencia del ADN genómico de LOX-2 mutante a partir de cebada mutante A689.
SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:5 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 publicada como WO2010/075860	La secuencia de la proteína de longitud completa de LOX-2 de cebada tipo salvaje, cv. Barke.
SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:6 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050355 publicada como WO2010/075860	La secuencia de la proteína mutante LOX-2 que carece de actividad de LOX-2 a partir de cebada mutante A689.
SEQ ID NO:9	SEQ ID NO 3: de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 publicada como WO2010/063288	ADNg de cebada del cv. Prestige, secuencia genómica que abarca los codones inicio y terminación del gen para MMT.
SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:8 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 publicada como WO2010/063288	ADNg de cebada del Mutante 8063, secuencia genómica para MMT que abarca los codones de inicio y terminación del gen para MMT.
SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:16 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 publicada como WO2010/063288	ADNg de cebada del cv. Sebastian, secuencia genómica para MMT que abarca los codones de inicio y terminación del gen para MMT.
SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:19 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 publicada como WO2010/063288	ADNg de cebada del Mutante 14018, secuencia genómica para MMT que abarca los codones de inicio y terminación del gen para MMT.
SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:6 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 publicada como WO2010/063288	Secuencia para MMT de cebada del cv. Prestige.
SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:18 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 publicada como WO2010/063288	Secuencia para MMT de cebada del cv. Sebastian.
SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:22 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 publicada como WO2010/063288	Secuencia completa traducida derivada de error en splicing de ARN del Mutante 14018 de cebada.
SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:24 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 publicada como WO2010/063288	Secuencia completa traducida derivada de error en splicing de ARN del Mutante 14018 de cebada.
SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:26 de la solicitud de patente internacional PCT/DK2009/050315 publicada como WO2010/063288	Secuencia completa traducida derivada de error en splicing del Mutante 14018 de cebada.

REFERENCIAS CITADAS

Documentos de Patentes

- U.S. Pat. No. 4.683.195 de Mullis, K.B. et al.
 5 U.S. Pat. No. 4.800.159 de Mullis, K.B. et al.
 Solicitud de patente PCT, WO 02/053721 de Douma, A.C. et al.
 Solicitud de patente PCT, WO 2005/087934 de Breddam, K. et al.
 Solicitud de patente Europea no. EP 1609866 de Hirota, N. et al. PCT/DK2009/050315 (publicada como
 WO2010/0636288) de Knudsen, S. et al.
 10 PCT/DK2009/050355 (publicada como WO2010/075860) de Skadhauge, B. et al.

Otras publicaciones

- American Association of Cereal Chemists, "Approved methods of the American Association of Cereal
 Chemists." ISBN 0-913250-86-4 (1995).
 15 American Society of Brewing Chemists, "Methods of analysis of the American Society of Brewing Chemists." ISBN
 1-881696-01-4 (1992).
 Baur, C. y 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 ácido linoleico: Formation of bitter tasting fatty acids." Z. Lebensm. Unters.
 20 Forsch. 164:171-176 (1977).
 B. Bonacchelli, C. De Brackeleire y F. Harmegnies "Ebullición del mosto – the Meura's concept with mostostripping"
 Proceedings of the 31st International Congress of the Convención Europea en Venecia de Fabricantes de Cerveza,
 Italia, 6-10 Mayo 2007, Contribución no. 58, ISBN 978-90-70143-24-4
 Briggs, D.E. et al., "Maltear and brewing science. Volume I Malt and sweet mosto." Chapman and Hall. New
 25 York. USA. ISBN 0412165805 (1981).
 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).
 Convención Europea de Fabricantes de Cerveza. "Analytica - EBC." ISBN 3-418-00759-7 (1998).
 Groenqvist, A. et al., "Carbonyl compounds during cerveza production in cerveza." Proceedings of the 24th
 30 EBC Congress, Oslo, pp. 421-428 (1993).
 Hamberg, M., "Trihydroxyoctadecenoic acids in cerveza: 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 da por
 resultado correlated changes in the transcriptome, protein profile, and amino acid composition." J. Exp. Bot.
 35 58:3987-3995 (2007).
 Hough, J.S. et al., "Maltear and brewing science. Volume II Hopped mosto and cerveza." Chapman and Hall,
 New York, USA. ISBN 0412165902 (1982).
 Iida, S. y Terada, R., "Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants."
 Plant Mol. Biol. 59:205-219 (2005).
 40 Institute of Brewing, "Institute of Brewing. Methods of analysis." ISBN 0-900489-10-3 (1997).
 Jamieson, A.M. y van Gheluwe, J.E.A., "Identification of a compound responsible for cardboard flavor in cerveza."
 Proc. Am. Soc. Brew. Chem. 29:192-197 (1970).
 Kleinhofs, A. et al., "Induction and selection of specific gene mutaciones in Hordeum and Pisum." Mut. Res.
 51:29-35 (1978).
 45 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.
 50 Biochem. 69:1661-1668 (2005).
 Lermusieau, G. et al., "Nonoxidative mechanism for development of trans-2-nonenal in cerveza." J. Am. Soc. Brew.
 Chem. 57:29-33 (1999).
 Liégeois, C. et al., "Release of deuterated (E)-2-nonenal during cerveza aging from labeled precursors synthesized
 before boiling." J. Agric. Food Chem. 50:7634-7638 (2002).
 55 Maquat, L.E. and Carmichael, G.G., "Quality control of mARN function." Cell 104:173-176 (2001).
 Meilgaard, M.C., "Flavor chemistry of cerveza: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles." Tech. Q. MBAA
 12:151-167 (1975).
 Mendell, J.T. y Dietz, H.C., "When the message goes awry: Disease-producing mutaciones that influence mARN
 content and performance." Cell 107:411-414 (2002).
 60 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).
- Nyborg, M. et al., "Investigations of the protective mechanism of sulfite against cerveza staling and formation of adducts with trans-2-nonenal." J. Am. Soc. Brew. Chem. 57:24-28 (1999).
- 5 Rasmussen, S.K. y 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. y 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).
- 10 Schmitt, N.F. y 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. y White. C., "Towards targeted mutagenesis and gene replacement in plants." Trends Biotechnol. 23:567-569 (2005).
- 15 von Bothmer, R. et al., "Diversity in barley (*Hordeum vulgare*).". In: "Diversity in Barley (*Hordeum vulgare*).". von Bothmer, R., van Hintum, T., Knüpfner, H., Sato. K., eds., pp. 129-136. ISBN 0-444-50587-7 (2003). Also available at <http://www.genres.de/>.
- Wackerbauer, K. y Meyna, S., "Freie und triglyceride-gebundene Hydroxyfettsäuren in Gerste und Malz", Monatsschrift für Brauwissenschaft, heft 3/4: 52-57 (2002).
- 20 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).

LISTADO DE SECUENCIAS

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

5 <120> Procedimiento de fabricación de cerveza con ahorro de energía

<130> P2253PC00

<160> 20

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4165

15 <212> ADN

<213> Hordeum vulgare cv. Barke

<400> 1

atgctgctgg gagggctgat cgacaccctc acggggggcga acaagagcgc ccggtcaag	60
ggcacgggtgg tgctcatgcg caagaacgtg ctggacctca acgacttcgg cgccaccatc	120
atcgacggca tcggcgagtt cctcggaag ggcgtcacct gccagcttat cagctccacc	180
gccgtcgacc aaggtaatca ctaccctcct ccggccttct cctctgttta caagatatag	240
tattttctttc gtgtgggccc ggggccatgg atggatggat gtgtctggat cggctaaaga	300
agataggata gctagccctg gccggtcgtc ttacctgag catgggcata tgccatcgaa	360
aaaagagaca acagcatgca tgcattggtgc gcgcaccaga ccacgcagag caccggatgc	420
tcgagacaaa gcaacacaac aagcaaggac gacacgtcaa aagcaacaca acaagcaagg	480
acggcacgtc aaaagcaaca caaacctaaa ctaaagcaca aagacgtaag agcaagcaca	540
caatcagcag gctataaaca gttgtcatca aaaacaacgc tggaagagag agagaaggaa	600
ggaagtagta gccatgaaaa attaaatcac cgggcgttgc tctttgcca acaattaatc	660
aagcaggata cgtggcatgt atagtctctg taagtaaact aagcatgtga tatgagaagg	720
tacgtggtgg tgcagacaac ggcggtcgag ggaagggtgg cgccggagcg gagctggagc	780
agtgggtgac gagcctgccg tcgctgacga cgggggagtc caagttcggc ctcaccttcg	840
actgggaggt ggagaagctc ggggtgccgg gcgccatcgt cgtcaacaac taccacagct	900
ccgagttcct gcttaaaacc atcaccctcc acgacgtccc cggccgcagc ggcaacctca	960
ccttcgtcgc caactcatgg atctaccctc ccgccaaact ccgatacagc cgcgtcttct	1020
tcgccaacga cgtgcgtgga ttttcctcta ctttcctctc ctttcatttt caccgccttc	1080
gtcattcatg gtcgatcatt aagtcttgcc aggacaatag atgatgagct aggagtgggt	1140
accacttagc agtacgtaca ttatttattc cgtgttggtg gaaaaggata tggtttggtg	1200
cagatcgaca caagattgaa tgaaagttgc accgtggcac cgtggcagcg tggtaggtga	1260
aaataactgt tgcacggatc caccacatg attgttttca tgaataaaact ttttaaggat	1320

20

ES 2 600 353 T3

gtgtctagcc	acatctagat	gcatgtcaca	taattattgc	ataccaaaac	gattaaatta	1380
agcataaaaa	gaaaaggaaa	aaaatactca	catatctcga	cgtaagatca	atgatatagt	1440
atntagatat	gcaatattta	tcttacatct	aaacctttct	tcattcctaa	atataagaca	1500
tttgtaagat	ttcactatgg	acaacatacg	aaacaaaatc	agtggatctc	tctatgcatt	1560
cattatgtag	tctataataa	aatctttaaa	agatcgtata	ttttgcaacg	gagggagtaa	1620
aacataactt	tttaatagta	atggtgcacg	gctccacact	cgcagacgta	cctgccgagc	1680
cagatgccgg	ggcgctgaa	gccgtaccgc	gacgacgagc	tccggaacct	gcgtggcgac	1740
gaccagcagg	gcccgtacca	ggagcacgac	cgcactctacc	gctacgacgt	ctacaacgac	1800
ctcggcgagg	gccgccccat	cctcggcggc	aactccgacc	acccttacct	gcgcgcggc	1860
cgcacggagc	gcaagcccaa	cgcacgagc	ccgagcctgg	agagccggct	gtcgcgtgtg	1920
gagcagatct	acgtgccggc	ggacgagaag	ttcggccacc	tcaagacgtc	cgacttcctg	1980
ggctactcca	tcaaggccat	cacgcagggc	atcctgccgg	ccgtgcgcac	ctacgtggac	2040
accacccccg	gcgagttcga	ctccttccag	gacatcatca	acctctatga	ggggggcatc	2100
aagctgccca	aggtggccgc	cctggaggag	ctccgtaagc	agttcccgtc	ccagctcatc	2160
aaggacctcc	tcccgcgcgg	cggcgactcc	ctgcttaagc	tcccgcgtcc	ccacatcatc	2220
caggagaaca	agcaggcgtg	gaggaccgac	gaggagtctg	cacgggaggt	gctcgcgggc	2280
gtcaaccg	tcatgatcac	gcgtctcacg	gtgagtcagc	gattatttgt	tcattgtgtg	2340
tgtatggtgt	ccatggtgag	aaagtgcaga	tcttgatttg	cgttggtgtg	catgcacgca	2400
tgctgcatgc	atgcaggagt	tccgcctaaa	aagtagtctg	gaccctagca	agtttggtga	2460
ccacaccagc	accatcacgg	cggagcacat	agagaagaac	ctcgagggcc	tcacggtgca	2520
gcaggtaatt	ggtccaagcc	atcgacatca	actatgattt	acctaggagt	aattggtagc	2580
tgtagataat	ttggcttcgt	tgcaattaat	ttgatgctgg	ccgatcaagt	gatcgtattg	2640
ggtttgaaat	ttgcaggcgc	tggaaagcaa	caggctgtac	atccttgatc	accatgaccg	2700
gttcatgccg	ttcctgatcg	acgtcaacaa	cctgcccggc	aacttcactc	acgccacgag	2760
gacctcttct	ttcctgcgcg	gcgacggcag	gctcacgccg	ctcgccatcg	agctgagcga	2820
gcccacatc	cagggcggcc	ttaccacggc	caagagcaag	gtttacacgc	cgggtgccag	2880
cggctccgtc	gaaggctggg	tgtgggagct	cggcaaggcc	tacgtcgccg	tcaatgactc	2940
cgggtggcac	cagctcgtca	gccactggta	cgttctccac	ggtcgatgtg	attcagtcag	3000
tcgatgcaca	acaactgatc	gaaatatgat	tgattgaaac	gcgcaggctg	aacctcacg	3060
cgggtgatga	gccgttcgtg	atctcgacga	accggcacct	tagcgtgacg	cacccggtgc	3120
acaagctgct	gagcccgcac	taccgcgaca	ccatgaccat	caacgcgctg	gcggggcaga	3180
cgtcatcaaa	cgcggcgggc	atcttcgaga	tgacggtgtt	ccggggcaag	ttcgcgttgg	3240

ES 2 600 353 T3

```

ggatgtcggc cgtggtgtac aaggactgga agttcaccga gcagggactg ccggacgatc 3300
tcatcaagag gtacgtacct ggtaaattgt atgaatgtgt aaaacaaatt gggcgtctcg 3360
ctcactgaca ggaacgtggt aaaaaaatg caggggcatg gcggtggagg acccgtcgag 3420
cccgtagaag gtgcggttgc tgggtgtcga ctaccctgac gcggcggacg ggctggcgat 3480
ctggcacgcc attgagcagt acgtgagcga gtacctggcc atctactacc cgaacgacgg 3540
cgtgctgcag ggcgatacgg aggtgcaggc gtggtggaag gagacgcgcg aggtcgggca 3600
cggcgacctc aaggacgcc catggtggcc caagatgcaa agtgtgccgg agctggccaa 3660
ggcgtgcacc accatcatct ggatcgggtc ggcgtctcat gcggcagtc acttcgggca 3720
gtacccttac gcggggttcc tcccgaaccg gccgacgggtg agccggcgcc gcattccgga 3780
gccgggcacg gaggagtacg cggagctgga gcgcgacctg gagcgggcct tcatccacac 3840
catcacgagc cagatccaga ccatcatcgg cgtgtcgtct ctggagggtc tgtcgaagca 3900
ctcctccgac gagctgtacc tcgggcagcg ggacacgcgc gactggacct cggacccaaa 3960
ggccttgag gtgttcaagc ggttcagcga ccggctggtg gagatcgaga gcaagggtgt 4020
gggcatgaac catgaccggg agctcaagaa ccgcaacggc ccggctaagt ttccctacat 4080
gctgctctac cccaacacct ccgaccacaa gggcgccgct gccgggctta ccgccaaggg 4140
catccccaac agcatctcca tctaa 4165

```

<210> 2

<211> 4165

5 <212> ADN

<213> Hordeum vulgare mutante D112

<400> 2

```

atgctgctgg gagggctgat cgacaccctc acgggggcga acaagagcgc ccggctcaag 60
ggcacgggtg tgctcatgcg caagaacgtg ctggacctca acgacttcgg cgccaccatc 120
atcgacggca tcggcgagtt cctcggcaag ggcgtcacct gccagcttat cagctccacc 180
gccgtcgacc aaggtaatca ctaccctcct ccggccttct cctctgttta caagatatag 240
tattttcttc gtgtgggccc gcggccatgg atggatggat gtgtctggat cggctaaaga 300
agataggata gctagccctg gccggtcgtc ttacctgag catgggcata tgccatcgaa 360
aaaagagaca acagcatgca tgcattggtg gcgcaccaga ccacgcagag caccggatgc 420
tcgagacaaa gcaacacaac aagcaaggac gacacgtcaa aagcaacaca acaagcaagg 480
acggcacgtc aaaagcaaca caaacctaaa ctaaagcaca aagacgtaag agcaagcaca 540
caatcagcag gctataaaca gttgtcatca aaaacaacgc tggaagagag agagaaggaa 600
ggaagtagta gccatgaaaa attaaatcac cgggctgtgc tctttgccca acaattaatc 660
aagcaggata cgtggcatgt atagtctctg taagtaaact aagcatgtga tatgagaagg 720

```

10

ES 2 600 353 T3

tacgtggtgg	tgcagacaac	ggcggtcgcg	ggaaggtggg	cgcgaggcg	gagctggagc	780
agtgggtgac	gagcctgccg	tcgctgacga	cgggggagtc	caagttcggc	ctcaccttcg	840
actgggaggt	ggagaagctc	ggggtgccgg	gcgccatcgt	cgtcaacaac	taccacagct	900
ccgagttcct	gcttaaaacc	atcacccctc	acgacgtccc	cgccgcagc	ggcaacctca	960
ccttcgtcgc	caactcatgg	atctaccccg	ccgccaaacta	ccgatacagc	cgcgtcttct	1020
tcgccaacga	cgtgcgtgga	ttttcctcta	ctttcctctc	ctttcatttt	caccgccttc	1080
gtcattcatg	gtcgatcatt	aagtcttgcc	aggacaatag	atgatgagct	aggagtgggt	1140
accacttagc	agtagctaca	ttattttattc	cgtgttggtg	gaaaaggata	tggtttggtg	1200
cagatcgaca	caagattgaa	tgaaagttgc	accgtggcac	cgtggcagcg	tggtaggtga	1260
aaataactgt	tgcacggatc	caccacatg	attgttttca	tgaataaact	ttttaaggat	1320
gtgtctagcc	acatctagat	gcatgtcaca	taattattgc	ataccaaaac	gattaaatta	1380
agcataaaaa	gaaaaggaaa	aaaatactca	catatctcga	cgtaagatca	atgatatagt	1440
atttagatat	gcaatattta	tcttacatct	aaacctttct	tcattcctaa	atataagaca	1500
tttgtaagat	ttcactatgg	acaacatacg	aaacaaaatc	agtggatctc	tctatgcatt	1560
cattatgtag	tctataataa	aatcttttaa	agatcgtata	ttttgcaacg	gaggagtaga	1620
aacataactt	tttaatagta	atggtgcacg	gctccacact	cgcagacgta	cctgccgagc	1680
cagatgccgg	cggcgctgaa	gccgtaccgc	gacgacgagc	tccggaacct	gcgtggcgac	1740
gaccagcagg	gcccgtacca	ggagcacgac	cgcactctacc	gctacgacgt	ctacaacgac	1800
ctcggcgagg	gccgccccat	cctcggcggc	aactccgacc	acccttacct	gcgccgcggc	1860
cgcacggagc	gcaagcccaa	cgccagcgac	ccgagcctgg	agagccggct	gtcgtgctg	1920
gagcagatct	acgtgccgcg	ggacgagaag	ttcggccacc	tcaagacgtc	cgacttcctg	1980
ggctactcca	tcaaggccat	cacgcagggc	atcctgccgg	ccgtgcgcac	ctacgtggac	2040
accacccccg	gcgagttcga	ctccttccag	gacatcatca	acctctatga	gggcggcatc	2100
aagctgcccc	aggtggccgc	cctggaggag	ctccgtaagc	agttcccgtc	ccagctcatc	2160
aaggacctcc	tccccgtcgg	cggcgactcc	ctgcttaagc	tccccgtgcc	ccacatcatc	2220
caggagaaca	agcaggcgtg	gaggaccgac	gaggagtctg	cacgggaggt	gctcgcgggc	2280
gtcaaccocg	tcatgatcac	gcgtctcacg	gtgagtcagc	gattatttgt	tcattgtgtg	2340
tgtatggtgt	ccatggtgag	aaagtgcaga	tcttgatttg	cgttggttcg	catgcacgca	2400
tgtctcatgc	atgcaggagt	tcccgcctaa	aagtagtctg	gaccctagca	agtttggtga	2460
ccacaccagc	accatcacgg	cggagcacat	agagaagaac	ctcgagggcc	tcacggtgca	2520
gcaggtaatt	ggtccaagcc	atcgacatca	actatgattt	acctaggagt	aattggtagc	2580

ES 2 600 353 T3

```

tgtagataat ttggcttcgt tgcaattaat ttgatgctgg ccgatcaagt gatcgtattg 2640
ggtttgaat ttgcaggcgc tggaaagcaa caggctgtac atccttgatc accatgaccg 2700
gttcatgccg ttcctgatcg acgtcaacaa cctgccgggc aacttcattc acgccacgag 2760
gaccctcttc ttcctgcgcg gcgacggcag gctcacgccg ctcgccatcg agctgagcga 2820
gcccacatc caggcgccgc ttaccacggc caagagcaag gtttacacgc cggtgcccag 2880
cggctccgtc gaaggctggg tgtgggagct cgccaaggcc tacgtcgccg tcaatgactc 2940
cgggtggcac cagctcgta gccactggta cgttctccac ggtcgatgtg attcagtcag 3000
tcgatgcaca acaactgatc gaaatatgat tgattgaaac gcgcaggctg aacactcacg 3060
cggatgatgga gccgttcgtg atctcgacga accggcacct tagcgtgacg caccgggtgc 3120
acaagctgct gagcccgcac taccgcgaca ccatgaccat caacgcgctg gcgcggcaga 3180
cgctcatcaa cgccggcggc atcttcgaga tgacgggtgtt cccgggcaag ttgcggttg 3240
ggatgtcggc cgtggtgtac aaggactgga agttcacga gcagggactg ccggacgatc 3300
tcatcaagag gtacgtacct ggtaaatgtt atgaatgtgt aaaacaaatt gggcgtctcg 3360
ctcactgaca ggaacgtggt aaaaaaatg caggggcatg gcggtggagg acccgtcgag 3420
cccgtacaag gtgcggttgc tgggtgctgga ctaccctgac gcggcggacg ggctggcgat 3480
ctggcacgcc attgagcagt acgtgagcga gtacctggcc atctactacc cgaacgacgg 3540
cgtgctgcag ggcgatacgg aggtgcaggc gtgatggaag gagacgcgcg aggtcgggca 3600
cggcgacctc aaggacgccc catggtggcc caagatgcaa agtgtgccg agctggccaa 3660
ggcgtgcacc accatcatct ggtcgggtc ggcgtgcat gcggcagtc acttcgggca 3720
gtacccttac gcggggttcc tcccgaaccg gccgacgggt agccggcgcc gcatgccgga 3780
gccgggcacg gaggagtacg cggagctgga gcgcgacccg gagcgggcct tcatccacac 3840
catcacgagc cagatccaga ccatcatcgg cgtgtcgctg ctggaggtgc tgtcgaagca 3900
ctcctccgac gagctgtacc tcgggcagcg ggacacgccg gaggggacct cggacccaaa 3960
ggccctggag gtgttcaagc ggttcagcga ccggctggtg gagatcgaga gcaaggtggt 4020
gggcatgaac catgaccggg agctcaagaa ccgcaacggc ccggctaagt ttccctacat 4080
gctgctctac cccaacacct ccgaccacaa gggcgccgct gccgggctta ccgccaaggg 4140
catccccaac agcatctcca tctaa 4165

```

<210> 3

<211> 862

5 <212> PRT

<213> Hordeum vulgare cv. Barke

<400> 3

10

Met Leu Leu Gly Gly Leu Ile Asp Thr Leu Thr Gly Ala Asn Lys Ser

ES 2 600 353 T3

1		5		10		15
Ala	Arg	Leu	Lys	Gly	Thr	Val
		20				25
Met	Arg	Lys	Asn	Val	Leu	Asp
			30			
Leu	Asn	Asp	Phe	Gly	Ala	Thr
	35				40	
Ile	Ile	Asp	Gly	Ile	Gly	Glu
			45			Phe
Leu						
Gly	Lys	Gly	Val	Thr	Cys	Gln
	50				55	
Ile	Ser	Ser	Thr	Ala	Val	Asp
			60			Gln
Asp	Asn	Gly	Gly	Arg	Gly	Lys
65					70	
Val	Gly	Ala	Glu	Ala	Glu	Leu
			75			Glu
Gln						
80						
Trp	Val	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser
			85			
Leu	Thr	Thr	Gly	Glu	Ser	Lys
			90			Phe
Gly						
95						
Leu	Thr	Phe	Asp	Trp	Glu	Val
			100			
Glu	Lys	Leu	Gly	Val	Pro	Gly
	105					110
Ala	Ile					
Val	Val	Asn	Asn	Tyr	His	Ser
		115				120
Glu	Phe	Leu	Leu	Lys	Thr	Ile
				125		Thr
Leu	His	Asp	Val	Pro	Gly	Arg
	130					135
Ser	Gly	Asn	Leu	Thr	Phe	Val
			140			Ala
Asn						
Ser	Trp	Ile	Tyr	Pro	Ala	Ala
145					150	
Asn	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Arg	Val
			155			Phe
Phe						
160						
Ala	Asn	Asp	Thr	Tyr	Leu	Pro
			165			
Ser	Gln	Met	Pro	Ala	Ala	Leu
		170				Lys
Pro						
175						
Tyr	Arg	Asp	Asp	Glu	Leu	Arg
		180				185
Asn	Leu	Arg	Gly	Asp	Asp	Gln
						190
Gln	Gln	Gly				
Pro	Tyr	Gln	Glu	His	Asp	Arg
		195				200
Ile	Tyr	Arg	Tyr	Asp	Val	Tyr
					205	Asn
Asp						
210						
Leu	Gly	Glu	Gly	Arg	Pro	Ile
	215					Leu
Gly	Gly	Asn	Ser	Asp	His	Pro
		220				Tyr
Pro	Arg	Arg	Gly	Arg	Thr	Glu
225					230	
Lys	Pro	Asn	Ala	Ser	Asp	Pro
		235				Ser
Leu	Glu	Ser	Arg	Leu	Ser	Leu
				245		Glu
Gln	Ile	Tyr	Val	Pro	Arg	Asp
					250	
255						

ES 2 600 353 T3

Glu Lys Phe Gly His Leu Lys Thr Ser Asp Phe Leu Gly Tyr Ser Ile
 260 265 270
 Lys Ala Ile Thr Gln Gly Ile Leu Pro Ala Val Arg Thr Tyr Val Asp
 275 280 285
 Thr Thr Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Gln Asp Ile Ile Asn Leu Tyr
 290 295 300
 Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Lys Val Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg
 305 310 315 320
 Lys Gln Phe Pro Leu Gln Leu Ile Lys Asp Leu Leu Pro Val Gly Gly
 325 330 335
 Asp Ser Leu Leu Lys Leu Pro Val Pro His Ile Ile Gln Glu Asn Lys
 340 345 350
 Gln Ala Trp Arg Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Val Leu Ala Gly
 355 360 365
 Val Asn Pro Val Met Ile Thr Arg Leu Thr Glu Phe Pro Pro Lys Ser
 370 375 380
 Ser Leu Asp Pro Ser Lys Phe Gly Asp His Thr Ser Thr Ile Thr Ala
 385 390 395 400
 Glu His Ile Glu Lys Asn Leu Glu Gly Leu Thr Val Gln Gln Ala Leu
 405 410 415
 Glu Ser Asn Arg Leu Tyr Ile Leu Asp His His Asp Arg Phe Met Pro
 420 425 430
 Phe Leu Ile Asp Val Asn Asn Leu Pro Gly Asn Phe Ile Tyr Ala Thr
 435 440 445
 Arg Thr Leu Phe Phe Leu Arg Gly Asp Gly Arg Leu Thr Pro Leu Ala
 450 455 460
 Ile Glu Leu Ser Glu Pro Ile Ile Gln Gly Gly Leu Thr Thr Ala Lys
 465 470 475 480
 Ser Lys Val Tyr Thr Pro Val Pro Ser Gly Ser Val Glu Gly Trp Val
 485 490 495
 Trp Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Val Ala Val Asn Asp Ser Gly Trp His
 500 505 510

ES 2 600 353 T3

Gln Leu Val Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu Pro Phe
 515 520 525
 Val Ile Ser Thr Asn Arg His Leu Ser Val Thr His Pro Val His Lys
 530 535 540
 Leu Leu Ser Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Thr Ile Asn Ala Leu Ala
 545 550 555 560
 Arg Gln Thr Leu Ile Asn Ala Gly Gly Ile Phe Glu Met Thr Val Phe
 565 570 575
 Pro Gly Lys Phe Ala Leu Gly Met Ser Ala Val Val Tyr Lys Asp Trp
 580 585 590
 Lys Phe Thr Glu Gln Gly Leu Pro Asp Asp Leu Ile Lys Arg Gly Met
 595 600 605
 Ala Val Glu Asp Pro Ser Ser Pro Tyr Lys Val Arg Leu Leu Val Ser
 610 615 620
 Asp Tyr Pro Tyr Ala Ala Asp Gly Leu Ala Ile Trp His Ala Ile Glu
 625 630 635 640
 Gln Tyr Val Ser Glu Tyr Leu Ala Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp Gly Val
 645 650 655
 Leu Gln Gly Asp Thr Glu Val Gln Ala Trp Trp Lys Glu Thr Arg Glu
 660 665 670
 Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Pro Trp Trp Pro Lys Met Gln
 675 680 685
 Ser Val Pro Glu Leu Ala Lys Ala Cys Thr Thr Ile Ile Trp Ile Gly
 690 695 700
 Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Ala Gly
 705 710 715 720
 Phe Leu Pro Asn Arg Pro Thr Val Ser Arg Arg Arg Met Pro Glu Pro
 725 730 735
 Gly Thr Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Arg Ala Phe
 740 745 750
 Ile His Thr Ile Thr Ser Gln Ile Gln Thr Ile Ile Gly Val Ser Leu
 755 760 765

ES 2 600 353 T3

Leu Glu Val Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Leu Tyr Leu Gly Gln
770 775 780

Arg Asp Thr Pro Glu Trp Thr Ser Asp Pro Lys Ala Leu Glu Val Phe
785 790 795 800

Lys Arg Phe Ser Asp Arg Leu Val Glu Ile Glu Ser Lys Val Val Gly
805 810 815

Met Asn His Asp Pro Glu Leu Lys Asn Arg Asn Gly Pro Ala Lys Phe
820 825 830

Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Lys Gly Ala Ala
835 840 845

Ala Gly Leu Thr Ala Lys Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile
850 855 860

<210> 4

<211> 665

5 <212> PRT

<213> Hordeum vulgare mutante D112

<400> 4

Met Leu Leu Gly Gly Leu Ile Asp Thr Leu Thr Gly Ala Asn Lys Ser
1 5 10 15

Ala Arg Leu Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp
20 25 30

Leu Asn Asp Phe Gly Ala Thr Ile Ile Asp Gly Ile Gly Glu Phe Leu
35 40 45

Gly Lys Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Ala Val Asp Gln
50 55 60

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

Trp Val Thr Ser Leu Pro Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ser Lys Phe Gly
85 90 95

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

Val Val Asn Asn Tyr His Ser Ser Glu Phe Leu Leu Lys Thr Ile Thr
115 120 125

10

ES 2 600 353 T3

Leu His Asp Val Pro Gly Arg Ser Gly Asn Leu Thr Phe Val Ala Asn
 130 135 140
 Ser Trp Ile Tyr Pro Ala Ala Asn Tyr Arg Tyr Ser Arg Val Phe Phe
 145 150 155 160
 Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro Ser Gln Met Pro Ala Ala Leu Lys Pro
 165 170 175
 Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln Gln Gly
 180 185 190
 Pro Tyr Gln Glu His Asp Arg Ile Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr Asn Asp
 195 200 205
 Leu Gly Glu Gly Arg Pro Ile Leu Gly Gly Asn Ser Asp His Pro Tyr
 210 215 220
 Pro Arg Arg Gly Arg Thr Glu Arg Lys Pro Asn Ala Ser Asp Pro Ser
 225 230 235 240
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Leu Glu Gln Ile Tyr Val Pro Arg Asp
 245 250 255
 Glu Lys Phe Gly His Leu Lys Thr Ser Asp Phe Leu Gly Tyr Ser Ile
 260 265 270
 Lys Ala Ile Thr Gln Gly Ile Leu Pro Ala Val Arg Thr Tyr Val Asp
 275 280 285
 Thr Thr Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Gln Asp Ile Ile Asn Leu Tyr
 290 295 300
 Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Lys Val Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg
 305 310 315 320
 Lys Gln Phe Pro Leu Gln Leu Ile Lys Asp Leu Leu Pro Val Gly Gly
 325 330 335
 Asp Ser Leu Leu Lys Leu Pro Val Pro His Ile Ile Gln Glu Asn Lys
 340 345 350
 Gln Ala Trp Arg Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Val Leu Ala Gly
 355 360 365
 Val Asn Pro Val Met Ile Thr Arg Leu Thr Glu Phe Pro Pro Lys Ser

ES 2 600 353 T3

370		375		380
Ser Leu Asp Pro Ser Lys Phe Gly Asp His Thr Ser Thr Ile Thr Ala				
385		390		395
				400
Glu His Ile Glu Lys Asn Leu Glu Gly Leu Thr Val Gln Gln Ala Leu				
		405		410
				415
Glu Ser Asn Arg Leu Tyr Ile Leu Asp His His Asp Arg Phe Met Pro				
		420		425
				430
Phe Leu Ile Asp Val Asn Asn Leu Pro Gly Asn Phe Ile Tyr Ala Thr				
		435		440
				445
Arg Thr Leu Phe Phe Leu Arg Gly Asp Gly Arg Leu Thr Pro Leu Ala				
		450		455
				460
Ile Glu Leu Ser Glu Pro Ile Ile Gln Gly Gly Leu Thr Thr Ala Lys				
		465		470
				475
Ser Lys Val Tyr Thr Pro Val Pro Ser Gly Ser Val Glu Gly Trp Val				
		485		490
				495
Trp Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Val Ala Val Asn Asp Ser Gly Trp His				
		500		505
				510
Gln Leu Val Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu Pro Phe				
		515		520
				525
Val Ile Ser Thr Asn Arg His Leu Ser Val Thr His Pro Val His Lys				
		530		535
				540
Leu Leu Ser Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Thr Ile Asn Ala Leu Ala				
		545		550
				555
Arg Gln Thr Leu Ile Asn Ala Gly Gly Ile Phe Glu Met Thr Val Phe				
		565		570
				575
Pro Gly Lys Phe Ala Leu Gly Met Ser Ala Val Val Tyr Lys Asp Trp				
		580		585
				590
Lys Phe Thr Glu Gln Gly Leu Pro Asp Asp Leu Ile Lys Arg Gly Met				
		595		600
				605
Ala Val Glu Asp Pro Ser Ser Pro Tyr Lys Val Arg Leu Leu Val Ser				
		610		615
				620

ES 2 600 353 T3

Asp Tyr Pro Tyr Ala Ala Asp Gly Leu Ala Ile Trp His Ala Ile Glu
625 630 635 640

Gln Tyr Val Ser Glu Tyr Leu Ala Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp Gly Val
645 650 655

Leu Gln Gly Asp Thr Glu Val Gln Ala
660 665

<210> 5

<211> 3229

5 <212> ADN

<213> Hordeum vulgare cv: Barke

<400> 5

```

atgtttggcg tcggcggcat cgtgagcgac ctgacggggg gcctccgggg cgcccacctc      60
aagggtccg tcgtcctcat gcgcaagaac gcgctcgact tcaacgactt cggcgccacc      120
gtcatggacg gcgtcaccga gctcctcggc 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 ggagggggtt accttactac taattaattg tcgagcagac aacggtgggc      480
gcgggaaggt gggcgcgagg gcgaacctgg agcagtggct cctgccgacg aacctgccgt      540
tcatcaccac cggcgagaac aagttcgccg tcaccttcga ctggtcgggtg gacaagctgg      600
gggtgccggg ggccatcatc gtcaagaaca accacgcctc cgagttcttc ctcaagacca      660
tcaccctcga caacgtgccc ggccgcggca ccatcgtctt cgtcgccaac tcatgggtct      720
accgcagggc caagtaccgc tacaaccgcg tcttcttcgc caacgacgtg agtattttat      780
acgagtacca ctccatggtg gctagtacga tggatttcgc ttgctcgatg cctgactggt      840
cggttccgtt gggacatacg tgccgcagac gtacctgccg caccagatgc cggcggcgct      900
gaagccgtac cgcgacgacg agctccggaa cctgaggggc gacgaccagc agggggccta      960
cctggaccac gaccggtctt accgtacga cgtctacaac gacctcggcg actcccgcga     1020
cgtcctcggc ggctccaagg acctccccta ccgcgcgcgc tgccgcaccg gccggaagcc     1080
ctcggacagc agtgctgtc tcctcccttc tccttccttt cgatctcccc ataacgtgta     1140
cttggcttga caagcatgtg tggccgacgc agagcccgac cacgagagcc ggctgctgcc     1200
gctggtgcag aacgtctacg tgccgcgcga cgagctcttc ggccacctca agcagtcgga     1260
cttcctgggc tacacgtca aggcgtggt ggacgggatc ataccggcca tccgcaccta     1320
cgtcgacctc tccccggcg agttcgactc cttcgcgcac atcctcaagc tctacagggg     1380

```

10

ES 2 600 353 T3

cggcatacaag ctgcccaca tcccggccct cgaggaggtg cgcaagcgct tcccgtcca	1440
gtcgtcaag gacctcatcc ccaagggcgg cgacttcctc ctcaagctcc ccaagccgga	1500
gatcatcaag gtagaccaga aagcgtggat gactgacgag gagttcgcca gggagatgct	1560
cgccggcgtc aaccccatga tgatcaaacg cctcaccgtg agtgaccacac tccatctacc	1620
ggccattgaa caaaatcgtc catacatgtc actaatcaat actcacaccg ttttgaccgc	1680
gtgtgcagga gttccctccc aagagcactc tggatccgag caagtacggc gaccacacca	1740
gcacatgac cgaggagcac gtggccaaga gcctggaggg cctcaccgtg cagcaggcgc	1800
tcgccggcaa caggctctac atcgtagacc agcacgacaa cctgatgccg ttcctgatcg	1860
acatcaacaa cctcgacgcc agcttcgtgt acgccacaag gacgctgctc ttcctgcgag	1920
gggacggcac gctggcgccg gtcgccatcg agctgagctc gccgctgatc cagggcgagc	1980
tgaccaccgc caagagcgcc gtgtacacgc cgcagcacgc cggcgtggag ggctggatat	2040
ggcagctcgc caaggcctac gcctccgtga acgactacgg gtggcaccag ctcatcagcc	2100
actggctcaa cagcacgcc gtcattggagc ccttcgtcat cgccaccaac aggcagctca	2160
gcgtcaccga cccggctctac aagctcctgc acccgacta ccgcgacacc atgaacatca	2220
acgcgcgggc gcgcgggctg ctcatcaacg ccggcgccgt catcgagatg accgtgttcc	2280
cgcacaagca cgccatgcc atgtcctcca tggctacaa gcaactggaac ttcaccgaac	2340
aagctctccc cgccgatcta atcaagaggt gcaacatgtt tacattatat aattgacgaa	2400
acggtccttg atttgatcaa aatgattaat cgactctgat ggttgatgat gatgtagggg	2460
catggcggtg gaggacgcat cgagcccgca caaggtgcgg ctgctgatca aggactaccc	2520
gtacgcgacc gacgggctgg ccgtgtggga cgccatcgag cagtgggtgt cggactacct	2580
gaccatctac taccccaacg acggcgtgct gcagggcgac gtggagctgc aggcgtggtg	2640
gaaggaggtg agggaggtcg ggcacggcga cctcaaggac gcggcgtggt ggccaaagat	2700
gcagacggtg gcggagctga tcaaggcgtg cgccaccatc atctggaccg ggtcggcgct	2760
ccacgcggcc gtcaacttcg ggcagtaccc ctactcgggc taccacccca acaagccgtc	2820
ggcgagccgg aggcgatgc cgggtgcaggg gagcgaggag tacgcggagc tggagcgaga	2880
cccggagaag gccttcatcc gcacatcac cagccagttc catgccctgg tgggcatctc	2940
gctcatggag atcctctcca agcactcctc cgacgaggtc tacctgggcc agcacgacac	3000
gccggcgtgg acgtcggacg ccaaggcgct ggaggcgctc aagcggttcg gggcgaagct	3060
ggagggcatc gagaagcagg tgggtggccat gaactcggac ccgcagctaa agaaccgcac	3120
cgggcccggc aagttcccat acatgctgct ctacccaaac acctccgacc acacgggaca	3180
ggccgagggg ctcaccgcca ggggcatccc gaacagcata tccatctga	3229

<210> 6

<211> 3229

5 <212> ADN

<213> Hordeum vulgare Mutante A689

<400> 6

atgtttggcg tcggcgccat cgtgagcgac ctgacggggg gcctccgggg cgcccacctc	60
aagggtccg tcgtcctcat gcgcaagaac gcgctcgact tcaacgactt cggcgccacc	120
gtcatggacg gcgtcaccga gctcctcggc cgcggcggtca cctgccagct catcagctcc	180
accaacgctg 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
tcaccaccac cggcgagaac aagttcgccg tcaccttcga ctggtcggtg gacaagctgg	600
gggtgccggg ggccatcatc gtcaagaaca accacgcctc cgagttcttc ctcaagacca	660
tcacctcga caacgtgccc ggccgcggca ccacgtctt cgtcgccaac tcattgggtct	720
acccgcaggc caagtaccgc tacaaccggg tcttcttcgc caacgacgtg agtattttat	780
acgagtacca ctccatggtg gctagtacga tggatttcgc ttgctcgatg cctgactggt	840
cggttccgtt gggacatacg tgccgcagac gtacctgccg caccagatgc cggcgcgct	900
gaagccgtac cgcgacgacg agctccggaa cctgaggggc gacgaccagc aggggcccta	960
cctggaccac gaccgcgtct accgctacga cgtctacaac gacctcggcg actcccgca	1020
cgtcctcggc ggctccaagg acctcccta cccgcgcgcg tgccgcaccg gccggaagcc	1080
ctcggacagc agtgcggtc tcctcccttc tccttccttt cgatctcccc ataactgtgta	1140
cttgggtctga caagcatgtg tggccgacgc agagcccgac cagagagacc ggctgctgcc	1200
gctggtgcag aacgtctacg tgccgcgcga cgagctcttc ggccacctca agcagtcgga	1260
cttcctgggc tacacgctca aggcgtggt ggacgggatc ataccggcca tccgcacctc	1320
cgtcgacctc tccccggcg agttcgactc cttcgccgac atcctcaagc tctacgagg	1380
cggcatcaag ctgcccaaca tcccggccct cgaggagggt gcgaagcgct tcccgtcca	1440
gctcgtcaag gacctcatcc ccaaggcgcg cgaacttcct ctcaagctcc ccaagccgga	1500
gatcatcaag gtagaccaga aagcgtggat gactgacgag gagttcgcca gggagatgct	1560
cgcggcgctc aacccatga tgatcaaacg cctcaccgtg agtgaccac tccatctacc	1620
ggccattgaa caaatcgtc catacatgtc actaatcaat actcacaccg ttttgaccgc	1680

ES 2 600 353 T3

```

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 gtgccatcg agctgagctc gccgctgac cagggcgagc 1980
tgaccaccgc caagagcgcc gtgtacacgc cgacgacgc cggcgaggag ggctggatat 2040
ggcagctcgc caaggcctac gcctccgtga acgactacgg gtggcaccag ctcatcagcc 2100
actggctcaa cacgcacgcc gtcattggag ccttcgtcat cgccaccaac aggagctca 2160
gcgtcaccca cccggtctac aagctcctgc acccgacta ccgcgacacc atgaacatca 2220
acgcgcgggc gcgcgggctg ctcatcaacg ccggcgccgt catcgagatg accgtgttcc 2280
cgcacaagca cgccatgcc atgtcctcca tggctctaaa gcaactggaac ttcaccgaac 2340
aagctctccc cgccgatcta atcaagaggt gcaacatgtt tacattatat aattgacgaa 2400
acggtccttg atttgatcaa aatgattaat cgatcttgat ggttgatgat gatgtagggg 2460
catggcggtg gaggacgat cgagcccgca caaggtgcgg ctgctgatca aggactaccc 2520
gtacgcgacc gacgggctgg ccgtgtggga cgccatcgag cagtgggtgt cggactacct 2580
gaccatctac taccccaacg acggcggtgt gcaggggcag gtggagctgc aggcgtggtg 2640
gaaggaggtg agggaggtcg ggcacggcga cctcaaggac gcggcggtgat ggccaaagat 2700
gcagacggtg gcggagctga tcaaggcggt cgccaccatc atctggaccg ggtcggcgct 2760
ccacgcggcc gtcaacttog ggcagtaccc ctactcgggc taccacccca acaagccgtc 2820
ggcgagccgg aggcgatgc cgggtgcagg gagcgaggag tacgcggagc tggagcgaga 2880
cccgagagaag gccttcatcc gcaccatcac cagccagttc catgccctgg tgggcatctc 2940
gctcatggag atcctctcca agcactcctc cgacgaggtc tacctgggcc agcacgacac 3000
gccggcggtg acgtcggacg ccaaggcgct ggaggcggtc aagcggttcg gggcgaagct 3060
ggagggcatc gagaagcagg tgggtggccat gaactcggac ccgcagctaa agaaccgcac 3120
cgggcccggc aagttcccat acatgctgct ctacccaaac acctccgacc acacgggaca 3180
ggccgagggg ctaccgccca ggggcatccc gaacagcata tccatctga 3229

```

<210> 7

<211> 864

5 <212> PRT

<213> Hordeum vulgare cv: Barke

<400> 7

10

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

ES 2 600 353 T3

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
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
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
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

ES 2 600 353 T3

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

ES 2 600 353 T3

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			

ES 2 600 353 T3

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> 8

<211> 684

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare mutante A689

<400> 8

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

ES 2 600 353 T3

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
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
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
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

ES 2 600 353 T3

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

ES 2 600 353 T3

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> 9
<211> 6459
<212> ADN
<213> Barley cv. Prestige

<400> 9

atggctgcgg	cggcggggga	cgtggaggcg	ttcctggcgg	cgtgccaggc	gtcgggagac	60
gcggcgtagc	gcgccgcaa	ggccgtgctg	gagcggctcg	aggcgccggc	cacgcgcgcc	120
gaggccaggc	ggctcctcgg	cgccgtgcga	cggcgcttcg	ccgccggcgg	cccggccgcg	180
gggctcgagt	gcttccgcac	cttccacttc	cgcattccacg	acgtcgtcct	cgacccccac	240
ctccaagggt	gcccggcccc	ttccctacac	acccgttgct	gaccgcgcatc	tctttcgccg	300
atctggccgt	caaaagcacg	cggcttggtg	gaaatcaagc	ctgcaatcct	gatccgttta	360
tggctggcca	gtcgatcagt	aatttgacca	taactggagt	ataaccttgg	tctctaattc	420
ctacctgacc	atataccgag	ttggttttct	ttcttcttgt	ttccgtatct	gtgtagtttt	480
ttcttttctt	tcgagcatga	tgttctttga	attaatgcgt	accagactcc	agtaattcga	540
cattttgaat	tttgccgagt	gttcttgga	tttataacac	aacgaggctt	tgatcaagtg	600
gtttatgtag	aggagtgttt	ttgttcttgt	gcaccgtata	caattctcta	tttcccaaca	660
atcttgatgg	cctctaagca	tcctgtagtc	atgtctactg	tgtaagctac	agatttatct	720
atgtctatgt	gtaagctgca	aatggagaga	aaagctatct	atctgggttg	tccagcttgt	780
tctttggcag	aacaatcctg	cccatcctat	caccataagt	ataaaagcac	gacaaatgag	840
tggggcaagc	atgctgcca	gctaatacac	gacataagct	acataatttg	aggggcatgt	900
tatctttttt	tttcccttct	actcagtttc	ttctttggga	gaacaatcct	actcaaccta	960
taatcataag	aataaaagca	agacagatga	gtgctgcaga	ctattggcat	atataacaac	1020
taaataggac	atctgtccgc	tatatcttta	gttaataatt	gtatatagac	gcagtccttg	1080
tgctggaaaa	actgcaacta	aatattttct	tacattatat	ggaatctggg	tgtgatatga	1140
cttctttgtt	acgttttgtg	tgcataaagc	attaacttct	gtcttttagtt	ggcgagcgg	1200
taaaaacacc	cattgcttaa	tattttatct	gctttccgta	gcttgataaa	atttcaactg	1260
cttctaggat	tccagcaaag	aaagaagcta	acaatgatgg	agataccag	cattttcatt	1320

10

ES 2 600 353 T3

ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcattccaga ttccatcttc	1380
agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatgggt ggatatccat tgcacttgca	1440
gaaaagtggg gcccttcgaa gggtggcacc tcttggtccg tagatattta tcttatctcg	1500
tttggtgcaa acatgggacc tgcagaagtt agacatttac tcaggttact ttatatgaaa	1560
cttttaggtg tctgccagta gtctgctggt ggtctaattt tcttggtata cctgatgccg	1620
tcgagcatat tgctttcaaa ttttgggcaa ggcattacca ccacatattg tttctacaat	1680
gctgaacaat tgctctcctt tgaaaggaag aaaaacaaga atgacatgca ccttagtagt	1740
ttaagccaca aataccagcg aatcaaatta gtttgcagtc agcttggcat taccttactt	1800
gagccttggg tgttcttttg aaggtttatg gtctggatat aaaccaaga gctatcaaga	1860
ttgcatggat aaacctttac ttgaatgcac tagacgacga tggctctcca atctatgatg	1920
cggaggggaa aacattgctt gacagagtcg aattctatga atctgatctt ctttcttact	1980
gtagagataa caagatagaa cttgatcgca ttgttgatg cataccacag gtacggtcag	2040
gtttttacca atttcctgtg aatggggatt atagtcgatc agaacttgat caaaatgcc	2100
ttaatatctg cctttcagat tcttaacccc aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact	2160
gaaaattcaa gtgaggagt cttgtactcc ttgagcaact actgtgctct ccaggtgagt	2220
tgagatctat ttaaactcaa gccattcagt ttacctgtta ctaaattggt acccatgtca	2280
gagtctccaa atctttttct tttctcaaac agcaaagaga gaagaaaact tttaagttct	2340
atcctgaaat tgactttaca atgcttggtc ataactctgt tacgaaatat gcgtttgaac	2400
atctctcttt tccttgtagg catgtggtca gacctttata taagaaaatg aagtttttgt	2460
agaaataatg tatgctttgt acttatgaca tggttccacc agtataatca atttaagtct	2520
aggtagttag gaacctagga tggagagcac cgacagtgt taatatatat atgtcgatag	2580
ggggttagca gtccaaatcc acctcaagtt caacctattg cataactttt ggtcttacia	2640
cctgtatgga caaatgtgat cagcaccoca gtctttccta taaaaatgtc tgctggaata	2700
tggaattatt aacagcggta tttattttta cctgttttaa ttttttcctt tgctaaaaga	2760
atgataatcc ttatgccacg aggttacatt gtattactca agtcaatatt tgttactatg	2820
gctgattgta cgattccagc ttccggttgt taattttgtt atgtttgtga actttgctgc	2880
attcaggggt ttgttgagga ccaatttggc ctcgggttga ttgctcgggc tggtgaagaa	2940
gggatatctg tgataaagcc tagtggtctt atggtattca acatgggagg ccggccagga	3000
caaggtgtct gtgagcgcct atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa	3060
acaaaaatta tgcaggtagc aattctttga gtgactagat gttaactaat ccagtgttt	3120
ttccatgcca gcaacagcat tatatcctgg ttagaggaat atgctcttca tggtgcacac	3180

ES 2 600 353 T3

caatcttcag	ctgggcctag	aattttcatc	taccggctta	catttttaca	ttacagaacc	3240
aatttttggt	gaggatcatt	accaactagt	tgggtctttg	caggctgctg	acacagacat	3300
ctccgcttta	gttgaaattg	agaaaaatag	ccgacatcgc	ttcgagttct	ttatggatct	3360
tgttggggat	cagcctgtgt	gtgcgcgcac	agcatgggca	tacatgaaat	ctggtggccg	3420
catttcacat	gctttgtctg	tgtatagctg	tcaacttcgc	cagcccaacc	aggtacctat	3480
actctctgat	tagatcttta	caacaataat	atagtaatgt	caggaataat	aataatttgg	3540
agaatttcag	gtgaagaaaa	tatttgagtt	ccttaaagac	ggattccatg	aagtcagcag	3600
ctccctcgat	ttgtcctttg	atgatgattc	tgttgctgat	gaaaaaattc	ctttcctagc	3660
atacctagct	agtttcttgc	aagagaataa	gtctaatcct	tgtgagcctc	cagctggatg	3720
tttaaatttc	cggaatcttg	ttgctggatt	tatgaagagt	taccaccaca	tcccattaac	3780
tcctgatgta	agacttggtg	tctattgcct	acaattatgt	ttgcttatta	gaaattcata	3840
agatcaacct	atttgatgct	tctcacgtat	gcttcatgtg	acacttcctt	ttcctctggt	3900
gcaccagaat	gttggtgtgt	tcccatcccg	tgctgttgca	atcgaaaatg	ctcttcggtt	3960
gttctcacct	ggacttgcaa	ttgttgacga	acacctaacc	agacacttgc	ccaagcaatg	4020
gtaacatct	ttagcaattg	aggtactttg	accgatactc	ccctctttct	ttctgtgttt	4080
ggaactgtgg	aaaatacatg	tgttctgtga	agaaaaagtt	atgctgacaa	gaatttcgat	4140
gttattgcca	ttcttctaaa	tttcaggaaa	gtaaccatgc	taaagataca	gtaactgtaa	4200
tcgaagcacc	acgccaatca	gatttgctga	ttgagttgat	caggaaactg	aagcctcagg	4260
ttgttgttac	tggcatggct	cagtttgagg	ctatcaccag	tgctgctttc	gtgaacttat	4320
taagtgtaac	gaaagatgtt	ggttcccgat	tattactaga	tatttcagaa	catctggaat	4380
tgtctagtct	gccaagetca	aatggtgtat	tgaaatatct	tgctgggaag	accctgcctt	4440
cacatgcggc	tatattgtgt	ggcttagtta	agaatcaggt	gtgtgtcaat	cagcctgaac	4500
tctagttgaa	ctgttggtga	tactatatag	aatatcttga	cttttatatg	tactttagaa	4560
acactgttta	aatgtactca	tttctttttg	cttcatttta	cttgacaggtt	tattctgata	4620
tggaaagttgc	ttttgctatc	tctgaagatc	caactgttta	taaggcattg	tcacaaacta	4680
ttgagctatt	ggaaggacat	acttctgtga	tcagccagca	ctattatggt	tgtcttttcc	4740
atgagctgct	ggcatttcaa	attggtgacc	ggcatccaca	acaagaggta	aacatggctt	4800
gcctcttcca	gttctccatc	tcaactcagtt	ctgtccacaa	ggtgccgaat	gatctgttca	4860
agtggacact	cccctcagca	cgggcaagct	agtccatgaa	tttggaattag	ttccctctta	4920
gctgggtact	tcgattacac	cacaatgagc	tcctcaacgt	ggtctggttt	atgtttttca	4980
tgttttccct	ctaatgtttg	gttgctcttt	ttcagagaga	acctgcagaa	gtgatatcta	5040
aggagatgat	agggttttca	agttcagcta	tgtccaccct	agaaggagct	gagtttttcg	5100

ES 2 600 353 T3

```

ttcctggttc catggaatcc ggtgtcatatc atatggatct ggaccgcagc ttcttgccag 5160
taccttctgc agtaaacgcc tccattttcg aaagttttgt tcgtcagaac atcactgatt 5220
ctgaaaccga tgtccgttcc agcattcagc agctggtgaa agatagctat ggtttctcag 5280
caggcggtgc ttctgaaatt atatacggga acacctgtct cgcgctcttc aacaagcttg 5340
ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgcttttccc cttgggaacc aacgggcatt 5400
acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt 5460
caggcttcaa gatcgaacca agtgctctag ccgacacact agagaagggtg tctcagccgt 5520
gggtctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata 5580
tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtggtgata gatacctcct 5640
cctctggtct ggagttccaa gccaccggtc gcagccagtg gaatttgga agatgtcttt 5700
ctaagtcaa gtcttcaaag ccctcgttct ccgttgctct gctcgagag ctgtcctttg 5760
agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tccttggttg 5820
acacatttta cagtttccca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttca 5880
ggaagctgtt gggctctaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc 5940
agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggatatc 6000
ctgtgttttag gctctctgtt ttcttccctc gatcagctct ccgatccctc tacatcctta 6060
ggctaatttc agtacttcaa gtttgccacg catttctgac atattctttc ctcttgtttt 6120
attttctctg gatgtgatga acagacgctt gagagctgcg gctgggacgc tgtgggctgc 6180
catggcggca tctcgatgct tgcaaaaccg accgcctaca ttggcaaata gctcaagggtg 6240
gacggctttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctcct gaggtccacc 6300
gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgccg actactgccg cttcagcttt 6360
gctctggaga gggcgactt cgaccgggcc atggagtgca tcgcccgggt caggagctg 6420
gtccttggtg gcggtgctaa ggtgaatggt agcaactag 6459

```

<210> 10

<211> 6459

<212> ADN

<213> Barley, Mutante 8063

<400> 10

```

atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcctggcgg cgtgccaggc gtcgggcgac 60
gcggcgtagc gcgcgcgcaa ggccgtgctg gagcggtcgc aggcgcgggc cacgcgcgcc 120
gaggccaggc ggctcctcgc cgccgtgcga cggcgcttcg ccgcgggcgc cccggccgcg 180
gggctcgagt gcttcgcgac cttccacttc cgcacccacg acgtcgtcct cgacccccac 240
ctccaagggt gcccgggccc ttccctacac acccgttgtc gaccgcgac tctttcgccg 300

```

ES 2 600 353 T3

atctggccgt caaaagcacg cggcttggtgta gaaatcaagc ctgcaatcct gatccgttta	360
tggctggcca gtcgatcagt aatttgGCCa taactggagt ataaccttgg tctctaactct	420
ctacctgacc atataccgag ttggttttct ttcttcttgt ttccgtattt gtgtagtttt	480
ttcttttctt tcgagcatga tgttctttga attaatgcgt accagactcc agtaattcga	540
cattttgaat tttggcgagt gttcttgga tttataacac aacgaggctt tgatcaagtg	600
gtttatgtag aggagtgttt ttgttcttgt gcaccgtata caattctcta tttcccaaca	660
attttgatgg cctctaagca tcctgtagtc atgtctactg tgtaagctac agatttattc	720
atgtctatgt gtaagctgca aatggagaga aaagctatct atttggttgt tccagcttgt	780
tctttggcag aacaatcctg cccatcctat caccataagt ataaaagcac gacaaatgag	840
tggggcaagc atgctgccaa gctaatacac gacataagct acatattttg aggggcatgt	900
tatctttttt tttcccttct actcagtttc ttctttggga gaacaatcct actcaaccta	960
taatcataag aataaaagca agacagatga gtgctgcaga ctattggcat atataacaac	1020
taaataggac atctgtccgc tatatcttta gttaataatt gtatatagac gcagcttttg	1080
tgctggaaaa actgcaacta aatattttct tacattatat ggaatctggg tgtgatatga	1140
cttctttgtt acgttttgtg tgcataaagc attaaacttct gtcttttagtt ggcgcagcgg	1200
taaaaacacc cattgcttaa tattttattt gctttccgta gcttgataaa atttcaactg	1260
cttctaggat tccagcaaag aaagaagcta acaatgatgg agatacccag cattttcatt	1320
ccagaagact ggtcattcac tttctacgag ggtctcaacc ggcattccaga ttccatcttc	1380
agggataaga cagtagcaga gctgggatgt ggcaatgggt ggatatccat tgcaacttgca	1440
gaaaagtggg gcccttcgaa gggtggcacc tcttgttccg tagatattta tcttatctcg	1500
tttgttgcaa acatgggacc tgcagaagtt agacatttac tcaggttact ttatatgaaa	1560
cttttaggtg tctgccagta gtctgctggt ggtctaattt tcttggtata cctgatgccg	1620
tcgagcatat tgctttcaaa ttttgggcaa ggcattacca ccacatattg tttctacaat	1680
gctgaacaat tgctctcctt tgaaaggaag aaaaacaaga atgacatgca ccttagtagt	1740
ttaagccaca aataccagcg aatcaaatta gtttgcagtc agcttggcat taccttactt	1800
gagccttggg tgttcttttg aaggtttatg gtctggatat aaaccaaga gctatcaaga	1860
ttgcatggat aaacctttac ttgaatgcac tagacgacga tgggtctcca atctatgatg	1920
cggaggggaa aacattgctt gacagagtog aattctatga atctgatctt ctttcttact	1980
gtagagataa caagatagaa cttgatcgca ttgttggatg cataccacag gtacggtcag	2040
gtttttacca atttctgtg aatggggatt atagtogatc agaacttgat caaaatgcc	2100
ttaatattctg cctttcagat tcttaacccc aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact	2160

ES 2 600 353 T3

gaaaattcaa gtgaggagtt cttgtactcc ttgagcaact actgtgctct ccagggtgagt	2220
tgagatctat ttaaaactcaa gccattcagt ttacctgtta ctaaattggtt acccatgtca	2280
gagtctccaa atctttttct tttctcaaac agcaaagaga gaagaaaact ttttaagttct	2340
atcctgaaat tgactttaca atgcttggtc ataactctgct tacgaaatat gcgtttgaac	2400
atttctcttt tccttgtagg catgtggtca gacctttata taagaaaatg aagtttttgt	2460
agaaataatg tatgctttgt acttatgaca tggttccacc agtataatca atttaagtct	2520
aggtagttag gaacctagga tggagagcac cgacagtgtg taatatatat atgtcgatag	2580
ggggttagca gtccaaatcc acctcaagtt caacctattg cataactttt ggtcttacia	2640
cctgtatgga caaatgtgat cagcacccca gtctttccta taaaaatgtc tgctggaata	2700
tggaattatt aacagcggta tttattttta cctgtttta ttttttctt tgctaaaaga	2760
atgataatcc ttatgccacg aggttacatt gtattactca agtcaatatt tgttactatg	2820
gctgattgta cgattccagc ttccggttgt taattttgtt atgtttgtga actttgtgc	2880
attcagggtt ttgttgagga ccaatttggc ctccggttga ttgctcgggc tgttgaagaa	2940
gggatatctg tgataaagcc tagtggctct atggtattca acatgggagg ccggccagga	3000
caagggtgct gtgagcgctt atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa	3060
acaaaaatta tgcagatagc aattctttga gtgactagat gttaaactaat cccagtgttt	3120
ttccatgccg gcaacagcat tatatcctgg ttagaggaat atgctcttca tgttgcacac	3180
caatcttcag ctgggcctag aattttcatc taccggctta catttttaca ttacagaacc	3240
aatttttgtt gaggatcatt accaactagt tgggtctttg caggctgctg acacagacat	3300
ctccgcttta gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct	3360
tgttggggat cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg	3420
catttcacat gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtacctat	3480
actctctgat tagatcttta caacaataat atagtaatgt caggaataat aataatttgg	3540
agaatttcag gtgaagaaaa tatttgagtt ccttaaagac ggattccatg aagtcagcag	3600
ctccctcgat ttgtcctttg atgatgattc tgttgctgat gaaaaattc ctttcctagc	3660
atacctagct agtttcttgc aagagaataa gtctaactct tgtgagcctc cagctggatg	3720
tttaaatttc oggaatcttg ttgctggatt tatgaagagt taccaccaca tcccattaac	3780
tcctgatgta agacttggtg tctattgcct acaattatgt ttgcttatta gaaattcata	3840
agatcaacct atttgatgct tctcacgtat gcttcattgt acattcctt ttcctctggt	3900
gcaccagaat gttgttgtgt tcccatcccg tgctgttgca atcgaaaatg ctcttcggtt	3960
gttctcacct ggacttgcaa ttgttgacga acacctaacc agacacttgc ccaagcaatg	4020
gttaacatct ttagcaattg aggtactttg accgatactc ccctctttct ttctgtgttt	4080

ES 2 600 353 T3

ggaactgtgg aaaatacatg tgttctgtga agaaaaagtt atgctgacaa gaatttcgat	4140
gttattgccca ttcttctaaa tttcaggaaa gtaaccatgc taaagatata gtaactgtaa	4200
tcgaagcacc acgccaatca gatttgcgtga ttgagttgat caggaaactg aagcctcagg	4260
ttgttggttac tggcatggct cagtttgagg ctatcaccag tgctgcttcc gtgaacttat	4320
taagtgtaac gaaagatgtt ggttcccgat tattactaga tatttcagaa catctggaat	4380
tgtctagtct gccaaagctca aatgggtgat tgaatatatct tgctgggaag accctgcctt	4440
cacatgcggc tatatttgtt ggcttagtta agaatacagg gtgtgtcaat cagcctgaac	4500
tctagttgaa ctggttggtca tactatatag aatatcttga cttttatatg tacttttagaa	4560
acactgttta aatgtactca tttctttttg cttcatttta cttgcagggt tattctgac	4620
tggaaagttgc ttttgctatc tctgaagatc caactgttta taaggcattg tcacaaacta	4680
ttgagctatt ggaaggacat acttctgtga tcagccagca ctattatggt tgtcttttcc	4740
atgagctgct ggcatttcaa attgggtgacc ggcattccaca acaagaggt aacatggctt	4800
gcctcttcca gttctccatc tcaactcagtt ctgtccacaa ggtgccgaat gatctgttca	4860
agtggacact cccctcagca cgggcaagct agtccatgaa tttggattag ttccctctta	4920
gctgggtact tcgattacac cacaatgagc tcctcaacgt ggtctggttt atgtttttca	4980
tgttttccct ctaatgtttg gttgctcttt ttcagagaga acctgcagaa gtgatatcta	5040
aggagatgat aggggttttca agttcagcta tgtccaccct agaaggagct gagtttttcg	5100
ttcctgggtc catggaatcc ggtgtcatatc atatggatct ggaccgcagc ttcttgccag	5160
taccttctgc agtaaacgcc tccattttcg aaagttttgt tcgtcagaac atcactgatt	5220
ctgaaaccga tgtccgttcc agcattcagc agctgggtgaa agatagctat ggtttctcag	5280
caggcgggtgc ttctgaaatt atatacggga acacctgtct cgcgctcttc aacaagcttg	5340
ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgcttttccc cttgggaacc aacgggcatt	5400
acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt	5460
caggcttcaa gatogaacca agtgctctag ccgacacact agagaagggtg tctcagccgt	5520
gggtctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata	5580
tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtgggtgata gatactcct	5640
cctctgggtc ggagttccaa gccaccggct gcagccagtg gaatttgga agatgtcttt	5700
ctaatgtcaa gtcttcaaag ccctcgttct ccgttgtcct gctcggagag ctgtcctttg	5760
agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tccttggttg	5820
acacatttta cagtttcca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttca	5880
ggaagctgtt gggctcttaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc	5940

ES 2 600 353 T3

```

agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggatata 6000
ctgtgttttag gctctctgtt ttcttcccct gatcagctct ccgatcccct tacatcctta 6060
ggctaatttc agtacttcaa gtttgccacg catttctgac atattctttc ctcttgTTTT 6120
atTTTctgt gatgtgatga acagacgctt gagagctgcg gctgggacgc tgtgggctgc 6180
catggcggca tctcgatgct tgcaaaaccg accgcctaca ttggcaaata gctcaaggTg 6240
gacggctttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctcct gaggtccacc 6300
gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgccg actactgccg ctTcagcttt 6360
gctctggaga gggcgactt cgaccgggcc atggagtTga Tcgcccggt caggagctg 6420
gtccttggtg gcggtgctaa ggtgaatggt agcaactag 6459

```

<210> 11

<211> 6459

<212> ADN

<213> Barley cv. Sebastian

<400> 11

```

atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcctggcgg cgtgccaggc gtcgggcgac 60
gcggcgtagc gcgcgcgcaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgcgggc cagcgcgccc 120
gaggccaggc ggctcctcgg cgccgtgcga cggcgcttcg ccgcgggcgg cccggccgcg 180
gggctcgagt gcttcgcac cttccacttc cgcatccacg acgtcgtcct cgacccccac 240
ctccaaggTt gcccgggccc ttcctacac acccgTgtc gaccgcata tctttcgccg 300
atctggccgt caaaagcac cggcttggtT gaaatcaagc ctgcaatcct gatccgttta 360
tggtggcca gtcgatcagt aatttgcca taactggagt ataacctTg tctctaactc 420
ctacctgacc atataccgag ttggttttct ttcttctgt ttccgtattt gtgtagtttt 480
ttcttttctt tcgagcatga tgttctttga attaatgct accagactcc agtaattcga 540
cattttgaat tttggcgagt gttcttgga tttataaac aacgaggctt tgatcaagtg 600
gtttatgtag aggagtgtt ttgttctgt gcaccgtata caattctcta tttccaaca 660
atTTTgatgg cctctaagca tcctgtagt atgtctactg tgtaagctac agatttatTc 720
atgtctatgt gtaagctgca aatggagaga aaagctatct atttggTgt tccagctTgt 780
tctttggcag aacaatcctg cccatcctat caccataagt ataaaagcac gacaaatgag 840
tggggcaagc atgctgcaa gctaatacac gacataagct acatatTTTg aggggcatgt 900
tatctTTTTt tttcccttct actcagtttc ttctttggga gaacaatcct actcaaccta 960
taatcataag aataaaagca agacagatga gtgctgcaga ctattggcat atataacaac 1020
taaataggac atctgtccgc tatactttta gttaataatt gtatatagac gcagtctTtg 1080
tgctggaaaa actgcaacta aatattttct tacattatat ggaatctggg tgtgatatga 1140

```

ES 2 600 353 T3

cttctttgtt	acgttttgtg	tgcataaagc	attaacttct	gtcttttagtt	ggcgcagcgg	1200
taaaaacacc	cattgcttaa	tattttattt	gctttccgta	gcttgataaa	atttcaactg	1260
cttctaggat	tccagcaaag	aaagaagcta	acaatgatgg	agatacccag	cattttcatt	1320
ccagaagact	ggtcattcac	tttctacgag	ggctcacaac	ggcatccaga	ttccatcttc	1380
agggataaga	cagtagcaga	gctgggatgt	ggcaatgggt	ggatatccat	tgcacttgca	1440
gaaaagtggg	gcccttcgaa	ggttggcacc	tcttgttccg	tagatattta	tcttatctcg	1500
tttggtgcaa	acatgggacc	tgcagaagtt	agacatttac	tcaggttact	ttatatgaaa	1560
cttttaggtg	tctgccagta	gtctgctggg	ggctcaattt	tcttggtata	cctgatgccg	1620
tcgagcatat	tgctttcaaa	ttttgggcaa	ggcattacca	ccacatattg	tttctacaat	1680
gctgaacaat	tgctctcctt	tgaaaggaag	aaaaacaaga	atgacatgca	ccttagtagt	1740
ttaagccaca	aataccagcg	aatcaaatta	gtttgcagtc	agcttggcat	taccttactt	1800
gagccttggg	tggttctttg	aagggtttatg	gtctggatat	aaaccaaga	gctatcaaga	1860
ttgcatggat	aaacctttac	ttgaatgcac	tagacgacga	tggtctccca	atctatgatg	1920
cggaggggaa	aacattgctt	gacagagtcg	aattctatga	atctgatctt	ctttcttact	1980
gtagagataa	caagatagaa	cttgatcgca	ttgttggatg	cataccacag	gtacggtcag	2040
gtttttacca	atttcctgtg	aatggggatt	atagtcgac	agaacttgat	caaaatgcc	2100
ttaatatctg	cctttcagat	tcttaacccc	aatccagagg	caatgtcaaa	gattgtaact	2160
gaaaattcaa	gtgaggagtt	cttgtagctc	ttgagcaact	actgtgctct	ccaggtagt	2220
tgagatctat	ttaaaactca	gccattcagt	ttacctgtta	ctaaatgggt	acctatgca	2280
gagtctccaa	atctttttct	tttctcaaac	agcaaagaga	gaagaaaact	tttaagttct	2340
atcctgaaat	tgactttaca	atgcttggtc	ataatctgct	tacgaaatat	gcgtttgaac	2400
atttctcttt	tccttgtagg	catgtgggtc	gacctttata	taagaaaatg	aagtttttgt	2460
agaaataatg	tatgctttgt	acttatgaca	tggttccacc	agtataatca	atttaagtct	2520
aggtagttag	gaacctagga	tggagagcac	cgacagtgt	taatatatat	atgtcgatag	2580
ggggttagca	gtccaaatcc	acctcaagtt	caacctattg	cataactttt	ggtcttacia	2640
cctgtatgga	caaatgtgat	cagcacccca	gtctttccta	taaaaatgtc	tgctggaata	2700
tgggaattatt	aacagcggt	tttattttta	ccctgtttta	ttttttcctt	tgctaaaaga	2760
atgataatcc	ttatgccacg	aggttacatt	gtattactca	agtcfaatatt	tgttactatg	2820
gctgattgta	cgattccagc	ttccggttgt	taattttgtt	atgtttgtga	actttgctgc	2880
attcaggggt	ttgttgagga	ccaatttggc	ctcgggttga	ttgctcgggc	tggtgaagaa	2940
gggatatctg	tgataaagcc	tagtgggtct	atggtattca	acatgggagg	ccggccagga	3000
caagggtgtct	gtgagcgct	atttctacgc	cgtggatttc	gcatcaataa	gctctggcaa	3060

ES 2 600 353 T3

acaaaaatta tgcaggtagc aattctttga gtgactagat gttaactaat cccagtgttt	3120
ttccatgccca gcaacagcat tatatcctgg ttagaggaat atgctcttca tgttgcacac	3180
caatcttcag ctgggcctag aattttcatc taccggctta catttttaca ttacagaacc	3240
aatttttggt gaggatcatt accaactagt tgggtctttg caggctgctg acacagacat	3300
ctccgcttta gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct	3360
tgttggggat cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg	3420
catttcacat gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtacctat	3480
actctctgat tagatcttta caacaataat atagtaatgt caggaataat aataatttgg	3540
agaatttcag gtgaagaaaa tatttgagtt ccttaaagac ggattccatg aagtcagcag	3600
ctccctcgat ttgtcctttg atgatgattc tgttgctgat gaaaaattc ctttcctagc	3660
atacctagct agtttcttgc aagagaataa gtctaactct tgtgagcctc cagctggatg	3720
tttaaatttc cggaatcttg ttgctggatt tatgaagagt taccaccaca tcccat AAC	3780
tcctgatgta agacttggtg tctattgcct acaattatgt ttgcttatta gaaattcata	3840
agatcaacct atttgatgct tctcacgtat gcttcatgtg acacttcctt ttctctggt	3900
gcaccagaat gttgttgtgt tcccatcccg tgctgttgca atcgaaaatg ctcttcggtt	3960
gttctcacct ggacttgcaa ttgttgacga acacctaac agacacttgc ccaagcaatg	4020
gttaacatct ttagcaattg aggtactttg accgatactc ccctcttctt ttctgtgttt	4080
ggaactgtgg aaaatacatg tgttctgtga agaaaaagtt atgctgacaa gaatttcgat	4140
gttattgccca ttcttctaaa tttcaggaaa gtaacctgc taaagataga gtaactgtaa	4200
tcgaagcacc acgccaatca gatttgctga ttgagttgat caggaaactg aagcctcagg	4260
ttgttgttac tggcatggct cagtttgagg ctatcaccag tgctgcttcc gtgaacttat	4320
taagtgtaac gaaagatgtt ggttcccgat tattactaga tatttcagaa catctggaat	4380
tgtctagtct gccaaactca aatggtgtat tgaaatatct tgctgggaag accctgcctt	4440
cacatgccc tatatttgtgt ggcttagtta agaactcagg gtgtgtcaat cagcctgaac	4500
tctagttgaa ctggtgtgca tactatatag aatatcttga cttttatatg tacttttaga	4560
acactgttta aatgtactca tttctttttg cttcatctta cttgcagggt tattctgac	4620
tggaagttgc ttttgctatc tctgaagatc caactgttta taaggcattg tcacaaacta	4680
ttgagctatt ggaaggacat acttctgtga tcagccagca ctattatggt tgtcttttcc	4740
atgagctgct ggcatttcaa attggtgacc ggcattccaca acaagaggta aacatggctt	4800
gcctcttcca gttctccatc tcaactcagtt ctgtccacaa ggtgccgaat gatctgttca	4860
agtggacact cccctcagca cgggcaagct agtccatgaa tttggattag ttccctctta	4920

ES 2 600 353 T3

gctgggtact tcgattacac cacaatgagc tcctcaacgt ggtctggttt atgtttttca 4980
 tgttttccct ctaatgtttg gttgctcttt ttccagagaga acctgcagaa gtgatatacta 5040
 aggagatgat aggggttttca agttcagcta tgtccaccct agaaggagct gagtttttcg 5100
 ttcttggttc catggaatcc ggtgtcatac atatggatct ggaccgcagc ttcttgccag 5160
 taccttctgc agtaaacgcc tccattttcg aaagttttgt tcgtcagaac atcactgatt 5220
 ctgaaaccga tgtccgttcc agcattcagc agctggtgaa agatagctat ggtttctcag 5280
 caggcggtgc ttctgaaatt atatacggga acacctgtct cgcgctcttc aacaagcttg 5340
 ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgcttttccc cttgggaacc aacgggcatt 5400
 acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt 5460
 caggcttcaa gatcgaacca agtgctctag ccgacacact agagaagggtg tctcagccgt 5520
 ggggtctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata 5580
 tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtggtgata gatacctcct 5640
 cctctggtct ggagttccaa gccaccggct gcagccagtg gaatttgaa agatgtcttt 5700
 ctaatgtcaa gtcttcaaag ccctcgttct ccgttgtcct gctcgagag ctgtcctttg 5760
 agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tcttggttg 5820
 acacatttta cagtttccca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttca 5880
 ggaagctgtt gggctttaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc 5940
 agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggataac 6000
 ctgtgttttag gctctctgtt ttcttccct gatcagctct ccgatccctt tacatcctta 6060
 ggctaatttc agtacttcaa gtttgccacg catttctgac atattctttc ctcttgtttt 6120
 attttctctg gatgtgatga acagacgctt gagagctgcg gctgggacgc tgtgggctgc 6180
 catggcgcca tctcgatgct tgcaaaaccg accgcctaca ttggcaaata gctcaagggtg 6240
 gacggctttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctcct gaggtccacc 6300
 gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgccg actactgccg cttcagcttt 6360
 gctctggaga gcggcgactt cgaccgggcc atggagtgca tcgcccgggt caggagctg 6420
 gtccttggtg gcggtgctaa ggtgaatggt agcaactag 6459

<210> 12

<211> 6459

5 <212> ADN

<213> Barley, Mutante 14018

<400> 12

atggctgcgg cggcggggga cgtggaggcg ttcttgccgg cgtgccaggc gtcgggcgac 60
 gcggcgtagc gcgccgcaaa ggccgtgctg gagcggctcg aggcgccggc cagcgcgcc 120

10

ES 2 600 353 T3

gaggccaggc	ggctcctcgg	cgccgtgcga	cggcgcttcg	ccgccggcgg	cccgcccgcg	180
gggctcgagt	gcttcgcgac	cttcacttc	cgcattccacg	acgtcgctct	cgacccccac	240
ctccaagggt	gcccggcccc	ttccctacac	accggttgtc	gacccgcac	tctttcgccg	300
atctggccgt	caaaagcacg	cggcttggtg	gaaatcaagc	ctgcaatcct	gatccgttta	360
tggctggcca	gtcgatcagt	aatttggtg	taactggagt	ataaccttgg	tctctaattct	420
ctacctgacc	atataccgag	ttggttttct	ttcttcttct	ttccgtattt	gtgtagtttt	480
ttcttttctt	tgcagcatga	tgttctttga	attaatgcgt	accagactcc	agtaattcga	540
cattttgaat	tttggcgagt	gttcttgga	tttataacac	aacgaggctt	tgatcaagtg	600
gtttatgtag	aggagtgttt	ttgttcttct	gcaccgtata	caattctcta	tttcccaaca	660
attttgatgg	cctctaagca	tcctgtagtc	atgtctactg	tgtaagctac	agattttattc	720
atgtctatgt	gtaagctgca	aatggagaga	aaagctatct	atgtggttct	tccagcttct	780
tctttggcag	aacaatcctg	cccatcctat	caccataagt	ataaaagcac	gacaaatgag	840
tggggcaagc	atgctgcca	gctaatacac	gacataagct	acatattttg	aggggcaggt	900
tatctttttt	tttcccttct	actcagtttc	ttctttggga	gaacaatcct	actcaacctt	960
taatacataag	aataaaagca	agacagatga	gtgctgcaga	ctattggcat	atataacaac	1020
taaataggac	atctgtccgc	tatatcttta	gttaataatt	gtatatagac	gcagtccttg	1080
tgctggaaaa	actgcaacta	aataatttct	tacattatat	ggaatctggg	tgtgatatga	1140
cttctttgtt	acgttttctg	tgcataaagc	attaacttct	gtctttagtt	ggcgagcggg	1200
taaaaacacc	cattgcttaa	tattttattt	gctttccgta	gcttgataaa	atttcaactg	1260
cttctaggat	tccagcaaag	aaagaagcta	acaatgatgg	agatacccag	cattttcatt	1320
ccagaagact	ggcattcac	tttctacgag	ggctccaacc	ggcatccaga	ttccatcttc	1380
agggataaga	cagtagcaga	gctgggatgt	ggcaatggtt	ggatatccat	tgcacttgca	1440
gaaaagtgg	gcccttcgaa	gattggcacc	tcttggtccg	tagatattta	tcttatctcg	1500
tttggtgcaa	acatgggacc	tgcagaagtt	agacatttac	tcaggttact	ttatatgaaa	1560
cttttaggtg	tctgccagta	gtctgctgg	ggcttaattt	tcttggtata	cctgatgccg	1620
tgcagcatat	tgctttcaaa	ttttgggcaa	ggcattacca	ccacatattg	tttctacaat	1680
gctgaacaat	tgctctcctt	tgaaaggaag	aaaaacaaga	atgacatgca	ccttagtagt	1740
ttaagccaca	aataccagcg	aatcaaatta	gtttgcagtc	agcttggcat	taccttactt	1800
gagccttgg	tgttcttttg	aaggtttatg	gtctggatat	aaaccaaga	gctatcaaga	1860
ttgcatggat	aaacctttac	ttgaatgcac	tagacgacga	tggctctcca	atctatgatg	1920
cggaggggaa	aacattgctt	gacagagtcg	aattctatga	atctgatctt	ctttcttact	1980
gtagagataa	caagatagaa	cttgatcgca	ttgttggtg	cataccacag	gtacggtcag	2040

ES 2 600 353 T3

gtttttacca atttcctgtg aatggggatt atagtcgac agaacttgat caaaatgccc	2100
ttaatatctg cctttcagat tcttaacccc aatccagagg caatgtcaaa gattgtaact	2160
gaaaattcaa gtgaggagt cttgtactcc ttgagcaact actgtgctct ccaggtgagt	2220
tgagatctat ttaaactcaa gccattcagt ttacctgtta ctaaattggt acccatgtca	2280
gagtctccaa atctttttct tttctcaaac agcaaagaga gaagaaaact tttaagttct	2340
atcctgaaat tgactttaca atgcttggtc ataactctgt tacgaaatat gcgtttgaac	2400
atctctcttt tcctttagg catgtggtca gacctttata taagaaaatg aagttttgt	2460
agaaataatg tatgctttgt acttatgaca tggttccacc agtataatca atttaagtct	2520
aggtagttag gaacctagga tggagagcac cgacagtga taatatatat atgtcgatag	2580
ggggttagca gtccaaatcc acctcaagtt caacctattg cataactttt ggtcttacia	2640
cctgtatgga caaatgtgat cagcaccoca gtctttccta taaaaatgc tgctggaata	2700
tggaattatt aacagcggt tttattttta cctgtttta ttttttctt tgctaaaaga	2760
atgataatcc ttatgccacg aggttacatt gtattactca agtcaatatt tgttactatg	2820
gctgattgta cgattccagc ttccggtgt taattttgtt atgtttgtga actttgctgc	2880
attcaggggt ttgttgagga ccaatttggc ctccgggtga ttgctcgggc tgttgaagaa	2940
gggatatctg tgataaagcc tagtggctct atggtattca acatgggagg ccggccagga	3000
caagggtgtc gtgagcgcct atttctacgc cgtggatttc gcatcaataa gctctggcaa	3060
acaaaaatta tgcaggtagc aattctttga gtgactagat gttactaat ccagtggtt	3120
ttccatgcca gcaacagcat tatacctgg ttagaggaat atgctcttca tgttgcacac	3180
caatcttcag ctgggcctag aattttcatc taccggctta catttttaca ttacagaacc	3240
aatttttgtt gaggatcatt accaactagt tgggtctttg caggctgctg acacagacat	3300
ctccgcttta gttgaaattg agaaaaatag ccgacatcgc ttcgagttct ttatggatct	3360
tgttggggat cagcctgtgt gtgcgcgcac agcatgggca tacatgaaat ctggtggccg	3420
catttcacat gctttgtctg tgtatagctg tcaacttcgc cagcccaacc aggtacctat	3480
actctctgat tagatcttta caacaataat atagtaatgt caggaataat aataatttgg	3540
agaatttcag gtgaagaaaa tatttgagtt ccttaaagac ggattccatg aagtcagcag	3600
ctccctcgat ttgtcctttg atgatgattc tgttgctgat gaaaaaattc ctttcctagc	3660
atacctagct agtttcttgc aagagaataa gtctaactct tgtgagcctc cagctggatg	3720
tttaaatctc cggaatcttg ttgctggatt tatgaagagt taccaccaca tcccataac	3780
tcctgatgta agacttggtg tctattgcct acaattatgt ttgcttatta gaaattcata	3840
agatcaacct atttgatgct tctcacgtat gcttcatgtg acacttcctt ttcctctggt	3900

ES 2 600 353 T3

gcaccagaat gttgttgtgt tcccatcccg tgctgttgca atcgaaaatg ctcttcggtt	3960
gttctcacct ggacttgcaa ttgttgacga acacctaacc agacacttgc ccaagcaatg	4020
gttaacatct ttagcaattg aggtactttg accgatactc ccctctttct ttctgtgttt	4080
ggaactgtgg aaaatacatg tgttctgtga agaaaaagt atgctgacaa gaatttcgat	4140
gttattgcca ttcttctaaa tttcaggaaa gtaaccatgc taaagataca gtaactgtaa	4200
tcgaagcacc acgccaatca gatttgctga ttgagttgat caggaaactg aagcctcagg	4260
ttgttggttac tggcatggct cagtttgagg ctatcaccag tgctgctttc gtgaacttat	4320
taagtgtaac gaaagatgtt ggttcccgat tattactaga tatttcagaa catctggaat	4380
tgtctagtct gccaaagctca aatgggtgat tgaaatatct tgctgggaag accctgcctt	4440
cacatgcggc tatatttgtt ggcttagtta agaactcagg gtgtgtcaat cagcctgaac	4500
tctagttgaa ctgttggtgca tactatatag aatatcttga cttttatatg tactttagaa	4560
acactgttta aatgtactca tttctttttg cttcatttta cttgcagggt tattctgac	4620
tggaaagttgc ttttgctatc tctgaagatc caactgttta taaggcattg tcacaaacta	4680
ttgagctatt ggaaggacat acttctgtga tcagccagca ctattatgg tgtcttttcc	4740
atgagctgct ggcathttcaa attggtgacc ggcatccaca acaagaggta aacatggctt	4800
gcctcttcca gttctccatc tcaactcagtt ctgtccacaa ggtgccgaat gatctgttca	4860
agtggacact cccctcagca cgggcaagct agtccatgaa tttggattag ttccctctta	4920
gctgggtact tcgattacac cacaatgagc tcctcaacgt ggtctggttt atgtttttca	4980
tgttttccct ctaatgtttg gttgctcttt ttcagagaga acctgcagaa gtgatatcta	5040
aggagatgat agggttttca agttcagcta tgtccaccct agaaggagct gagtttttcg	5100
ttcctggttc catggaatcc ggtgtcatac atatggatct ggaccgcagc ttcttgccag	5160
tacottctgc agtaaaagcc tccattttcg aaagttttgt tcgtcagaac atcaactgatt	5220
ctgaaaccga tgtccgttcc agcattcagc agctggtgaa agatagctat ggtttctcag	5280
caggcgggtgc ttctgaaatt atatacggga acacctgtct cgcgctcttc aacaagcttg	5340
ttctttgctg catgcaagaa cagggcacct tgcttttccc cttgggaacc aacgggcatt	5400
acgtcaacgc agcaaagttt gtgaatgcaa ccaccttgac tattccaacg aaggcagatt	5460
caggcttcaa gatcgaacca agtgctctag ccgacacact agagaagggt tctcagccgt	5520
gggtctatat ttctggcccc acaatcaacc ctactggctt cctgtacagt gacgacgata	5580
tagcagagct gctttctgtc tgtgcgacat acggagccag ggtggtgata gatacctcct	5640
cctctggtct ggagttccaa gccaccggct gcagccagtg gaatttgga agatgtcttt	5700
ctaattgtcaa gtcttcaaag ccctcgttct ccgttgtcct gctcggagag ctgtcctttg	5760
agctgaccac ggctgggctt gatttcgggt ttctgattat gagcgactcg tccttggttg	5820

ES 2 600 353 T3

```

acacatttta cagtttccca agcttgagtc ggccacacag cacgttgaag tacacgttca      5880
ggaagctggt gggctcttaag aaccagaagg atcagcattt ctctgatctc atccttgagc      5940
agaaggagac gttgaagaat cgtgccgacc agttgatcaa ggtatgcctt ttgggatatc      6000
ctgtgttttag gctctctggt ttcttcccct gatcagctct ccgatcccct tacatcctta      6060
ggctaatttc agtacttcaa gtttgccaag catttctgac atattctttc ctcttggttt      6120
attttcctgt gatgtgatga acagacgctt gagagctgcg gctgggacgc tgtgggctgc      6180
catggcggca tctcgatgct tgcaaaaccg accgcctaca ttggcaaadc gctcaagggt      6240
gacggctttg agggcaagct ggacagccac aacatgaggg aagccctcct gaggtccacc      6300
gggctgtgca ttagcagcag cgggtggaca ggggtgccgg actactgccg cttcagcttt      6360
gctctggaga gcggcgactt cgaccgggcc atggagtgca tcgcccggtt caggagctg      6420
gtccttggtg gcggtgctaa ggtgaatggt agcaactag      6459

```

<210> 13
 <211> 1088
 <212> PRT
 <213> Barley cv. Prestige
 <400> 13

```

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
1          5          10          15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
          20          25          30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
          35          40          45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
50          55          60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
65          70          75          80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
          85          90          95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
          100          105          110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
          115          120          125

```

ES 2 600 353 T3

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
 130 135 140
 Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Ala Ile Lys Ile
 145 150 155 160
 Ala Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp Gly Leu Pro
 165 170 175
 Ile Tyr Asp Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr
 180 185 190
 Glu Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile Glu Leu Asp
 195 200 205
 Arg Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Glu Ala
 210 215 220
 Met Ser Lys Ile Val Thr Glu Asn Ser Ser Glu Glu Phe Leu Tyr Ser
 225 230 235 240
 Leu Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly
 245 250 255
 Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
 260 265 270
 Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
 275 280 285
 Val Cys Glu Arg Leu Phe Leu Arg Arg Gly Phe Arg Ile Asn Lys Leu
 290 295 300
 Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ala Ala Asp Thr Asp Ile Ser Ala Leu
 305 310 315 320
 Val Glu Ile Glu Lys Asn Ser Arg His Arg Phe Glu Phe Phe Met Asp
 325 330 335
 Leu Val Gly Asp Gln Pro Val Cys Ala Arg Thr Ala Trp Ala Tyr Met
 340 345 350
 Lys Ser Gly Gly Arg Ile Ser His Ala Leu Ser Val Tyr Ser Cys Gln
 355 360 365
 Leu Arg Gln Pro Asn Gln Val Lys Lys Ile Phe Glu Phe Leu Lys Asp
 370 375 380

ES 2 600 353 T3

Gly	Phe	His	Glu	Val	Ser	Ser	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Phe	Asp	Asp	Asp	385	390	395	400
Ser	Val	Ala	Asp	Glu	Lys	Ile	Pro	Phe	Leu	Ala	Tyr	Leu	Ala	Ser	Phe	405	410	415	
Leu	Gln	Glu	Asn	Lys	Ser	Asn	Pro	Cys	Glu	Pro	Pro	Ala	Gly	Cys	Leu	420	425	430	
Asn	Phe	Arg	Asn	Leu	Val	Ala	Gly	Phe	Met	Lys	Ser	Tyr	His	His	Ile	435	440	445	
Pro	Leu	Thr	Pro	Asp	Asn	Val	Val	Val	Phe	Pro	Ser	Arg	Ala	Val	Ala	450	455	460	
Ile	Glu	Asn	Ala	Leu	Arg	Leu	Phe	Ser	Pro	Gly	Leu	Ala	Ile	Val	Asp	465	470	475	480
Glu	His	Leu	Thr	Arg	His	Leu	Pro	Lys	Gln	Trp	Leu	Thr	Ser	Leu	Ala	485	490	495	
Ile	Glu	Glu	Ser	Asn	His	Ala	Lys	Asp	Thr	Val	Thr	Val	Ile	Glu	Ala	500	505	510	
Pro	Arg	Gln	Ser	Asp	Leu	Leu	Ile	Glu	Leu	Ile	Arg	Lys	Leu	Lys	Pro	515	520	525	
Gln	Val	Val	Val	Thr	Gly	Met	Ala	Gln	Phe	Glu	Ala	Ile	Thr	Ser	Ala	530	535	540	
Ala	Phe	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Lys	Asp	Val	Gly	Ser	Arg	Leu	545	550	555	560
Leu	Leu	Asp	Ile	Ser	Glu	His	Leu	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Pro	Ser	Ser	565	570	575	
Asn	Gly	Val	Leu	Lys	Tyr	Leu	Ala	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Ser	His	Ala	580	585	590	
Ala	Ile	Leu	Cys	Gly	Leu	Val	Lys	Asn	Gln	Val	Tyr	Ser	Asp	Leu	Glu	595	600	605	
Val	Ala	Phe	Ala	Ile	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Tyr	Lys	Ala	Leu	Ser	610	615	620	
Gln	Thr	Ile	Glu	Leu	Leu	Glu	Gly	His	Thr	Ser	Val	Ile	Ser	Gln	His	625	630	635	640

ES 2 600 353 T3

Tyr Tyr Gly Cys Leu Phe His Glu Leu Leu Ala Phe Gln Ile Gly Asp
 645 650 655
 Arg His Pro Gln Gln Glu Arg Glu Pro Ala Glu Val Ile Ser Lys Glu
 660 665 670
 Met Ile Gly Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Thr Leu Glu Gly Ala Glu
 675 680 685
 Phe Phe Val Pro Gly Ser Met Glu Ser Gly Val Ile His Met Asp Leu
 690 695 700
 Asp Arg Ser Phe Leu Pro Val Pro Ser Ala Val Asn Ala Ser Ile Phe
 705 710 715 720
 Glu Ser Phe Val Arg Gln Asn Ile Thr Asp Ser Glu Thr Asp Val Arg
 725 730 735
 Ser Ser Ile Gln Gln Leu Val Lys Asp Ser Tyr Gly Phe Ser Ala Gly
 740 745 750
 Gly Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Gly Asn Thr Cys Leu Ala Leu Phe Asn
 755 760 765
 Lys Leu Val Leu Cys Cys Met Gln Glu Gln Gly Thr Leu Leu Phe Pro
 770 775 780
 Leu Gly Thr Asn Gly His Tyr Val Asn Ala Ala Lys Phe Val Asn Ala
 785 790 795 800
 Thr Thr Leu Thr Ile Pro Thr Lys Ala Asp Ser Gly Phe Lys Ile Glu
 805 810 815
 Pro Ser Ala Leu Ala Asp Thr Leu Glu Lys Val Ser Gln Pro Trp Val
 820 825 830
 Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
 835 840 845
 Asp Asp Ile Ala Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala Thr Tyr Gly Ala Arg
 850 855 860
 Val Val Ile Asp Thr Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe Gln Ala Thr Gly
 865 870 875 880
 Cys Ser Gln Trp Asn Leu Glu Arg Cys Leu Ser Asn Val Lys Ser Ser

ES 2 600 353 T3

[illegible]

<210> 14
<211> 1088
<212> PRT
<213> Barley cv. Sebastian

<400> 14

10 Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln

ES 2 600 353 T3

1	5	10	15
Ala Ser Gly	Asp Ala Ala Tyr Gly	Ala Ala Lys Ala Val	Leu Glu Arg
	20	25	30
Leu Glu Ala	Pro Ala Thr Arg	Ala Glu Ala Arg Arg	Leu Leu Gly Ala
	35	40	45
Val Arg Arg	Arg Phe Ala Ala Gly Gly	Pro Ala Ala Gly	Leu Glu Cys
	50	55	60
Phe Arg Thr	Phe His Phe Arg Ile His	Asp Val Val Leu Asp	Pro His
65	70	75	80
Leu Gln Gly	Phe Gln Gln Arg Lys Lys	Leu Thr Met Met	Glu Ile Pro
	85	90	95
Ser Ile Phe	Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr	Glu Gly Leu	
	100	105	110
Asn Arg His	Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr	Val Ala Glu Leu	
	115	120	125
Gly Cys Gly	Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala	Glu Lys Trp Cys	
	130	135	140
Pro Ser Lys	Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Pro	Ile Lys Ile	
145	150	155	160
Ala Trp Ile	Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp	Gly Leu Pro	
	165	170	175
Ile Tyr Asp	Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val	Glu Phe Tyr	
	180	185	190
Glu Ser Asp	Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile	Glu Leu Asp	
	195	200	205
Arg Ile Val	Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro	Glu Ala	
	210	215	220
Met Ser Lys	Ile Val Thr Glu Asn Ser Ser Glu Glu Phe Leu Tyr	Ser	
225	230	235	240
Leu Ser Asn	Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly		
	245	250	255

ES 2 600 353 T3

Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
 260 265 270
 Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
 275 280 285
 Val Cys Glu Arg Leu Phe Leu Arg Arg Gly Phe Arg Ile Asn Lys Leu
 290 295 300
 Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ala Ala Asp Thr Asp Ile Ser Ala Leu
 305 310 315 320
 Val Glu Ile Glu Lys Asn Ser Arg His Arg Phe Glu Phe Phe Met Asp
 325 330 335
 Leu Val Gly Asp Gln Pro Val Cys Ala Arg Thr Ala Trp Ala Tyr Met
 340 345 350
 Lys Ser Gly Gly Arg Ile Ser His Ala Leu Ser Val Tyr Ser Cys Gln
 355 360 365
 Leu Arg Gln Pro Asn Gln Val Lys Lys Ile Phe Glu Phe Leu Lys Asp
 370 375 380
 Gly Phe His Glu Val Ser Ser Ser Leu Asp Leu Ser Phe Asp Asp Asp
 385 390 395 400
 Ser Val Ala Asp Glu Lys Ile Pro Phe Leu Ala Tyr Leu Ala Ser Phe
 405 410 415
 Leu Gln Glu Asn Lys Ser Asn Pro Cys Glu Pro Pro Ala Gly Cys Leu
 420 425 430
 Asn Phe Arg Asn Leu Val Ala Gly Phe Met Lys Ser Tyr His His Ile
 435 440 445
 Pro Leu Thr Pro Asp Asn Val Val Val Phe Pro Ser Arg Ala Val Ala
 450 455 460
 Ile Glu Asn Ala Leu Arg Leu Phe Ser Pro Gly Leu Ala Ile Val Asp
 465 470 475 480
 Glu His Leu Thr Arg His Leu Pro Lys Gln Trp Leu Thr Ser Leu Ala
 485 490 495
 Ile Glu Glu Ser Asn His Ala Lys Asp Thr Val Thr Val Ile Glu Ala
 500 505 510

ES 2 600 353 T3

Pro	Arg	Gln	Ser	Asp	Leu	Leu	Ile	Glu	Leu	Ile	Arg	Lys	Leu	Lys	Pro
		515					520					525			
Gln	Val	Val	Val	Thr	Gly	Met	Ala	Gln	Phe	Glu	Ala	Ile	Thr	Ser	Ala
	530					535					540				
Ala	Phe	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Lys	Asp	Val	Gly	Ser	Arg	Leu
545					550					555					560
Leu	Leu	Asp	Ile	Ser	Glu	His	Leu	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Pro	Ser	Ser
				565					570					575	
Asn	Gly	Val	Leu	Lys	Tyr	Leu	Ala	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Ser	His	Ala
			580					585					590		
Ala	Ile	Leu	Cys	Gly	Leu	Val	Lys	Asn	Gln	Val	Tyr	Ser	Asp	Leu	Glu
		595					600					605			
Val	Ala	Phe	Ala	Ile	Ser	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Tyr	Lys	Ala	Leu	Ser
	610					615					620				
Gln	Thr	Ile	Glu	Leu	Leu	Glu	Gly	His	Thr	Ser	Val	Ile	Ser	Gln	His
625					630					635					640
Tyr	Tyr	Gly	Cys	Leu	Phe	His	Glu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gln	Ile	Gly	Asp
				645					650					655	
Arg	His	Pro	Gln	Gln	Glu	Arg	Glu	Pro	Ala	Glu	Val	Ile	Ser	Lys	Glu
			660					665					670		
Met	Ile	Gly	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Met	Ser	Thr	Leu	Glu	Gly	Ala	Glu
		675					680					685			
Phe	Phe	Val	Pro	Gly	Ser	Met	Glu	Ser	Gly	Val	Ile	His	Met	Asp	Leu
	690					695					700				
Asp	Arg	Ser	Phe	Leu	Pro	Val	Pro	Ser	Ala	Val	Asn	Ala	Ser	Ile	Phe
705					710					715					720
Glu	Ser	Phe	Val	Arg	Gln	Asn	Ile	Thr	Asp	Ser	Glu	Thr	Asp	Val	Arg
				725					730					735	
Ser	Ser	Ile	Gln	Gln	Leu	Val	Lys	Asp	Ser	Tyr	Gly	Phe	Ser	Ala	Gly
			740					745					750		
Gly	Ala	Ser	Glu	Ile	Ile	Tyr	Gly	Asn	Thr	Cys	Leu	Ala	Leu	Phe	Asn
		755					760					765			

ES 2 600 353 T3

Lys Leu Val Leu Cys Cys Met Gln Glu Gln Gly Thr Leu Leu Phe Pro
 770 775 780
 Leu Gly Thr Asn Gly His Tyr Val Asn Ala Ala Lys Phe Val Asn Ala
 785 790 795 800
 Thr Thr Leu Thr Ile Pro Thr Lys Ala Asp Ser Gly Phe Lys Ile Glu
 805 810 815
 Pro Ser Ala Leu Ala Asp Thr Leu Glu Lys Val Ser Gln Pro Trp Val
 820 825 830
 Tyr Ile Ser Gly Pro Thr Ile Asn Pro Thr Gly Phe Leu Tyr Ser Asp
 835 840 845
 Asp Asp Ile Ala Glu Leu Leu Ser Val Cys Ala Thr Tyr Gly Ala Arg
 850 855 860
 Val Val Ile Asp Thr Ser Ser Ser Gly Leu Glu Phe Gln Ala Thr Gly
 865 870 875 880
 Cys Ser Gln Trp Asn Leu Glu Arg Cys Leu Ser Asn Val Lys Ser Ser
 885 890 895
 Lys Pro Ser Phe Ser Val Val Leu Leu Gly Glu Leu Ser Phe Glu Leu
 900 905 910
 Thr Thr Ala Gly Leu Asp Phe Gly Phe Leu Ile Met Ser Asp Ser Ser
 915 920 925
 Leu Val Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Pro Ser Leu Ser Arg Pro His Ser
 930 935 940
 Thr Leu Lys Tyr Thr Phe Arg Lys Leu Leu Gly Leu Lys Asn Gln Lys
 945 950 955 960
 Asp Gln His Phe Ser Asp Leu Ile Leu Glu Gln Lys Glu Thr Leu Lys
 965 970 975
 Asn Arg Ala Asp Gln Leu Ile Lys Met Leu Glu Ser Cys Gly Trp Asp
 980 985 990
 Ala Val Gly Cys His Gly Gly Ile Ser Met Leu Ala Lys Pro Thr Ala
 995 1000 1005
 Tyr Ile Gly Lys Ser Leu Lys Val Asp Gly Phe Glu Gly Lys Leu

ES 2 600 353 T3

1010	1015	1020
Asp Ser His Asn Met Arg Glu Ala Leu Leu Arg Ser Thr Gly Leu		
1025	1030	1035
Cys Ile Ser Ser Ser Gly Trp Thr Gly Val Pro Asp Tyr Cys Arg		
1040	1045	1050
Phe Ser Phe Ala Leu Glu Ser Gly Asp Phe Asp Arg Ala Met Glu		
1055	1060	1065
Cys Ile Ala Arg Phe Arg Glu Leu Val Leu Gly Gly Gly Ala Lys		
1070	1075	1080
Val Asn Gly Ser Asn		
1085		

<210> 15

<211> 186

<212> PRT

<213> Barley, Mutante 14018

<400> 15

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln		
1	5	10
Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg		
20	25	30
Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala		
35	40	45
Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys		
50	55	60
Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His		
65	70	75
Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro		
85	90	95
Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu		
100	105	110
Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu		
115	120	125
Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys		

ES 2 600 353 T3

130

135

140

Pro Ser Lys Ile Gly Thr Ser Cys Ser Val Asp Ile Tyr Leu Ile Ser
145 150 155 160

Phe Val Ala Asn Met Gly Pro Ala Glu Val Arg His Leu Leu Arg Leu
165 170 175

Leu Tyr Met Lys Leu Leu Gly Val Cys Gln
180 185

<210> 16

<211> 180

<212> PRT

<213> Barley, Mutante 14018

<400> 16

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
130 135 140

Pro Ser Lys Ile Gly Thr Ser Cys Ser Val Asp Ile Tyr Leu Ile Ser
145 150 155 160

Phe Val Ala Asn Met Gly Pro Ala Glu Val Arg His Leu Leu Arg Phe

ES 2 600 353 T3

165

170

175

Met Val Trp Ile
180

<210> 17

<211> 163

5 <212> PRT

<213> Barley, Mutante 14018

<400> 17

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Leu Trp Ser Gly Tyr Lys Pro Lys Ser Tyr Gln
130 135 140

Asp Cys Met Asp Lys Pro Leu Leu Glu Cys Thr Arg Arg Arg Trp Ser
145 150 155 160

10

Pro Asn Leu

<210> 18

<211> 315

<212> PRT

15 <213> Barley, Mutante 8063

<400> 18

ES 2 600 353 T3

Met 1	Ala	Ala	Ala	Ala 5	Gly	Asp	Val	Glu	Ala 10	Phe	Leu	Ala	Ala	Cys 15	Gln
Ala	Ser	Gly	Asp 20	Ala	Ala	Tyr	Gly	Ala 25	Ala	Lys	Ala	Val	Leu 30	Glu	Arg
Leu	Glu	Ala 35	Pro	Ala	Thr	Arg	Ala 40	Glu	Ala	Arg	Arg	Leu 45	Leu	Gly	Ala
Val	Arg 50	Arg	Arg	Phe	Ala	Ala 55	Gly	Gly	Pro	Ala	Ala 60	Gly	Leu	Glu	Cys
Phe 65	Arg	Thr	Phe	His	Phe 70	Arg	Ile	His	Asp	Val 75	Val	Leu	Asp	Pro	His 80
Leu	Gln	Gly	Phe	Gln 85	Gln	Arg	Lys	Lys	Leu 90	Thr	Met	Met	Glu	Ile 95	Pro
Ser	Ile	Phe	Ile 100	Pro	Glu	Asp	Trp	Ser	Phe	Thr	Phe	Tyr	Glu 110	Gly	Leu
Asn	Arg	His 115	Pro	Asp	Ser	Ile	Phe	Arg	Asp	Lys	Thr	Val 125	Ala	Glu	Leu
Gly	Cys 130	Gly	Asn	Gly	Trp	Ile 135	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala 140	Glu	Lys	Trp	Cys
Pro 145	Ser	Lys	Val	Tyr	Gly 150	Leu	Asp	Ile	Asn	Pro 155	Arg	Ala	Ile	Lys	Ile 160
Ala	Trp	Ile	Asn 165	Leu	Tyr	Leu	Asn	Ala	Leu 170	Asp	Asp	Asp	Gly	Leu 175	Pro
Ile	Tyr	Asp	Ala 180	Glu	Gly	Lys	Thr	Leu 185	Leu	Asp	Arg	Val	Glu 190	Phe	Tyr
Glu	Ser	Asp 195	Leu	Leu	Ser	Tyr	Cys 200	Arg	Asp	Asn	Lys	Ile 205	Glu	Leu	Asp
Arg	Ile 210	Val	Gly	Cys	Ile	Pro 215	Gln	Ile	Leu	Asn	Pro 220	Asn	Pro	Glu	Ala
Met 225	Ser	Lys	Ile	Val	Thr 230	Glu	Asn	Ser	Ser	Glu 235	Glu	Phe	Leu	Tyr	Ser 240
Leu	Ser	Asn	Tyr	Cys	Ala	Leu	Gln	Gly	Phe	Val	Glu	Asp	Gln	Phe	Glu

ES 2 600 353 T3

245

250

255

Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
260 265 270

Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
275 280 285

Val Cys Glu Arg Leu Phe Leu Arg Arg Gly Phe Arg Ile Asn Lys Leu
290 295 300

Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ile Ala Ile Leu
305 310 315

<210> 19

<211> 315

5 <212> PRT

<213> Barley, Mutante 8063

<400> 19

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
1 5 10 15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
20 25 30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
35 40 45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys
50 55 60

Phe Arg Thr Phe His Phe Arg Ile His Asp Val Val Leu Asp Pro His
65 70 75 80

Leu Gln Gly Phe Gln Gln Arg Lys Lys Leu Thr Met Met Glu Ile Pro
85 90 95

Ser Ile Phe Ile Pro Glu Asp Trp Ser Phe Thr Phe Tyr Glu Gly Leu
100 105 110

Asn Arg His Pro Asp Ser Ile Phe Arg Asp Lys Thr Val Ala Glu Leu
115 120 125

Gly Cys Gly Asn Gly Trp Ile Ser Ile Ala Leu Ala Glu Lys Trp Cys
130 135 140

Pro Ser Lys Val Tyr Gly Leu Asp Ile Asn Pro Arg Ala Ile Lys Ile

10

ES 2 600 353 T3

```

145                      150                      155                      160

Ala Trp Ile Asn Leu Tyr Leu Asn Ala Leu Asp Asp Asp Gly Leu Pro
                      165                      170                      175

Ile Tyr Asp Ala Glu Gly Lys Thr Leu Leu Asp Arg Val Glu Phe Tyr
                      180                      185                      190

Glu Ser Asp Leu Leu Ser Tyr Cys Arg Asp Asn Lys Ile Glu Leu Asp
                      195                      200                      205

Arg Ile Val Gly Cys Ile Pro Gln Ile Leu Asn Pro Asn Pro Glu Ala
                      210                      215                      220

Met Ser Lys Ile Val Thr Glu Asn Ser Ser Glu Glu Phe Leu Tyr Ser
225                      230                      235

Leu Ser Asn Tyr Cys Ala Leu Gln Gly Phe Val Glu Asp Gln Phe Gly
                      245                      250                      255

Leu Gly Leu Ile Ala Arg Ala Val Glu Glu Gly Ile Ser Val Ile Lys
                      260                      265                      270

Pro Ser Gly Leu Met Val Phe Asn Met Gly Gly Arg Pro Gly Gln Gly
                      275                      280                      285

Val Cys Glu Arg Leu Phe Leu Arg Arg Gly Phe Arg Ile Asn Lys Leu
                      290                      295                      300

Trp Gln Thr Lys Ile Met Gln Ile Ala Ile Leu
305                      310                      315

```

<210> 20

<211> 289

5 <212> PRT

<213> Barley, Mutante 8063

<400> 20

```

Met Ala Ala Ala Ala Gly Asp Val Glu Ala Phe Leu Ala Ala Cys Gln
1                      5                      10                      15

Ala Ser Gly Asp Ala Ala Tyr Gly Ala Ala Lys Ala Val Leu Glu Arg
                      20                      25                      30

Leu Glu Ala Pro Ala Thr Arg Ala Glu Ala Arg Arg Leu Leu Gly Ala
                      35                      40                      45

Val Arg Arg Arg Phe Ala Ala Gly Gly Pro Ala Ala Gly Leu Glu Cys

```

10

ES 2 600 353 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una bebida a base de cebada con bajos niveles de uno o más sabores indeseables y/o precursores de los mismos, donde el procedimiento implica un ingreso reducido de energía, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - (i) suministro de una planta de cebada o una parte de la misma, donde dicha planta de cebada comprende:
 - (a) una primera mutación que produce una pérdida total de lipoxigenasa (LOX)-1 funcional; y
 - (b) una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional; y
 - (c) una tercera mutación que produce una pérdida total de S-adenosilmetionina:metionina S-metiltransferasa funcional (MMT);
 - (ii) opcionalmente malteado de al menos parte de dicha cebada, obteniendo así cebada malteada;
 - (iii) maceración de dicha cebada y/o cebada malteada y opcionalmente adjuntos adicionales, obteniendo así un mosto;
 - (iv) calentamiento de dicho mosto opcionalmente en presencia de ingrediente(s) adicional(es), donde como máximo el 4% del volumen de mosto se evapora, obteniendo así mosto calentado;
 - (v) procesamiento de dicho mosto calentado en una bebida;
 preparando así la bebida a base de cebada con bajos niveles de uno o más sabores indeseables y/o precursores de los mismos.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa (i) comprende el suministro de granos de cebada.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha cebada es malteada usando un procedimiento que comprende las etapas de
 - a) remojo de dicha cebada;
 - b) germinación de dicha cebada;
 - c) secado en horno de dicha cebada
 y donde el secado en horno de dicha cebada se realiza a una temperatura como máximo de 80°C, más preferentemente todavía a una temperatura como máximo de 75°C, tal como a una temperatura como máximo de 70°C, por ejemplo a una temperatura como máximo de 65°C, tal como a una temperatura como máximo de 60°C, por ejemplo a una temperatura como máximo de 55°C, tal como a una temperatura como máximo de 50°C, por ejemplo a una temperatura como máximo de 45°C, tal como a una temperatura como máximo de 40°C.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho mosto se calienta a una temperatura como máximo de 99,8°C, tal como como máximo 99,5°C, por ejemplo como máximo 99°C.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la etapa v) comprende fermentación del mosto.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el procedimiento no implica el calentamiento a una temperatura superior a 80°C durante más de 30 min, preferentemente durante más de 20 min.
7. Una planta de cebada, o una parte de la misma, donde dicha planta de cebada comprende:
 - a) una primera mutación que produce una pérdida total de LOX-1 funcional, y
 - b) una segunda mutación que produce una pérdida total de LOX-2 funcional y
 - c) una tercera mutación que produce una pérdida total de MMT funcional.
8. La planta de cebada, o una parte de la misma, de acuerdo con la reivindicación 7, donde el gen que codifica LOX-1 de dicha planta comprende un codón de terminación prematuro situado como máximo 705, preferentemente como máximo 665 codones corriente abajo del codón de inicio.
9. La planta de cebada, o una parte de la misma, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, donde el gen que codifica LOX-2 de dicha planta comprende un codón de terminación prematuro situado

como máximo 707, preferentemente como máximo 684 codones corriente abajo del codón de inicio.

- 5 10. La planta de cebada, o una parte de la misma, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, donde la mutación en el gen que codifica MMT es una mutación dentro del sitio de splicing 5' de un intrón, tal como una mutación G→A de base del terminal 5' de un intrón.
- 10 11. La planta de cebada, o una parte de la misma, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde la mutación produce un gen que codifica una forma truncada de MMT que comprende un fragmento N-terminal de MMT de tipo salvaje y opcionalmente secuencias C-terminales no encontradas en MMT de tipo salvaje, donde dicho fragmento N-terminal comprende como máximo 500, más preferentemente como máximo 450, más preferentemente todavía como máximo 400, más preferentemente todavía como máximo 350, más preferentemente todavía como máximo 320, más preferentemente todavía como máximo 311, o como máximo 288 residuos de aminoácidos N-terminales de SEQ ID NO: 13.
- 15 12. Una composición de malta que comprende una planta de cebada procesada, o una parte de la misma, donde dicha planta de cebada es la planta de cebada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.
- 20 13. Una bebida a base de cebada que puede prepararse a partir de una planta de cebada, o una parte de la misma, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde dicha bebida contiene un nivel de sulfuro de dimetilo (DMS) inferior a 10 ppb.
- 25 14. La bebida de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicha bebida se prepara mediante el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
15. La bebida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, donde la bebida es cerveza.
16. La bebida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, donde la bebida es una bebida de malta no alcohólica.

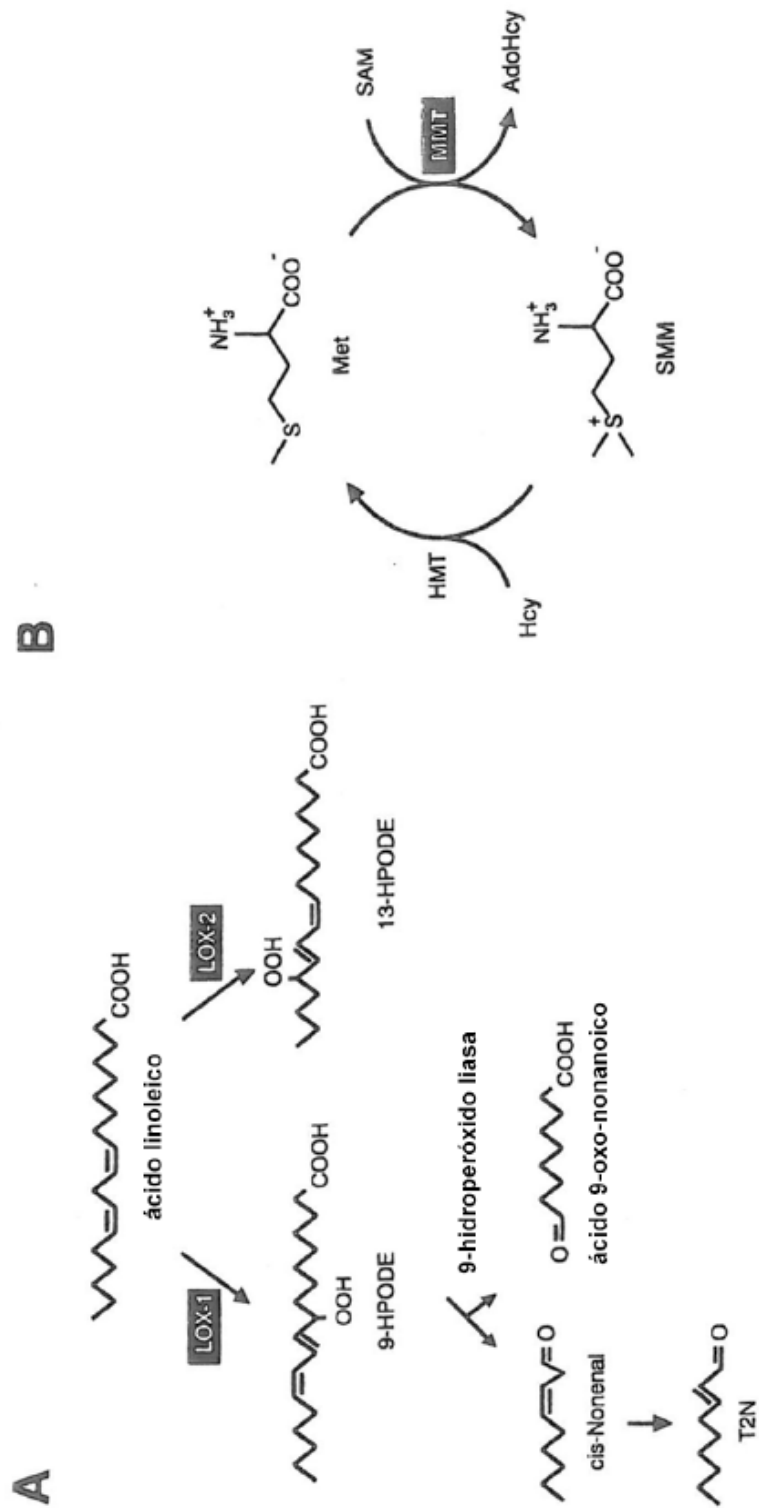


FIG. 1

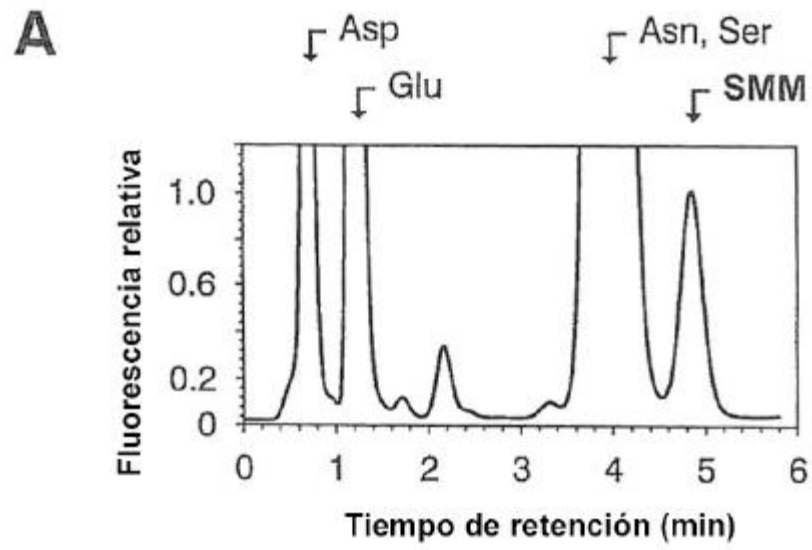


FIG. 2

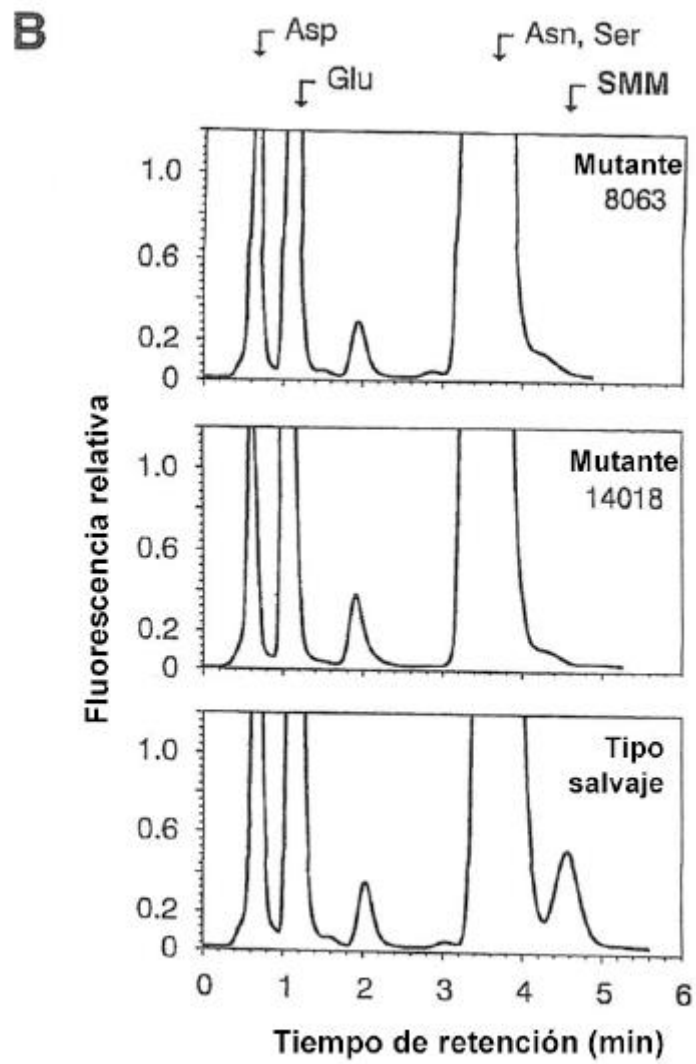


FIG. 2

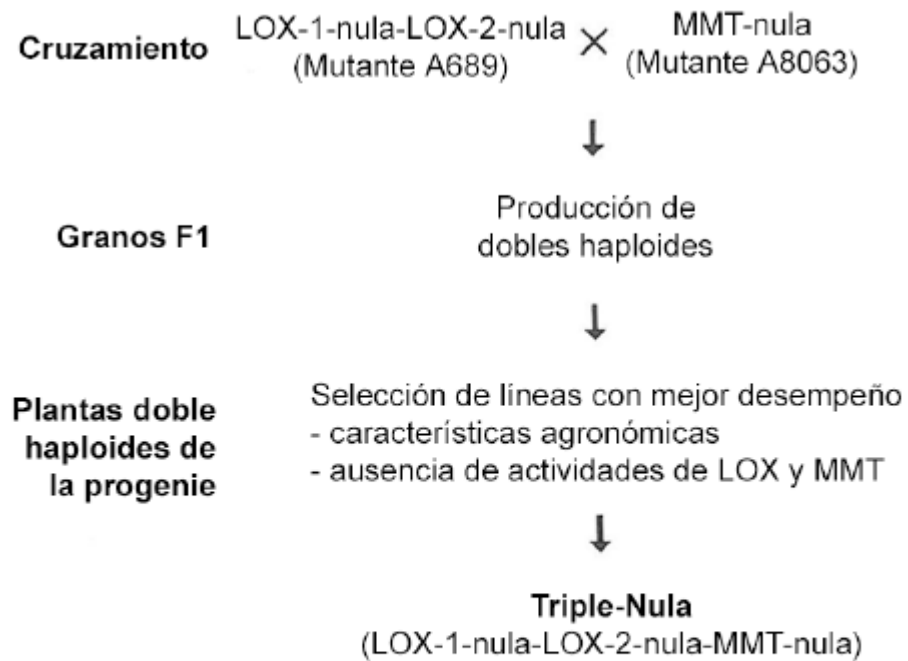


FIG. 3

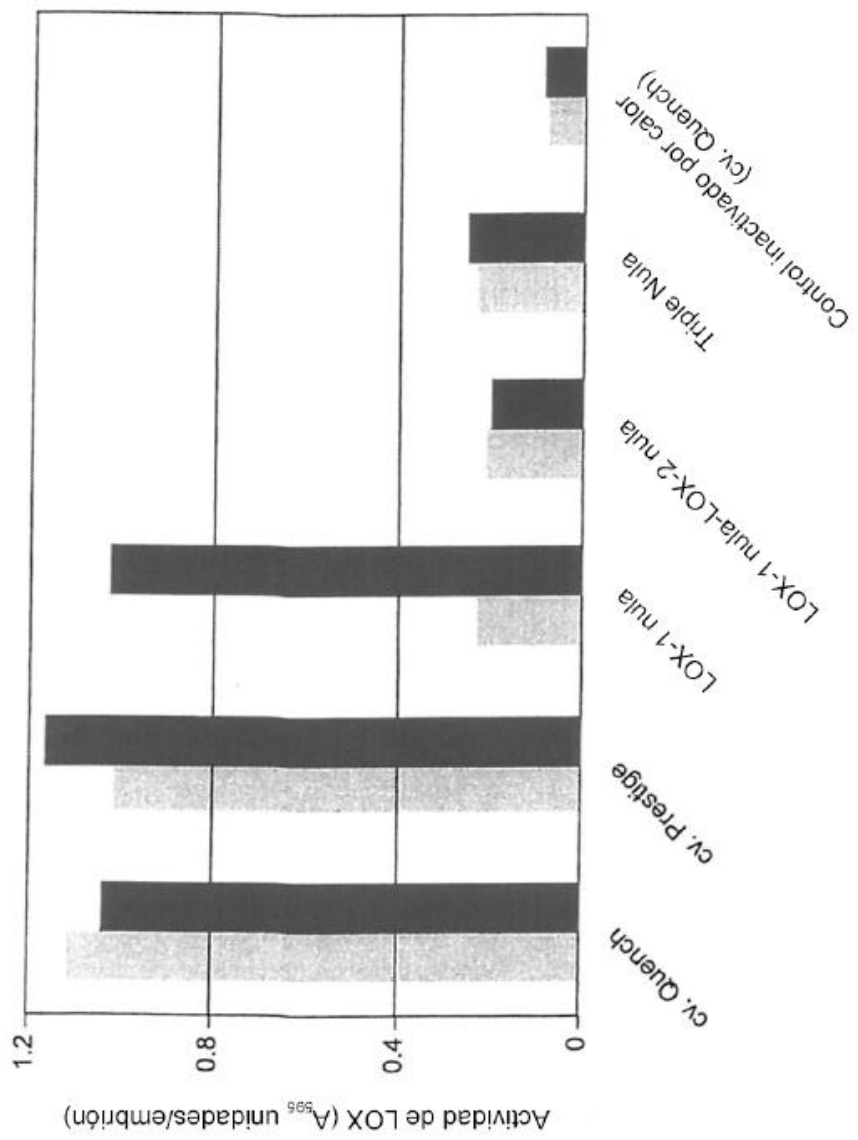


FIG. 4

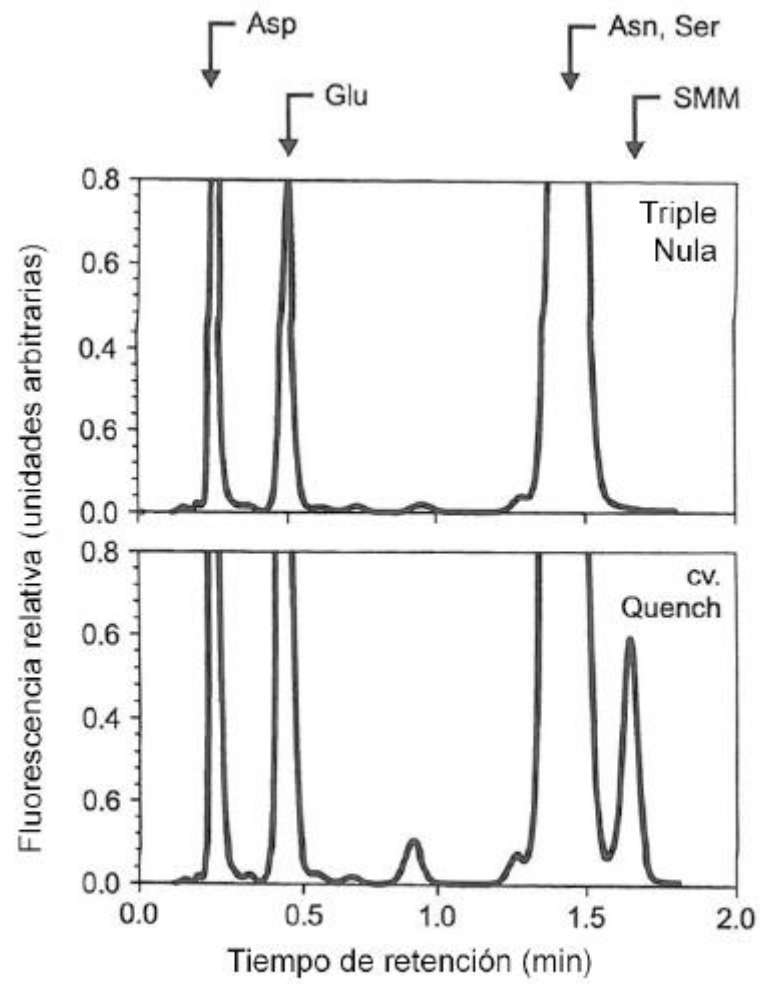


FIG. 5

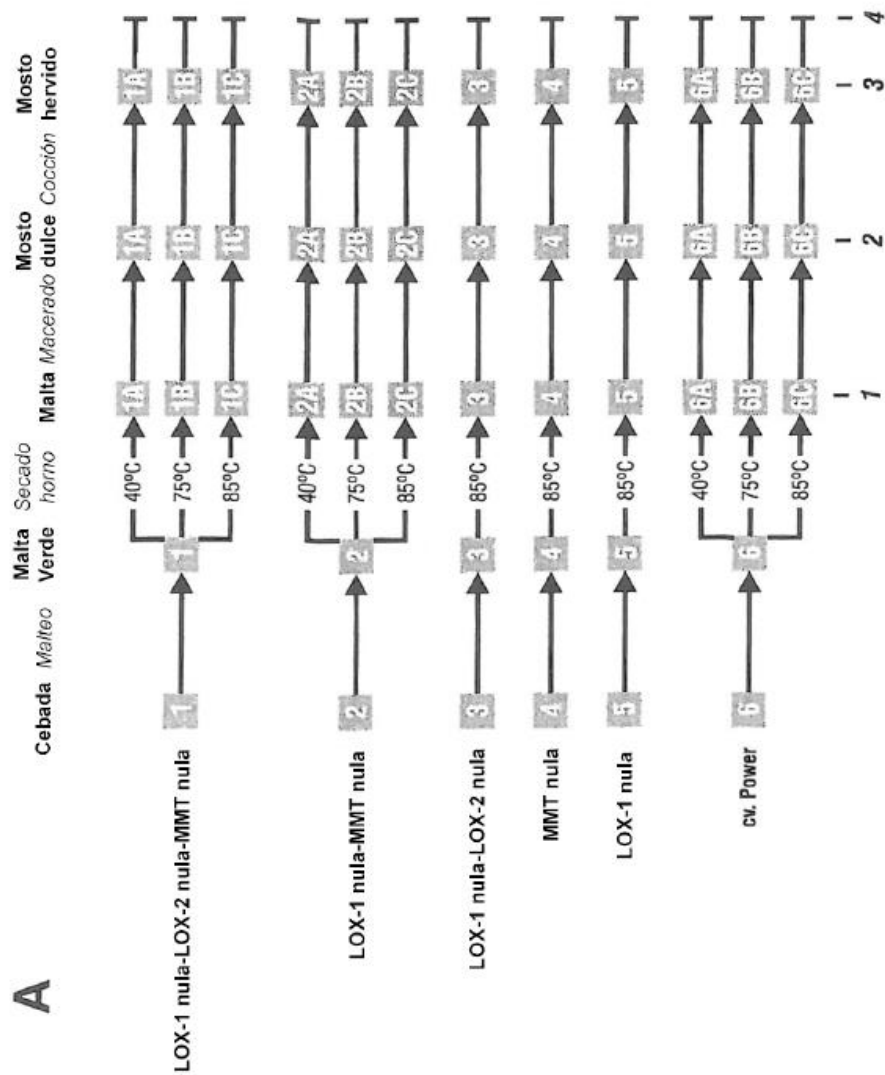


FIG. 6

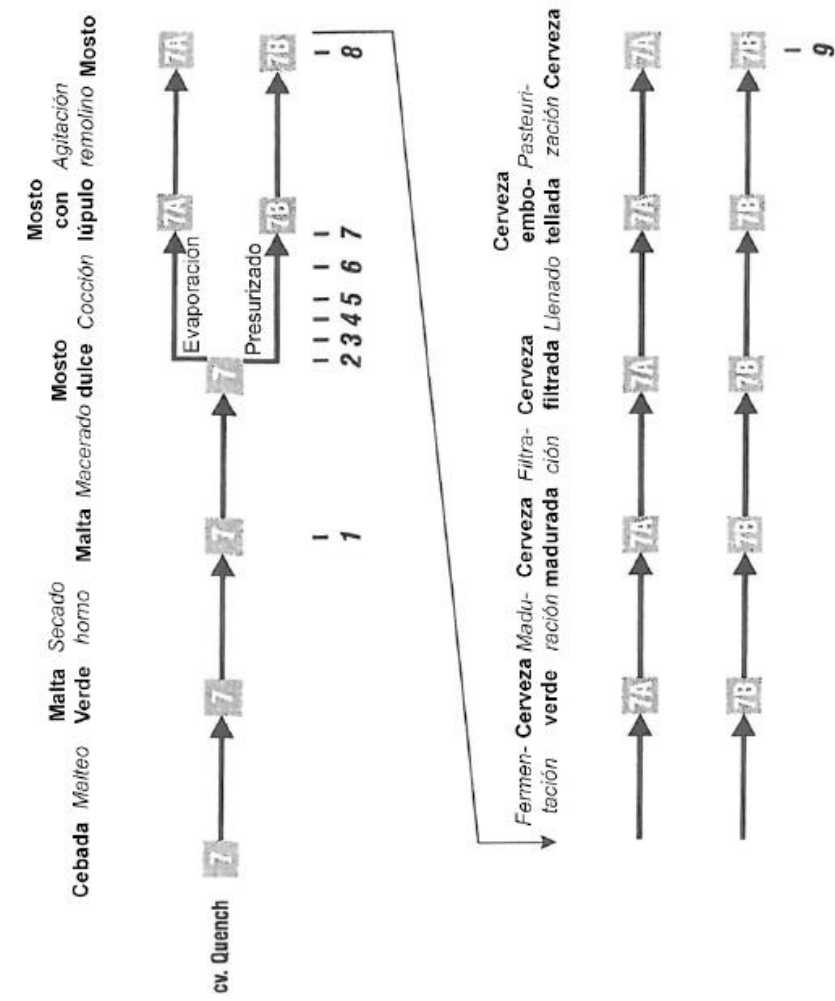


FIG. 6

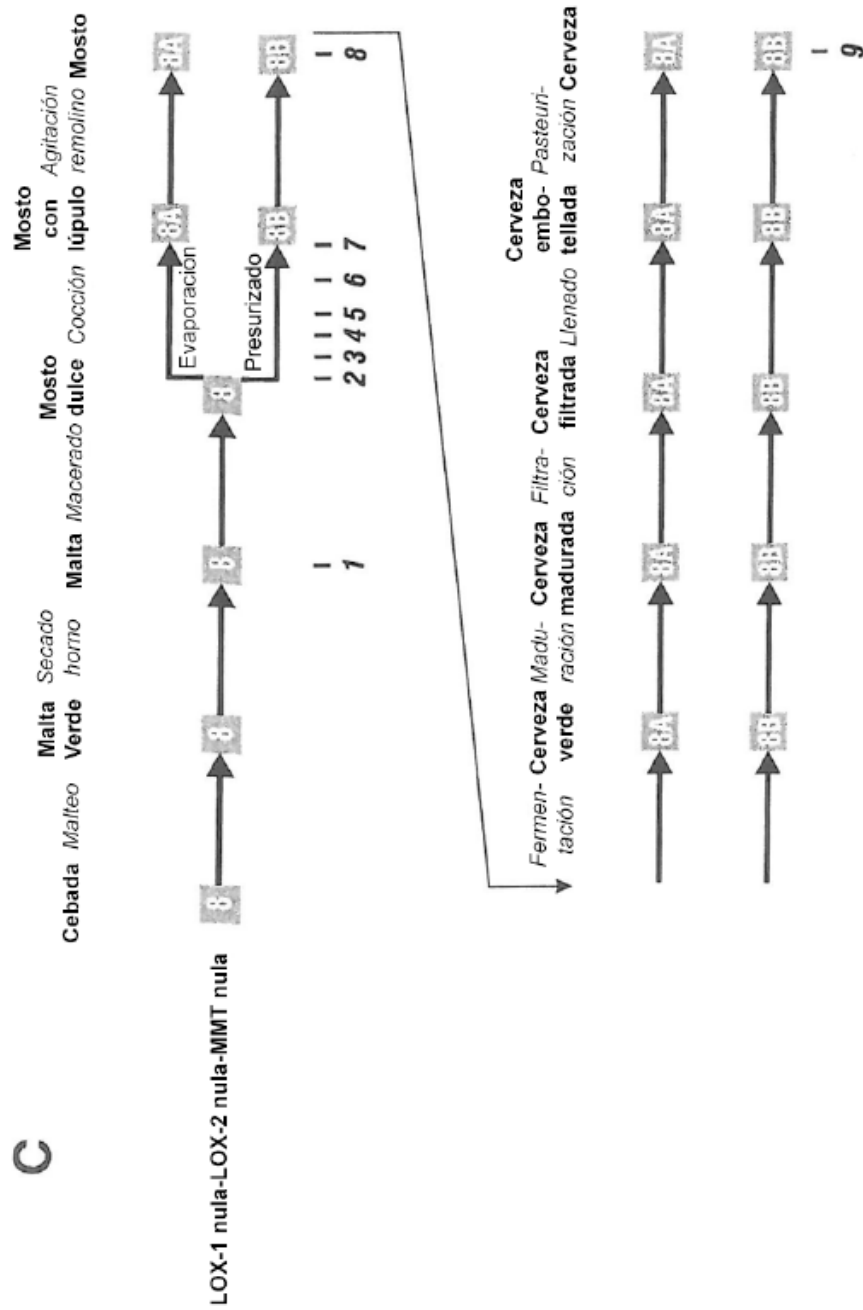


FIG. 6

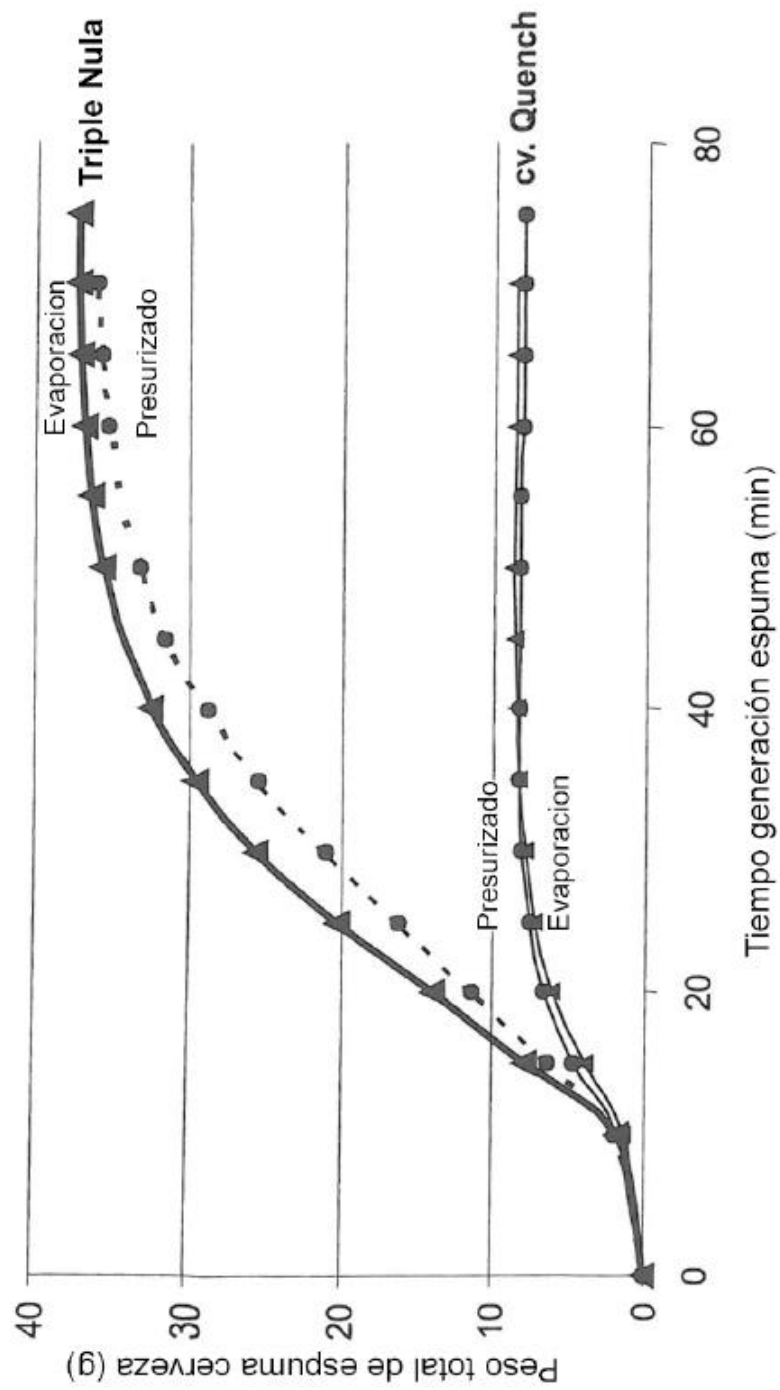


FIG. 7

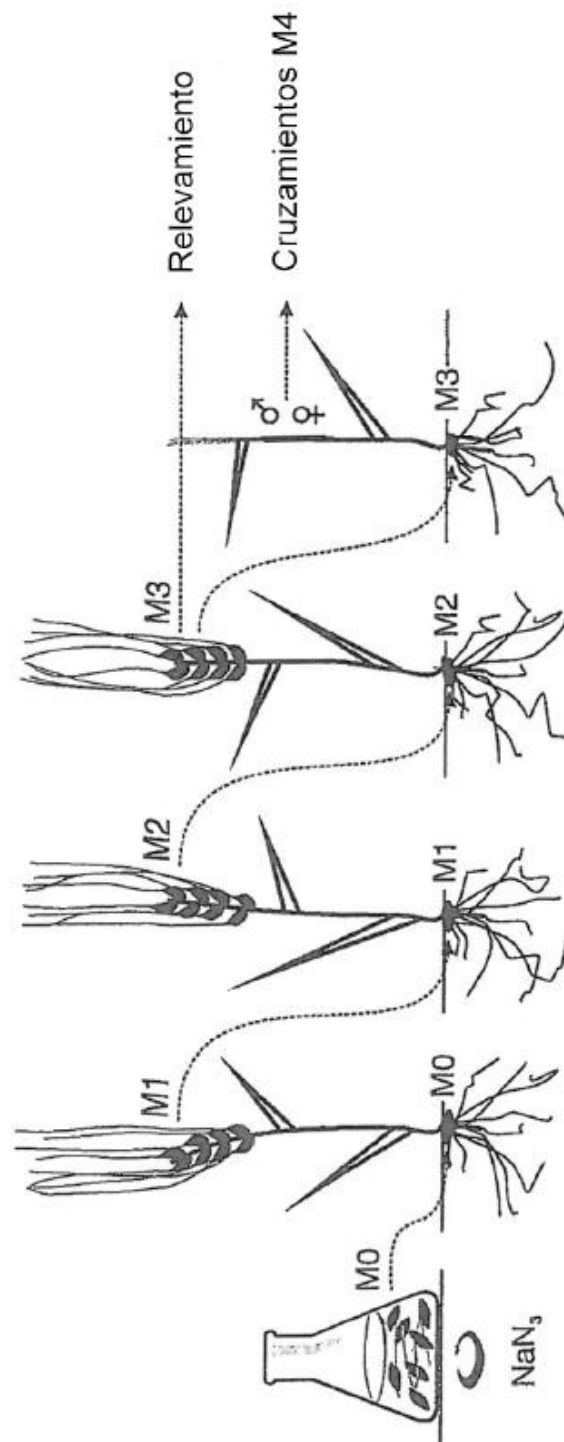


FIG. 8

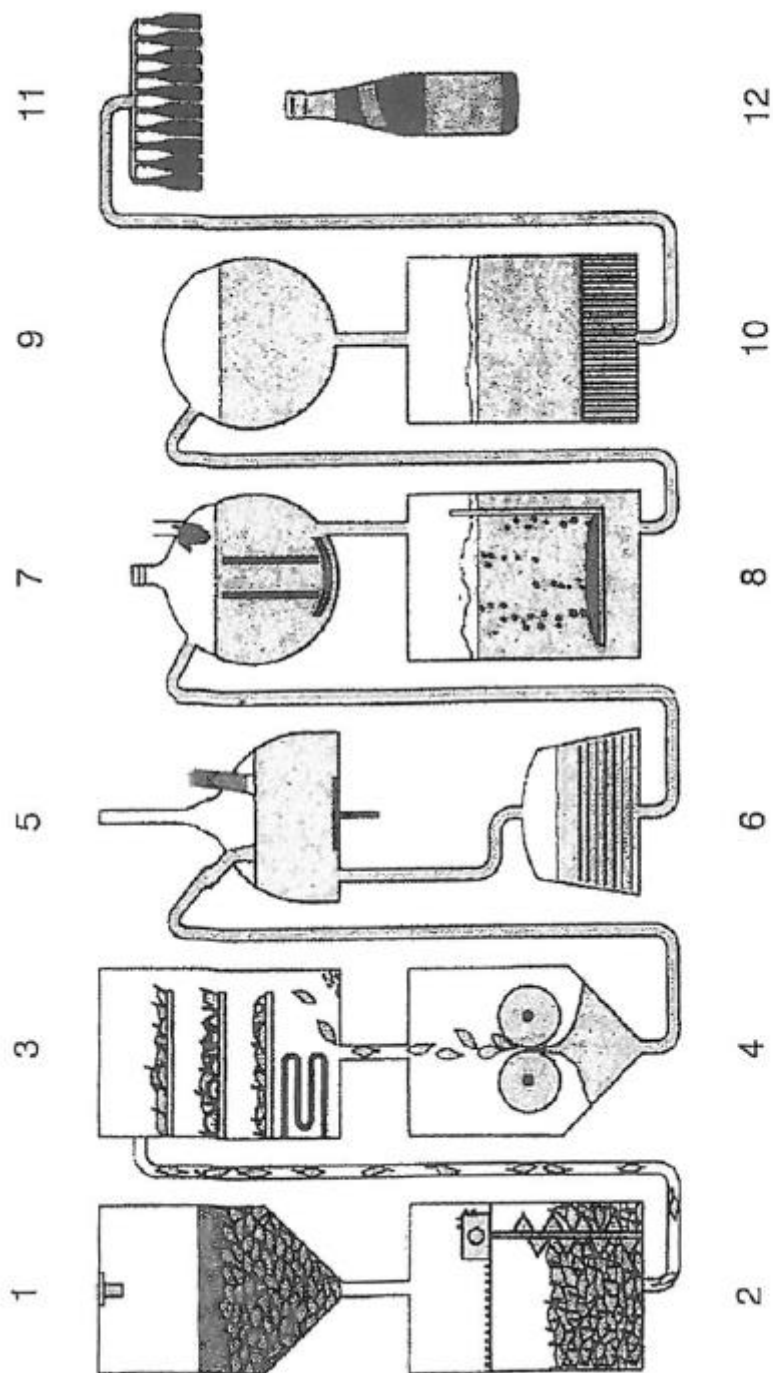


FIG. 9

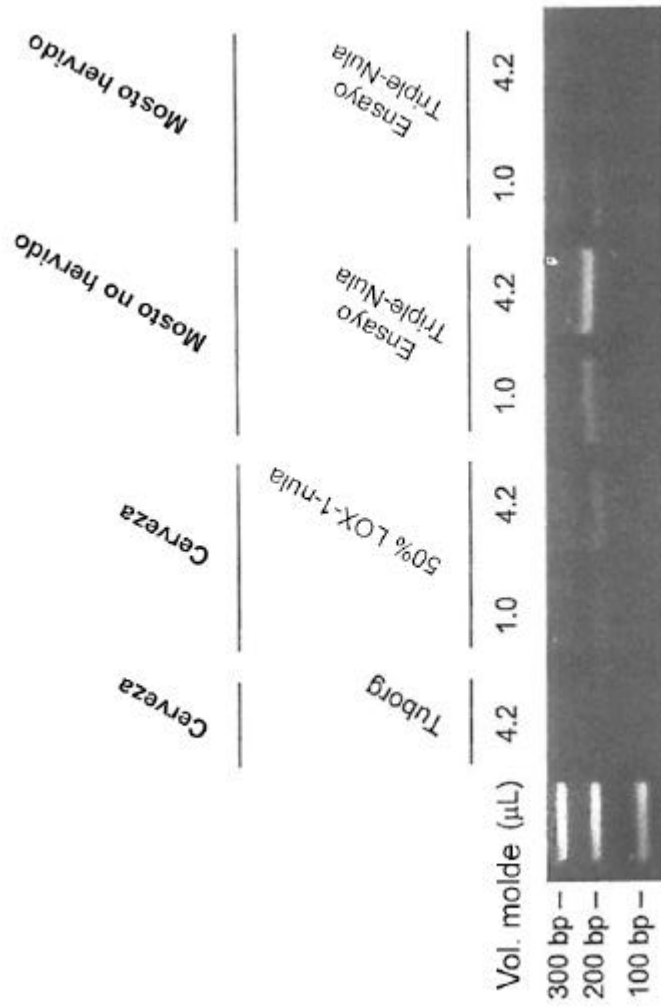


FIG. 10