

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-1-19-25><https://www.fsjour.com/jour>

Обзорная статья

ПОТЕНЦИАЛ ПРИМЕНЕНИЯ ДНК-ТЕХНОЛОГИЙ В ПИВОВАРЕННОЙ ОТРАСЛИ

Лазарева Е. Г.^{1*}, Гильманов Х. Х.¹, Бигаева А. И.¹, Тюлькин С. В.¹, Вафин Р. Р.²¹ Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук, Москва, Россия² Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, Москва, Россия**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:***пиво, ячмень, маркер, ДНК, идентификация, ПЦР, контроль производства***АННОТАЦИЯ**

Представлен анализ литературных данных по проведению исследований, касающихся применения ДНК-технологий в рамках пивоваренной отрасли. Значительную актуальность среди них имеют работы по борьбе с широко распространенной фальсификацией пищевой продукции, в том числе алкогольной. Классические методы оценки качества и безопасности пива не позволяют выявить подмену заявленного производителем сырья — одного из широкомасштабных направлений фальсификации. Следовательно, актуальным является вопрос о применении новых подходов к оценке подлинности пивоваренной продукции. В частности, наиболее полно позволяют идентифицировать фальсификации в алкогольной промышленности молекулярно-генетические методы анализа. В данной статье рассмотрены методы экстракции нуклеиновых кислот, а также маркеры, используемые в качестве генетических мишеней в рамках ДНК-аутентификации алкогольной продукции. Проанализированный материал указывает на возможность применения молекулярно-генетических методов, основанных на полимеразной цепной реакции, в качестве современных лабораторных инструментов определения подлинности выпускаемых товаров. Кроме того, выявлен потенциал применения ДНК-технологий в борьбе с контаминацией отраслевых предприятий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по Государственному заданию № 0437–2019–0001 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Review article

POTENTIAL FOR THE APPLICATION OF DNA TECHNOLOGIES IN THE BREWING INDUSTRY

Ekaterina G. Lazareva^{1*}, Khamid Kh. Gilmanov¹, Alana V. Bigaeva¹, Sergey V. Tulykin¹, Ramil R. Vafin²¹ V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia² All-Russian Scientific Research Institute of the Brewing, Non-Alcoholic and Wine Industry — Branch of the V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of RAS, Moscow, Russia**KEY WORDS:***beer, barley, marker, DNA, identification, PCR, control of production***ABSTRACT**

The article presents an analysis of the literature data on research related to the use of DNA technologies in the brewing industry. Significant relevance among them is the work on combating widespread falsification of food products, including alcohol. Classical methods of assessing the quality and safety of beer do not allow us to identify the substitution of raw materials declared by the manufacturer — one of the large-scale areas of falsification. Therefore, the question of applying new approaches to the assessment of the authenticity of brewing products is relevant. In particular, the most complete identification of falsifications in the alcohol industry is made by molecular genetic analysis methods. This article discusses the methods of extraction of nucleic acids, as well as markers used as genetic targets in the DNA authentication of alcoholic beverages. The analyzed material indicates the possibility of using molecular genetic methods based on the polymerase chain reaction as modern laboratory tools for determining the authenticity of manufactured goods. In addition, the potential of using DNA technologies in the fight against contamination of industrial enterprises has been identified.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No.0437–2019–0001 of the state assignment of the V. M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems of RAS.

1. Introduction

Алкогольная промышленность имеет большое значение для экономики большинства государств мира. Значительный объем выпускаемой продукции приходится на пивоваренную отрасль [1,2,3].

Пивоварение является сложным биохимическим процессом [4]. В результате ферментативных и физико-химических реакций получается продукт, который должен обладать

определенными показателями качества и безопасности [5,6].

Производство пива от ячменя до готового напитка интенсивно развивается, внедряются новые техники и технологии, а также появляются новые способы фальсификации пенных напитков. Следовательно, сохраняется потребность в новых методах определения подлинности продуктов данной категории.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Лазарева, Е.Г., Гильманов, Х.Х., Бигаева, А.И., Тюлькин, С.В., Вафин, Р.Р. (2021). Потенциал применения ДНК-технологий в пивоваренной отрасли. *Пищевые системы*, 4(1), 19–25. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-1-19-25>

FOR CITATION: Lazareva, E.G., Gilmanov, Kh. Kh., Bigaeva, A.V., Tulykin, S.V., Vafin, R.R. (2021). Potential for the application of DNA technologies in the brewing industry. *Food systems*, 4(1), 19–25. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-1-19-25>

Фальсификация пивоваренной продукции возможна практически на любом этапе производства: от приготовления затора до хранения и транспортировки готового пива. Выделяют следующие способы фальсификации:

- ❑ разбавление водой;
- ❑ полная замена пива подкрашенными растворами;
- ❑ применение в процессе производства значительных объемов несоложенных материалов;
- ❑ использование некачественного соложенного сырья;
- ❑ нарушение технологических режимов;
- ❑ внесение специальных пенообразователей, не допустимых в производстве пива и т. д.

Распознать фальсификаты можно при помощи органолептического и физико-химического анализов (сенсорный анализ, определение кислотности продукта, углеводного и аминокислотного состава и пр.) [6,7,8,9].

Однако широко распространенные методы оценки качества и безопасности пива не располагают потенциалом распознавания некоторых методов фальсификации [10]. Так жидкостная и газовая хроматография, спектрофотометрия позволяют эффективно и быстро оценить показатели безопасности пива, но не используются широко для определения подлинности заявленного сырья. Соответственно, актуальным является расширение области оценочных критериев современными методами определения подлинности пивоваренной продукции, в частности, технологиями ДНК-аутентификации [11,12].

ДНК-аутентификация алкогольной продукции — процесс проверки подлинности готового напитка посредством идентификации основного растительного ингредиента при помощи молекулярно-генетического анализа остаточных нуклеиновых кислот, экстрагируемых из клеточного дебриса продукта [13].

Данная статья посвящена анализу работ по таким направлениям, как экстракция нуклеиновых кислот из растительных компонентов пива, поиск и подбор мишеней для ДНК-аутентификации продукта, оценка потенциала применимости молекулярно-генетических технологий для выявления фальсификатов пивоваренной продукции и для повышения стабильности и чистоты производства.

2. Main part

Последовательность выделения нуклеиновых кислот из пива представлена на Рисунке 1 и является модификацией

метода экстракции ДНК из вина [14,15], включающей следующие основные этапы:

- ❑ ступенчатый ферментативный гидролиз лиофилизата;
- ❑ многократный процесс седиментации и ресуспендирования нуклеопротеидного комплекса;
- ❑ этап удаления рибонуклеиновых кислот с последующей экстракцией ДНК с применением органических растворителей;
- ❑ дополнительный этап удаления посторонних примесей из ДНК при помощи магнитных частиц.

Маркеры для геноидентификации компонентов пива

Основными ингредиентами пива являются ячмень или произведенные из него солод, хмель и дрожжи [16], фрагментарный анализ амплифицированных ПЦР-продуктов которых лежит в основе апробируемых методов ДНК-анализа [17].

При этом молекулярные маркеры, используемые при генотипировании и паспортизации сельскохозяйственных растений [18,19], могут быть применены как при оценке подлинности, так и места происхождения пищевых систем. Ряд генетических мишеней, используемых в качестве молекулярных маркеров для геноидентификации сортов пивоваренного ячменя, может быть использован и в целях ДНК-аутентификации коммерческого пива [20]. В частности, различают следующие мишени растительных компонентов, у которых по результатам проведенных анализов не выявлено корреляционной связи с показателями качества пива:

- ❑ полигалактуроназа — фермент, осуществляющий гидролитическое расщепление α -1,4-гликозидных связей в пектинах [21]; в качестве ДНК-мишеней для идентификации и дифференциации образцов пива применим локус гена *HvPG1*;
- ❑ гордеины — полиморфные белки зерна ячменя, кодируемые 7 локусами *HrdA-G*, локализованными в коротком плече 5-й хромосомы *Hordeum vulgare*; являются приоритетными мишенями для молекулярно-генетического анализа качества ячменя [22, 23];
- ❑ амилоза в сорте *ваху*-ячменя — один из основных полисахаридов, составляющий крахмал. Праймеры, подобранные для амплификации *Ваху*-локуса обладают статусом положительного контроля ввиду генерации специфичного ПЦР-продукта во всех тестируемых образцах ячменя и пива [24];



- α -амилаза — фермент, активирующийся в процессе соложения [25]. Праймеры, разработанные на основании нуклеотидной последовательности локуса гена, кодирующего α -амилазу, инициируют амплификацию ПЦР-продукта у большинства исследованных сортов ячменя и образцов пива;
- (1–3, 1–4) β -D-глюкан — полисахарид, определяющий твердость зерна ячменя [26]. Процедура амплификации локуса гена *HvCslF6* с определенной парой праймеров приводит к наработке специфического ПЦР-продукта у ряда американских, австралийских и японских сортов пивоваренного ячменя.
Генетическими мишенями, имеющими корреляционную связь с показателями качества пива, являются:
- протеины Z ячменя (Z4 и Z7) — основные белки пива, проявляющие корреляционную связь с показателями качества пива, в частности, со стабильностью пены [27];
- липоксигеназа — железосодержащий фермент, катализирующий реакцию диоксигенации к полиненасыщенным жирным кислотам [28]. Сорты ячменя с пониженной или утраченной активностью генов *LOX* оказывают положительное влияние на такие показатели качества, как вкус пива и стабильность пены;
- белковые ингибиторы протеолитических ферментов — участники формирования гомеостатических реакций у растений. Подобранные к локусу гена ингибитора трипсина (*Itr1*) праймеры приводят к амплификации специфического ПЦР-продукта у ряда сортов ячменя и образцов пива.
Генетические мишени, описанные выше, и используемые в качестве молекулярных маркеров для геноидентификации сортов пивоваренного ячменя и ДНК-аутентификации пива представлены в Таблице 1 [14].

Таблица 1
Генетические мишени, используемые в качестве молекулярных маркеров для геноидентификации сортов пивоваренного ячменя и ДНК-аутентификации пива

Мишень	Последовательность праймеров (5'-3')
<i>HvPG1</i> F	GACAGAATGGCGTTCAAGAACAT
<i>HvPG1</i> R	AGCAAGTTGCCTTCCAGCTTGAT
<i>HrdA</i> F	agatagcgtttgaaggtcac
<i>HrdA</i> R	tagacctgaataatttcca
<i>HrdB</i> F	TCACACATAAGGTTGTGTGAC
<i>HrdB</i> R	CAAGCTTTCCACACAACCA
<i>HrdC</i> F	AATTAAACAAGTAGTTTCGGGTGG
<i>HrdC</i> R	caagctttcccaacaaccaccat
<i>waxy</i> F	CAATTCATCCGATCACTCAATCAT
<i>waxy</i> R	CAGGCCGACAAGGTGCTG
<i>Xlms</i> F	GGTACAACGTCGCGTCGG
<i>Xlms</i> R	CGTGTACCAGACGGTCCAGATACAGC
<i>PrtnZ4</i> F	GAGACGTGTAGTAATCTTCG
<i>PrtnZ4</i> R	GCGAGCACAAATTGCACCACC

Широкое распространение получили микросателлиты — молекулярные маркеры, пригодные для идентификации *Hordeum vulgare* [29], представленные в Таблице 2 [30, 31]. Наряду с SSR-маркерами, высокой идентификационной способностью обладают SNP-маркеры, используемые для геноидентификации сортовой принадлежности ячменя, в том числе пивоваренного (Таблица 3) [32,33,34].

Таблица 2
SSR-маркеры ядерной ДНК *Hordeum vulgare*, используемые для геноидентификации сортов пивоваренного ячменя, потенциально пригодные и для ДНК-аутентификации пива

№ п.п.	SSR-маркер	Последовательность праймеров (5/-3/)	Кол-во аллелей	Источник
1	<i>Bmac 0040</i> F	AGCCCGATCAGATTTACG	6	
	<i>Bmac 0040</i> R	TTCTCCCTTTGGTCCTTG		
2	<i>Bmag 0125</i> F	AATTAGCGAGAACAAAATCAC	5	
	<i>Bmag 0125</i> R	AGATAACGATGCACCACC		
3	<i>Bmac 0134</i> F	CCAACTGAGTCGATCTCG	5	[30]
	<i>Bmac 0134</i> R	CTTCGTTGCTTCTCTACCTT		
4	<i>Bmag 0211</i> F	ATTTCATCGATCTTGTAATAGTCC	4	
	<i>Bmag 0211</i> R	ACATCATGTGCGATCAAAAGC		
5	<i>Bmag 0222</i> F	ATGCTACTCTGGAGTGGAGTA	7	
	<i>Bmag 0222</i> R	GACCTTCAACTTTGCTTATA		
6	<i>Bmag0125</i> F	AATTAGCGAGAACAAAATCAC	2	
	<i>Bmag0125</i> R	AGATAACGATGCACCACC		
7	<i>Bmag0321</i> F	ATTATCTCTCGCAACAACCTA	3	
	<i>Bmag0321</i> R	CTCCGGAACACGACAAG		
8	<i>Bmag0727</i> F	AACTATGTCCAGTCGTTTCC	5	
	<i>Bmag0727</i> R	CTTGTCGTATCATCTTATTCAGA-		
9	<i>Bmag0808</i> F	TCATAGACTACGACGAAGATG	5	[31]
	<i>Bmag0808</i> R	TCTTTGGATGTGTGTTACTG		
10	<i>Bmag0872</i> F	TCATAGACTACGACGAAGATG	3	
	<i>Bmag0872</i> R	TCTTTGGATGTGTGTTACTG		
11	<i>EBmac0871</i> F	TGCCTCTGTTGTGTTATTGT	2	
	<i>EBmac0871</i> R	CCCCAAGTGAACATTGAC		
12	<i>EBmac0003</i> F	AATTTTGCAAAGCTGGAGG	1	
	<i>EBmac0003</i> R	CATTATGGTGGGGTTTCATGT		

Таблица 3
SNP-маркеры ядерной ДНК *Hordeum vulgare*, используемые для геноидентификации сортов ячменя, потенциально пригодные и для ДНК-аутентификации пива

№ п.п.	Олигонуклеотиды	Последовательность праймеров (5/-3/)
1	MWG2062 (325 A-G) (outer primer)	F: GTTGTGTCAAGCATATCGGTTGCTCTT R: CAGCACGTTCCGAAAACAATAGGATCC
	MWG2062 (325 A-G) (inner primer)	F: AAGAATATGCCAATTATTTGGCGTGTCA R: CACACTGCATGTCATCAACAAGCAC
2	ABC465b (254 C-T) (outer primer)	F: CAGGTACACCTGGAAGCTCTACTCAGAG R: CAGCAGCCTGAATTCAACAAAACATAC
	ABC465 (254 C-T) (inner primer)	F: TGGAGATGTTCTACGCTCTCAAGTACAGT R: CTGTTGGTCAGATAACCTACCAGGATG
3	MWG2218 (175 G-C) (outer primer)	F: CTCTCCGACATCGACCGCTTCTCTTCG R: GCCGCATCATCCCTGGTGTATCATCCT
	MWG2218 (175 G-C) (inner primer)	F: GGGGACGTCATCCACGTCTGTGCGACC R: GTTCCCGCGGTGGGCTTTGTTTCCTC
4	MWG801 (344 G-A) (outer primer)	F: CAACAACCCCAATACCAGGCCAGCTCCACA R: AACCTCGACTGCTCAAGGCAGAGCCGC
	MWG801 (344 G-A) (inner primer)	F: GAAGCATGCTCGACGACCCCATCC R: CGGCAGCGGAGGGGAAGGGGAGCAGT

Их потенциал в качестве ДНК-маркеров программ селекции по улучшению качества ячменя для пивоварения раскрывается также в работе авторов [35], в которой объектами исследования стали 10 уникальных гаплотипов на основе 56 вариаций гена *HvXYN1* в выборке из 210 образцов ячменя из 34 стран. Проведенное исследование показало достоверную связь 7 SNP-маркеров и 7 гаплотипов с активностью фермента эндо-1,4-β-ксилазы и общим содержанием арабиноксилана в зерне.

Обнаружение заменителей пивоваренного ячменя в пиве, нередко используемых в качестве более дешевого источника крахмала, позволяет оценить реализуемую продукцию на предмет качественной, количественной, информационной и комплексной фальсификации. Последовательности праймеров, нацеленные на генетические мишени, используемые при обнаружении заменителей пивоваренного ячменя в пиве, такие как гранул-связанная синтаза крахмала (GBSS) риса, β-конглицинин сои и зеин кукурузы, представлены в Таблице 4. При этом другие ПЦР-системы, разработанные для идентификации злаковых культур в продуктах питания, также могут быть пригодны при ДНК-аутентификации пива [36,37,38].

Таблица 4

Генетические мишени, используемые при обнаружении заменителей пивоваренного ячменя и идентификации хмеля и дрожжей в пиве

Мишень	Последовательность праймеров (5/-3/)
GBSS F	GGATGAAGGCCGAATCCTG
GBSS R	CTTGCCCGGATCTTCTCTCT
B-conglycinin F	TTTGGCATTGCTTACTGGGAAAAGAG
B-conglycinin R	TCTGTAGGAGTCTCTGTCGTCGTTG
Zein F	CACATGTGTAAGGTGAAGCGAT
Zein R	GCTCGCCGAAGCGCTTGTG
Hop-a F	GGAACCGTTGCCTAATCCTAAGATT
Hop-a R	GTGTTTTCCGTATCTACGCGCTGGG
Hop-b F	AATTAGGGCATGCCATGAATATT
Hop-b R:	TGGCATAGTTAAATATTTCTG
Yeast-a F	GTTTTGCGCTCATTAACCTAGTGGGAG
Yeast-a R	GTCATTTTTTTAGTGCTGTAATC

Пивоваренное производство относится к областям с высокими требованиями к санитарному состоянию, напитки представляют собой хорошую среду для развития микро-

организмов, поэтому на предприятиях должен осуществляться систематический микробиологический контроль.

Классические методы микробиологического мониторинга длительны по времени. Поэтому определенным потенциалом обладает внедрение высокоэффективных и экспрессных методов ДНК-контроля, кроме всего прочего предоставляющих глубокое понимание производственной проблемы.

Так, анализ наиболее распространенного контаминанта пивоваренного производства — *Lactobacillus brevis*, способного пребывать в жизнеспособном, но не культивируемом состоянии (VBNC — viable but nonculturable) показал: выделенный из образца готового пива, секвенированный геном *L. Brevis BM-LB13908* содержит ген устойчивости к компонентам хмеля *HorA* и несколько генов, ассоциированных с формированием состояния VBNC [39]. Что позволяет ему выживать при неблагоприятных условиях среды и приводить к порче пива с изменениями кислотности и/или мутности, ухудшению органолептических показателей продукта и экономическим потерям.

Разработанный авторами [40] подход к экстракции ДНК и постановке ПЦР в реальном времени позволяет обнаруживать морфологически схожий с пивными дрожжами загрязнитель *S. Cerevisiaevar. diastaticus* в коллекции дрожжевых культур на производстве при минимально низких концентрациях.

Авторами [41] с помощью ДНК-методов был подробно исследован потенциальный вредитель для пивоваренного производства — *Lactobacillus rossiae*, который был идентифицирован в 1,52% всех случаев выявления молочнокислых микроорганизмов. Было выявлено, что присутствие гена *hor* установило корреляцию с возможностью роста изолятов на пшеничном пиве, тогда как присутствие гена *hitA* показывало обратный эффект. Получаемые в ходе таких исследований данные крайне важны для разработки методов быстрого определения порчи пива.

3. Выводы

Анализ методов экстракции остаточной ДНК из готовой продукции, а также системы молекулярно-генетического маркирования сырьевых растительных компонентов и их заменителей, указывает на актуальность и перспективность использования ДНК-аутентификации в качестве метода определения подлинности алкогольных напитков с целью интенсификации борьбы с фальсификатами в отрасли. В тоже время ДНК-технологии позволяют быстро и эффективно бороться с микробиологической контаминацией на производстве.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Clements, K. W., Lan, Y., Liu, H. (2020). Understanding alcohol consumption across countries. *Applied Economics*, 52(40), 4421–4439. <https://doi.org/10.1080/00036846.2020.1735621>
- Anderson, K., Meloni, G., Swinnen, J. (2018). Global alcohol markets: Evolving consumption patterns, regulations, and industrial organizations. *Annual Review of Resource Economics*, 10, 105–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-100517-023331>
- Обзор российского рынка алкогольной продукции. Электронный ресурс <https://ac.gov.ru/uploads/2-Publications/alcogol/al%D1%81o.2020.4.pdf> Дата доступа 6 февраля 2021 г.
- De Keukeleir, D. (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Quimica Nova*, 23(1), 108–112. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422000000100019>
- Bokulich, N. A., Bamforth, C. W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 157–172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>
- Lachenmeier, D.W., Rehm, J. (2012). Is there a relationship between alcohol quality and health? *Alcohol and Alcoholism*, 48(1), 127–129. <https://doi.org/10.1093/alcac/ags101>
- Оганесянц, Л.А., Хуршудян, С.А., Галстян, А.Г. (2018). Мониторинг качества пищевых продуктов — базовый элемент стратегии. Food quality monitoring as the basic strategic element. *Контроль качества продукции*, 4, 56–59. (In Russian)
- Lachenmeier, D. W., Frank, W., Humpfer, E., Schäfer, H., Keller, S., Mörtter, M., Spraul, M. (2005). Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. *European Food Research and Technology*, 220(2), 215–221. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1070-7>
- Pokrivčák, J., Supelková, S. C., Lančarič, D., Savov, R., Tóth, M., Vašina, R. (2019). Development of beer industry and craft beer expansion. *Journal of Food and Nutrition Research*, 58(1), 63–74.
- Duarte, I., Barros, A., Belton, P. S., Righelato, R., Spraul, M., Humpfer, E., Gil, A. M. (2002). High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2475–2481. <https://doi.org/10.1021/jf011345j>
- Fernández, M. E., Figueiras, A. M., Benito, C. (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification

- and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(5), 845–851. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0848-2>
12. Rapacz, M., Stepień, A., Skorupa, K. (2012). Internal standards for quantitative RT-PCR studies of gene expression under drought treatment in barley (*Hordeum vulgare* L.): The effects of developmental stage and leaf age. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5), 1723–1733. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0967-1>
13. Oganessyants, L. A., Vafin, R. R., Galstyan, A. G., Semipyatniy, V. K., Khurshudyan, S. A., Ryabova, A. E. (2018). Prospects for DNA authentication in wine production monitoring. *Foods and Raw Materials*, 6(2), 438–448. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-2-438-448>
14. Nakamura, S., Tsushima, R., Ohtsubo, K. (2013). A novel method for the preparation of template DNA for PCR from beer to detect materials and to develop DNA markers to evaluate the quality of beer. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77(4), 820–831. <https://doi.org/10.1271/bbb.120969>
15. Nakamura, S., Haraguchi, K., Mitani, N., Ohtsubo, K. (2007). Novel preparation method of template DNAs from wine for PCR to differentiate grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10388–10395. <https://doi.org/10.1021/jf072407u>
16. Baxter, E. D., Hughes, P. S. (2001). An overview of the malting and brewing processes. Chapter in a book: *Beer Quality, Safety and Nutritional Aspects*. RSC: Cambridge, U.K., 2001. 1–13.
17. Bamforth, C.W. (2006). *Scientific Principles of Malting and Brewing*. American Society of Brewing Chemists: MN, USA, 2006.
18. Абдуллина, И.Р., Вафин, Р.Р., Зайнуллин, Л.И., Алимова, Ф.К. (2012). Выявление аллельного варианта Wx-A1G Waxy- гена у генотипов яровой пшеницы отечественной селекции. *Ученые записки Казанского Университета. Серия: естественные науки*, 154(4), 158–163.
19. Абдуллина, И.Р., Вафин, Р.Р., Ржанова, И.В., Гараева, А.Л., Асхадуллин, Д.Ф., Асхадуллин, Д.Ф. и др. (2013). Молекулярная идентификация генотипов яровой пшеницы по аллельным вариантам Waxy-генов. *Фундаментальные исследования*, 1–1, 13–17.
20. Yamaguchi, O., Baba, T., Furusho, M. (1998). Relationship between genotype of hordein and malting quality in Japanese barley. *Breeding Science*, 48(3), 309–314. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.48.309>
21. Pulido, A., Bakos, F., Devic, M., Barnabás, B., Olmedilla, A. (2009). HvPG1 and ECA1: Two genes activated transcriptionally in the transition of barley microspores from the gametophytic to the embryogenic pathway. *Plant Cell Reports*, 28(4), 551–559. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0662-2>
22. Pomortsev, A.A., Lialina, E.V., Martynov, S.P. (2008). Polymorphism of hordei-coding loci in near eastern local populations of cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Russian journal of genetics*, 44(6), 709–721. <https://doi.org/10.1134/S1022795408060112>
23. Lyalina, E.V., Boldyrev, S.V., Pomortsev, A.A. (2016). Current state of the genetic polymorphism in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) from Russia assessed by the alleles of hordein-coding loci. *Russian journal of genetics*, 52(6), 565–577. <https://doi.org/10.1134/S1022795416060077>
24. Washington, J.M., Box, A., Barr, A.R. (2000, 22–27 October). *Developing waxy barley cultivars for food, feed and malt*. International Barley Genetics. Volume: VIII. Adelaide, Australia.
25. Knox, C. A. P., Sonthayanon, B., Chandra, G. R., Muthukrishnan, S. (1987). Structure and organization of two divergent α -amylase genes from barley. *Plant Molecular Biology*, 9(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/BF00017982>
26. Paris, M., Jones, M. G. K., Eglinton, J. K. (2002). Genotyping single nucleotide polymorphisms for selection of barley β -amylase alleles. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(2), 149–159. <https://doi.org/10.1007/BF02799430>
27. Rasmussen, S. K., Klausen, J., Hejgaard, J., Svensson, B., Svendsen, I. (1996). Primary structure of the plant serpin BSZ7 having the capacity of chymotrypsin inhibition. *Biochimica Et Biophysica Acta — Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1297(2), 127–130. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(96\)00115-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00115-X)
28. Hirota, N., Kaneko, T., Kuroda, H., Kaneda, H., Takashio, M., Ito, K., Takeda, K. (2005). Characterization of lipoxygenase-1 null mutants in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(8), 1580–1584. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0088-y>
29. Lakhneko O. R., Morgun B. V., Kalendar R. M., Stepanenko, A.I., Troianovska, A.V., Rybalka, O.I. (2016). SSR analysis in the study of genetic diversity and similarity of barley cultivars. *Biotechnologia Acta*, 9(3)61–68. <https://doi.org/10.15407/biotech9.03.061>
30. Tomka, M., Urmínská, D., Chňápek, M., Gálová, Z. (2017). Potential of selected SSR markers for identification of malting barley genotypes. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(6), 1276–1279. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.6.6.1276-1279>
31. Palumbo, F., Galla, G., Barcaccia, G. (2017). Developing a molecular identification assay of old landraces for the genetic authentication of typical agro-food products: The case study of the barley 'agordino'. *Food Technology and Biotechnology*, 55(1), 29–39. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.01.17.4858>
32. Chiapparino, E., Lee, D., Donini, P. (2004). Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome*, 47(2), 414–420. <https://doi.org/10.1139/g03-130>
33. Hayden, M. J., Tabone, T., Mather, D. E. (2009). Development and assessment of simple PCR markers for SNP genotyping in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(5), 939–951. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1101-7>
34. Kurbakov, K.A., Konorov, E.A., Minaev, M. Yu., Kuznetsova, O.A. (2019). Multiplex real-time PCR with HRM for detection of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* in Food Samples. *Food Technology and Biotechnology*, 57(1), 97–104. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.01.19.5983>
35. Lu, X., Fang, Y., Tian, B., Tong, T., Wang, J., Wang, H. et al. (2019). Genetic variation of HvXYN1 associated with endoxylanase activity and TAX content in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1747-5>
36. Ohtsubo, K., Nakamura, S., Yoza, K., Shishido, K. (2001). Identification of glutinous rice cultivars using rice cake as samples by the PCR method. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 48, 306–310. <https://doi.org/10.3136/nshkk.48.306>
37. Tsukada, Y., Kitamura, K., Harada, K., Kaizuma, N. (1986). Genetic Analysis of Subunits of Two Major Storage Proteins (β -Conglycinin and Glycinin) in Soybean Seeds. *Japanese Journal of Breeding*, 36(4), 390–400. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.36.390>
38. Silletti, S., Morello, L., Gavazzi, F., Giani, S., Braglia, L., Breviaro, D. (2019). Untargeted DNA-based methods for the authentication of wheat species and related cereals in food products. *Food Chemistry*, 271, 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.178>
39. Xu, Z., Xu, R., Soteyome, T., Deng, Y., Chen, L., Liang, Y. et al. (2020). Genomic analysis of a hop-resistance *Lactobacillus brevis* strain responsible for food spoilage and capable of entering into the VBNC state. *Microbial Pathogenesis*, 145 Article 104186 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104186>
40. Schönling, J., Pick, E., Peter, U., Britton, S. (2019). Effect of autolytic by-products on PCR-detection of beer spoilers in yeast slurry. *Brewing Science*, 72(9–10), 168–172. <https://doi.org/10.23763/BrSc19-18schoenling>
41. Schneiderbanger, J., Jacob, F., Hutzler, M. (2019). Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rossiae* isolated from beer. *Journal of Applied Microbiology*, 126(4), 1187–1198. <https://doi.org/10.1111/jam.14202>

REFERENCES

1. Clements, K. W., Lan, Y., Liu, H. (2020). Understanding alcohol consumption across countries. *Applied Economics*, 52(40), 4421–4439. <https://doi.org/10.1080/00036846.2020.1735621>
2. Anderson, K., Meloni, G., Swinnen, J. (2018). Global alcohol markets: Evolving consumption patterns, regulations, and industrial organizations. *Annual Review of Resource Economics*, 10, 105–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-100517-023331>
3. Overview of the Russian market of alcoholic beverages. Retrieved from <https://ac.gov.ru/uploads/2-Publications/alcogol/al%D1%81o.2020.4.pdf> Accessed February 06, 2021 (In Russian)
4. De Keukeleirc, D. (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Quimica Nova*, 23(1), 108–112. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422000000100019>
5. Bokulich, N. A., Bamforth, C. W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 157–172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>
6. Lachenmeier, D.W., Rehm, J. (2012). Is there a relationship between alcohol quality and health? *Alcohol and Alcoholism*, 48(1), 127–129. <https://doi.org/10.1093/alcals/ags101>
7. Oganessyants, L.A., Khurshudyan, S.A., Galstyan, A.G. (2018). Food quality monitoring as the basic strategic element. *Production Quality Control*, 4, 56–59. (In Russian)
8. Lachenmeier, D. W., Frank, W., Humpfer, E., Schäfer, H., Keller, S., Mörtter, M., Spraul, M. (2005). Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. *European Food Research and Technology*, 220(2), 215–221. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1070-7>
9. Pokrivčák, J., Supeková, S. C., Lančarič, D., Savov, R., Tóth, M., Vašina, R. (2019). Development of beer industry and craft beer expansion. *Journal of Food and Nutrition Research*, 58(1), 63–74.
10. Duarte, I., Barros, A., Belton, P. S., Righelato, R., Spraul, M., Humpfer, E., & Gil, A. M. (2002). High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2475–2481. <https://doi.org/10.1021/jf011345j>
11. Fernández, M. E., Figueiras, A. M., & Benito, C. (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(5), 845–851. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0848-2>
12. Rapacz, M., Stepień, A., Skorupa, K. (2012). Internal standards for quantitative RT-PCR studies of gene expression under drought treatment in barley (*Hordeum vulgare* L.): The effects of developmental stage and leaf age. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5), 1723–1733. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0967-1>
13. Oganessyants, L. A., Vafin, R. R., Galstyan, A. G., Semipyatniy, V. K., Khurshudyan, S. A., Ryabova, A. E. (2018). Prospects for DNA authentication

- titication in wine production monitoring. *Foods and Raw Materials*, 6(2), 438–448. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-2-438-448>
14. Nakamura, S., Tsushima, R., Ohtsubo, K. (2013). A novel method for the preparation of template DNA for PCR from beer to detect materials and to develop DNA markers to evaluate the quality of beer. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77(4), 820–831. <https://doi.org/10.1271/bbb.120969>
15. Nakamura, S., Haraguchi, K., Mitani, N., Ohtsubo, K. (2007). Novel preparation method of template DNAs from wine for PCR to differentiate grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10388–10395. <https://doi.org/10.1021/jf072407u>
16. Baxter, E. D., Hughes, P. S. (2001). An overview of the malting and brewing processes. Chapter in a book: *Beer Quality, Safety and Nutritional Aspects*. RSC: Cambridge, U.K., 2001. 1–13.
17. Bamforth, C.W. (2006). *Scientific Principles of Malting and Brewing*. American Society of Brewing Chemists: MN, USA, 2006.
18. Abdulina, I. R., Vafin, R. R., Zainullin, L. I., Alimova, F. K. (2012). Identification of the allelic variant of the Wx-A1G Waxy gene in the genotypes of spring wheat of domestic selection. *Uchenye zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya estestvennye nauki*, 154, (4), 158–163. (In Russian)
19. Abdulina I. R., Vafin R. R., Rzhanova I. V., Garaeva A. L., Askhadullin D. F., Askhadullin D. F. et al. (2013). Molecular identification of spring wheat genotypes by allelic variants of Waxy genes. *Basic research*, 2013, 1–1, 13–17. (In Russian)
20. Yamaguchi, O., Baba, T., Furusho, M. (1998). Relationship between genotype of hordein and malting quality in Japanese barley. *Breeding Science*, 48(3), 309–314. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.48.309>
21. Pulido, A., Bakos, F., Devic, M., Barnabás, B., Olmedilla, A. (2009). HvPG1 and ECA1: Two genes activated transcriptionally in the transition of barley microspores from the gametophytic to the embryogenic pathway. *Plant Cell Reports*, 28(4), 551–559. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0662-2>
22. Pomortsev, A.A., Lialina, E.V., Martynov, S.P. (2008). Polymorphism of hordei-coding loci in near eastern local populations of cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Russian journal of genetics*, 44(6), 709–721. <https://doi.org/10.1134/S1022795408060112>
23. Lyalina, E.V., Boldyrev, S.V., Pomortsev, A.A. (2016). Current state of the genetic polymorphism in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) from Russia assessed by the alleles of hordein-coding loci. *Russian journal of genetics*, 52(6), 565–577. <https://doi.org/10.1134/S1022795416060077>
24. Washington, J.M., Box, A., Barr, A.R. (2000, 22–27 October). *Developing waxy barley cultivars for food, feed and malt*. International Barley Genetics. Volume: VIII. Adelaide, Australia.
25. Knox, C. A. P., Sonthayanon, B., Chandra, G. R., Muthukrishnan, S. (1987). Structure and organization of two divergent α -amylase genes from barley. *Plant Molecular Biology*, 9(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/BF00017982>
26. Paris, M., Jones, M. G. K., Eglinton, J. K. (2002). Genotyping single nucleotide polymorphisms for selection of barley β -amylase alleles. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(2), 149–159. <https://doi.org/10.1007/BF02799430>
27. Rasmussen, S. K., Klausen, J., Hejgaard, J., Svensson, B., Svendsen, I. (1996). Primary structure of the plant serpin BSZ7 having the capacity of chymotrypsin inhibition. *Biochimica Et Biophysica Acta — Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1297(2), 127–130. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(96\)00115-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00115-X)
28. Hirota, N., Kaneko, T., Kuroda, H., Kaneda, H., Takashio, M., Ito, K., Takeda, K. (2005). Characterization of lipoxigenase-1 null mutants in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(8), 1580–1584. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0088-y>
29. Lakhneko O. R., Morgun B. V., Kalendar R. M., Stepanenko, A.I., Troianovska, A.V., Rybalka, O.I. (2016). SSR analysis in the study of genetic diversity and similarity of barley cultivars. *Biotechnologia Acta*, 9(3)61–68. <https://doi.org/10.15407/biotech9.03.061>
30. Tomka, M., Urminská, D., Chňápek, M., Gálová, Z. (2017). Potential of selected SSR markers for identification of malting barley genotypes. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(6), 1276–1279. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.6.6.1276-1279>
31. Palumbo, F., Galla, G., Barcaccia, G. (2017). Developing a molecular identification assay of old landraces for the genetic authentication of typical agro-food products: The case study of the barley 'agordino'. *Food Technology and Biotechnology*, 55(1), 29–39. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.01.17.4858>
32. Chiapparino, E., Lee, D., Donini, P. (2004). Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome*, 47(2), 414–420. <https://doi.org/10.1139/g03-130>
33. Hayden, M. J., Tabone, T., Mather, D. E. (2009). Development and assessment of simple PCR markers for SNP genotyping in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(5), 939–951. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1101-7>
34. Kurbakov, K.A., Konorov, E.A., Minaev, M. Yu., Kuznetsova, O.A. (2019). Multiplex real-time PCR with HRM for detection of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* in Food Samples. *Food Technology and Biotechnology*, 57(1), 97–104. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.01.19.5983>
35. Lu, X., Fang, Y., Tian, B., Tong, T., Wang, J., Wang, H. et al. (2019). Genetic variation of HvXYN1 associated with endoxylanase activity and TAX content in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1747-5>
36. Ohtsubo, K., Nakamura, S., Yoza, K., Shishido, K. (2001). Identification of glutinous rice cultivars using rice cake as samples by the PCR method. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 48, 306–310. <https://doi.org/10.3136/nshkk.48.306>
37. Tsukada, Y., Kitamura, K., Harada, K., Kaizuma, N. (1986). Genetic Analysis of Subunits of Two Major Storage Proteins (β -Conglycinin and Glycinin) in Soybean Seeds. *Japanese Journal of Breeding*, 36(4), 390–400. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.36.390>
38. Silletti, S., Morello, L., Gavazzi, F., Gianì, S., Braglia, L., Breviaro, D. (2019). Untargeted DNA-based methods for the authentication of wheat species and related cereals in food products. *Food Chemistry*, 271, 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.178>
39. Xu, Z., Xu, R., Soteyome, T., Deng, Y., Chen, L., Liang, Y. et al. (2020). Genomic analysis of a hop-resistance *Lactobacillus brevis* strain responsible for food spoilage and capable of entering into the VBNC state. *Microbial Pathogenesis*, 145 Article 104186 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104186>
40. Schönlning, J., Pick, E., Peter, U., Britton, S. (2019). Effect of autolytic by-products on PCR-detection of beer spoilers in yeast slurry. *Brewing Science*, 72(9–10), 168–172. <https://doi.org/10.23763/BrSc19-18schoenling>
41. Schneiderbanger, J., Jacob, F., Hutzler, M. (2019). Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rossiae* isolated from beer. *Journal of Applied Microbiology*, 126(4), 1187–1198. <https://doi.org/10.1111/jam.14202>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Лазарева Екатерина Германовна — младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной биологии и биоинформатики, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-499-245-61-18 E-mail: lkg1996@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8069-9661 * corresponding author	Ekaterina G. Lazareva — Junior research scientist, Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS109316, Moscow, Talalikhina str., 26 Tel.: +7-499-245-61-18 E-mail: lkg1996@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8069-9661 * corresponding author
Гильманов Хамид Халилович — кандидат биологических наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярной биологии и биоинформатики, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26Тел.: +7-499-245-61-18. E-mail: gilmanov.xx@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7053-6925	Khamid Kh. Gilmanov — Candidate of biological sciences, Staff Scientist, Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS109316, Moscow, Talalikhina str., 26. Tel.: +7-499-245-61-18. E-mail: gilmanov.xx@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7053-6925
Бигаева Алина Владиславовна — научный сотрудник, лаборатория молекулярной биологии и биоинформатики, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-499-245-61-18 E-mail: ada14-5@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8400-2465	Alana V. Bigaeva — Staff Scientist, Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS109316, Moscow, Talalikhina str., 26 Tel.: +7-499-245-61-18 E-mail: ada14-5@yandex.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8400-2465
Тюлькин Сергей Владимирович — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярной биологии и биоинформатики, Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 109316, г. Москва, ул. Талалихина, 26 Тел.: +7-499-245-61-18 E-mail: tulsv@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5379-237X	Sergey V. Tyulkin — Doctor of Biological Sciences, Leading Scientist, Laboratory of Molecular Biology and Bioinformatics, V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS 109316, Moscow, Talalikhina str., 26 Tel.: +7-499-245-61-18 E-mail: tulsv@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5379-237X
Вафин Рамиль Ришадович — доктор биологических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник, Межотраслевой научно-технический центр мониторинга качества пищевых продуктов, Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 119021, Москва, ул. Россолимо, 7 Тел.: +7-499-245-61-18 E-mail: vafin-ramil@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0914-0053	Ramil R. Vafin — Doctor of Biological Sciences, Professor of RAS, Leading scientist, Interdisciplinary scientific and technical center of food quality monitoring, All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Industry — Branch of V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS 119021, Moscow, Rossolimo str., 7 Tel.: +7-499-245-61-18 E-mail: vafin-ramil@mail.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0914-0053
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов	The authors declare no conflict of interest
Поступила 17.02.2021	Received 17.02.2021
Поступила после рецензирования 11.03.2021	Accepted in revised 11.03.2021
Принята в печать 25.03.2021	Accepted for publication 25.03.2021