

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 108**

51 Int. Cl.:
A23D 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99950149 .7**

96 Fecha de presentación: **01.10.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1117303**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2001**

54 Título: **Aceite vegetal que tiene un contenido de ácido esteárico elevado**

30 Prioridad:
02.10.1998 US 102903 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.04.2012

73 Titular/es:
**CARGILL, INCORPORATED
15407 MCGINTY ROAD WEST
WAYZATA, MN 55391, US**

72 Inventor/es:
KODALI, Dharma

74 Agente/Representante:
de Elizaburu Márquez, Alberto

ES 2 378 108 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

Aceite vegetal que tiene un contenido de ácido esteárico elevado.

CAMPO TÉCNICO

5 Esta invención se refiere a aceites vegetales que contienen un contenido alterado de ácidos grasos, más particularmente, un contenido elevado de ácido esteárico y un contenido disminuido de poliinsaturados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION.

10 En manteca de cacao predominan tres ácidos grasos, ácido palmítico, esteárico y oleico, y tres triacilglicéridos (TAGs) contienen estos ácidos grasos en particular. Aproximadamente 80% de los TAGs de la manteca de cacao son palmitato-oleato-palmitato (13-19%), palmitato-oleato-estearato (36-42%), y estearato-oleato-estearato (23-29%). Debido a que la manteca de cacao es cara, y su provisión está limitada, se han propuesto diversas alternativas. Los sustitutos de manteca de cacao normalmente derivan de combinaciones de aceites parcialmente hidrogenados, o parcialmente hidrogenados y fraccionados, de soja, colza, y palma. Como tal, estos aceites tienen alta cantidad de ácidos grasos trans. Ver, por ejemplo, Bailey's Industrial Oil & Food Products, quinta edición, John Wiley & Sons, Inc., volumen 4, páginas 384-389 (1996).

15 Los sustitutos de manteca de cacao generalmente contienen ácido láurico como componente principal (40-50%), y normalmente derivan del aceite y palma de coco. La ingeniería genética ha conducido a otras fuentes de plantas que tienen niveles elevados de ácido láurico. Por ejemplo, la patente de EEUU número 5.344.771 describe plantas transgénicas de *Brassica* que producen aceite de colza que es rico en ácido láurico.

20 Los equivalentes y ampliaciones de manteca de cacao tienen una composición TAG que es similar a manteca de cacao. Los equivalentes de manteca de cacao derivan de grasas de palma, illipe, karité, sal y kokum. Los intentos de crear otros equivalentes de manteca de cacao a partir de plantas de semillas oleaginosas no han tenido éxito. Por ejemplo, la patente de EEUU número 5.723.595 describe plantas de *Brassica* transgénica que contienen un transgen delta-9 desaturasa. Los aceites extraídos de estas plantas han incrementado la cantidad de ácido esteárico, pero también contienen cantidades incrementadas de ácido linoléico y/o niveles incrementados de ácidos grasos de cadena larga y cadena muy larga (18 carbonos o mayor).

25 Se han descrito líneas de planta *Brassica* con niveles reducidos de ácido linoléico (2,5-5,8%) y niveles elevados de ácido oleico (73-79%) (Pleines et al., Fat Sci. Technol., 90: 167-171, 1988). Aunque hay ciertos problemas asociados con la selección de plantas mutantes que tienen un contenido alterado de los ácidos linoleico y linoléico (Rakow et al., J. Amer. Oil Chem. Soc., 50: 400-403, 1973), se ha informado de aceite de colza de verano Stellar que contiene 3% de ácido linoléico y 28% de ácido linoleico (Can. J. Plant Sci., 68: 509-511, 1988). Además, se produjo una línea reconstituida caracterizada por contenido bajo de linoléico y alto de linoleico mediante transferencia genética en un cruce entre especies a partir de *Brassica juncea* con *Brassica napus* (Roy et al., Z. Pflanzenzuchtg, 95: 201-209, 1985). También se ha informado de probabilidades de desarrollar *Brassica napus* que tenga contenido mejorado de ácido linoléico y linoleico (Roy et al., Plant Breeding, 98: 89-96, 1987). También se ha informado de semillas y aceites que tienen 79% de ácido oleico y 3,5% de ácido α -linoléico (solicitud de patente europea 323.751).

30 La patente WO 99/57990 en nombre de E.I. Pont De Nemours and Company calificada como técnica previa sólo bajo el artículo 54(3)(4) y Ruel 23a EPC 1973. La patente WO 99/57990 describe aceites de soja. Los aceites de soja de la patente WO 99/57990 tienen un contenido C18:0 de al menos 15% y un contenido C18:1 mayor de 55% de los restos de ácidos grasos en el aceite (ver página 18, líneas 1-2 y 14-19; ver también tablas 6 y 7 de las páginas 24-25).

35 La patente de EEUU 5.885.643 en nombre de Cargill, Incorporated describe aceites de colza hidrogenados. El contenido de ácido esteárico de estos aceites hidrogenados es de no más de aproximadamente 15% (cf. columna 4 líneas 22-28; columna 4 líneas 44-49). El contenido de ácido oleico de estos aceites hidrogenados es mayor de 75% (cf. columna 5 líneas 15-21; columna 5 líneas 31-39).

40 La patente WO 95/07620 en nombre de Unilever describe una fracción estearina de aceite de karité fraccionado seco, en la que 66,6% de los triacilglicéridos tienen una composición HOH (ver tabla 1.2 en página 12), en la que H representa residuos de ácido graso saturado C18-24, O representa residuo de ácido oleico, y L representa residuo de ácido linoleico (cf. página 2 líneas 28-29).

50 La patente WO 95/07620 también describe aceites de soja, y fracciones estearina de aceites de soja, en los que 12,1%, 8,8% o 7,2% de los triacilglicéridos tienen tal composición HOH (ver tabla 2.1 en la página 16, tabla 5.2 en la página 25, y tabla 7.2 en la página 32).

COMPENDIO DE LA INVENCÓN.

La invención se caracteriza por aceites vegetales que tienen un contenido elevado de ácido esteárico y un contenido disminuido de ácido graso poliinsaturado comparado con aceites vegetales conocidos.

5 En un aspecto, la invención se caracteriza por un extracto de aceite endógeno a partir de semillas de planta que tiene un contenido de ácido esteárico de 17% a aproximadamente 28% y un contenido de ácido graso poliinsaturado de aproximadamente 2% a aproximadamente 6%. El aceite puede tener un contenido de ácido α -linolénico de aproximadamente 0,6% a aproximadamente 2,0% y/o contenido de ácido palmítico de aproximadamente 6% a aproximadamente 20%. Por ejemplo, el aceite puede tener un contenido de ácido palmítico de aproximadamente 7% a aproximadamente 19%. El aceite puede tener un contenido de ácido oleico de menos de aproximadamente 64%, por ejemplo, de 34% a 53%. El valor de yodo de tales aceites puede ser menor que aproximadamente 76. Los aceites de esta realización pueden tener un punto de fusión por colorimetría diferencial de barrido (DSC) de aproximadamente 4°C a aproximadamente 20°C en ausencia de cristalización por almacenamiento en frío y un punto de fusión DSC de aproximadamente 24°C a aproximadamente 40°C después de cristalización por almacenamiento en frío. El aceite endógeno se puede extraer a partir de semillas de colza (*Brassica*), maíz o girasol.

15 En otro aspecto, la aplicación se caracteriza por un aceite que tiene un contenido de ácido esteárico de aproximadamente 19% a aproximadamente 30% y un contenido de ácido graso poliinsaturado de aproximadamente 2% a aproximadamente 15%. Tal aceite además tiene un contenido de ácido palmítico de aproximadamente 6% a aproximadamente 19% y/o un contenido de ácido oleico de aproximadamente 46% a aproximadamente 53%. Un aceite de esta realización tiene un punto de fusión DSC de aproximadamente 30°C a aproximadamente 40°C en ausencia de un periodo de almacenamiento en frío. Aproximadamente 15% o más de los TAGs en el aceite (por ejemplo, aproximadamente 18% o más o 30% o más) incluyen un resto de oleato en la posición sn-2 y restos de palmitato o estearato en las posiciones sn-1 y sn-3. Aproximadamente 10% a aproximadamente 25% de los TAGs en el aceite pueden tener un resto de estearato en la posición sn-1, un resto de oleato en la posición sn-2, y un resto de estearato en la posición sn-3; y aproximadamente 6% a aproximadamente 12% de los TAGs en el aceite pueden tener un resto de palmitato en la posición sn-1, un resto de oleato en la posición sn-2, y un resto de estearato en la posición sn-3.

Al menos aproximadamente 15% de los TAGs en el aceite de la invención puede incluir un resto de oleato en la posición sn-2 y restos de palmitato o estearato en las posiciones sn-1 y sn-3. Por ejemplo, al menos aproximadamente 18% o al menos aproximadamente 30% de los TAGs pueden incluir un resto de oleato en la posición sn-2 y restos de palmitato o estearato en las posiciones sn-1 y sn-3.

En otro aspecto, la invención se caracteriza por un método para producir un aceite vegetal. El método incluye moler semillas producidas por una planta (por ejemplo, una planta de colza (*Brassica*), maíz o girasol), en el que las semillas tienen un contenido de ácido esteárico de aproximadamente 17% a aproximadamente 28% y un contenido de ácido graso poliinsaturado de aproximadamente 2% a aproximadamente 6%; y extraer un aceite endógeno a partir de semillas molidas. La planta de *Brassica* puede mostrar actividad delta-9 desaturasa reducida y actividad delta-12 desaturasa reducida, y actividad esteroil acil-ACP tioesterasa incrementada. La planta de *Brassica* además puede mostrar actividad delta-15 desaturasa reducida. El aceite endógeno puede tener un contenido de ácido palmítico de aproximadamente 6% a aproximadamente 20%. El método además puede incluir la etapa de fraccionar el aceite endógeno en una fracción estearina y una fracción oleica, donde la fracción estearina tiene un contenido de ácido esteárico de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% y un contenido de ácido oleico de aproximadamente 46% a aproximadamente 53%.

En un aspecto más, esta invención se refiere al aceite de la invención como un aceite vegetal en un producto de confitería o en un producto de grasa sólida. La solicitud se caracteriza por un producto de confitería que incluye un componente graso, donde el componente graso incluye un aceite vegetal que tiene un contenido de ácido esteárico de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% y un contenido de ácido graso poliinsaturado de aproximadamente 2% a aproximadamente 15%. El aceite vegetal además puede tener un contenido de ácido oleico de aproximadamente 46% a aproximadamente 53%. La invención también se caracteriza por un producto de confitería que incluye un componente graso, en la que al menos aproximadamente 18% de los TAGs en el componente graso incluyen un resto de oleato en la posición sn-2 y restos de palmitato y estearato en las posiciones sn-1 y sn-3. El componente graso puede derivar a partir de colza, soja, maíz, o girasol.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entienden los expertos en la técnica a los que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para la práctica de la invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes. Otras características y ventajas de la invención se harán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

La figura 1 es un escaneo DSC de aceite C1C después de atemperar a 10°C durante 1 minuto o 15 horas. La línea 1 es una curva de fusión para el aceite C1C que se incubó a 5°C durante 1 mes. La línea 2 es una curva de fusión para el aceite C1C que se fundió completamente, se enfrió a 10°C, y se mantuvo a 10°C durante 15 horas. La línea 3 es una curva de fusión para el aceite C1C que se fundió completamente, se enfrió a 10°C, y se mantuvo durante 1 hora.

La figura 2 muestra un esquema para fraccionar aceite C1C.

DESCRIPCIÓN DETALLADA.

La invención se caracteriza por aceites vegetales que tienen un contenido elevado de ácido esteárico y un contenido disminuido de ácido graso poliinsaturado. El contenido de ácido esteárico es suficientemente elevado para permitir que los aceites sean utilizados en alimentos que requieren grasas sólidas, tales como untables o mantecas, sin la necesidad de hidrogenación. Como tal, los aceites de la invención son composiciones nutritivas, naturales que no contienen ácidos grasos trans y tienen alta estabilidad oxidativa. Además, la formulación de los aceites ricos en esteárico de la invención con diversos caldos de base puede proporcionar los medios para crear numerosas aplicaciones de grasas sólidas.

Plantas con contenido elevado de ácido esteárico y disminuido de ácidos grasos poliinsaturados.

Se ha descubierto que las plantas se pueden manipular para producir niveles altos de estearato y niveles bajos de ácidos grasos poliinsaturados a través de ingeniería genética, mutagénesis o sus combinaciones, y que los aceites vegetales que tienen contenido de ácido esteárico de aproximadamente 17% a aproximadamente 28% y un contenido de ácido graso poliinsaturado de aproximadamente 2% a aproximadamente 6%, en base a la composición total de ácidos grasos, se puede obtener a partir de la molienda de semillas de tales plantas y extrayendo el aceite de ahí.

Las especies de plantas que son adecuadas para producir aceites de la invención incluyen *Brassica spp* (colza tipo canola), *Helianthus* (girasol), y *Zea mays* (maíz). Por ejemplo, especies de *Brassica* tales como *B. napus*, *B. campestris*, *B. juncea*, y *B. rapa*, son adecuadas para producir los aceites de la invención. En general, los niveles de ácido oleico y ácidos grasos poliinsaturados han decrecido en las plantas modificadas en comparación con la planta inicial, para incrementar el contenido de ácidos grasos saturados, y en particular, el contenido de ácido esteárico. Las plantas de *Brassica* se pueden modificar de modo que contengan actividad incrementada de oleil- o estearoil-ACP tioesterasa y actividad decrecida de ácido graso desaturasa, incluyendo actividad delta-9, delta-12, y delta-15 desaturasa. Las plantas también se pueden modificar de modo que contengan incremento de 3-cetoacil-ACP sintetasa II (KAS II). La actividad tioestearasa incrementada puede no ser necesaria si la actividad delta-9 desaturasa se inhibe completamente. Las plantas de *Brassica* también pueden mostrar actividad incrementada palmitoil-ACP tioesterasa.

El genoma de muchas especies de *Brassica* es complejo. Por ejemplo, *B. juncea* y *B. napus* son anfidiplóides o alotetraplóides, y tienen una serie de cromosomas diploides completa de cada parental. Se estima que *B. napus* contiene seis copias de delta-15 desaturasa microsomal y ocho copias de la correspondiente desaturasa plastidial. Scheffler, J.A. et al., Theor. Appl. Genet., 94: 583-591 (1997).

“Desaturasa microsomal” se refiere a la localización en el citoplasma de un enzima, mientras que “desaturasa plastidial” se refiere a la localización del plastidio de la enzima. Estas ácido graso desaturasas no se han aislado y caracterizado como proteínas.

Plantas tales como girasol y maíz mostrarán un contenido elevado de ácido esteárico y un contenido reducido de poliinsaturados en el aceite de semilla cuando se modifica de manera apropiada. Se pueden reducir los poliinsaturados mediante el decremento de la actividad de delta-12 desaturasa. Se puede incrementar el ácido esteárico incrementando la actividad de acil-ACP tioesterasa y/o reduciendo la actividad de delta-9 desaturasa.

Se puede usar una planta descrita en la presente memoria como un parental para desarrollar una línea de planta, o puede ser por sí misma un miembro de una línea de planta, es decir, es una de un grupo de plantas que no presentan o presentan poca variación genética entre individuos para la nueva característica de la composición de aceite. Tales líneas se pueden crear por varias generaciones usando autopolinización y selección, o propagación vegetativa a partir de un único parental usando técnicas de cultivo de tejido o celular conocidas en la técnica. Se conocen en la técnica métodos adicionales de cultivo de líneas de plantas a partir de plantas parentales.

Se pueden obtener plantas transgénicas introduciendo al menos un constructor de ácido nucleico en una célula de la planta como se describe en la presente memoria. Las semillas producidas por una planta transgénica pueden crecer y autopolinizarse (o hacer polinización cruzada y autopolinización) para obtener plantas homocigóticas para el constructo. Las semillas se pueden analizar para identificar aquellos homocigotos que tienen la expresión deseada del constructo. Las plantas transgénicas se pueden incluir en un programa de cultivo, por ejemplo, para incrementar semillas, para la introgresión del nuevo constructo en otras líneas o especies, o para más selección de otros

caracteres deseables. Alternativamente, se pueden obtener plantas transgénicas por propagación vegetativa de una célula de planta transformada, para aquellas especies susceptibles de tales técnicas.

La progenie de una planta transgénica está incluida en el ámbito de la invención, siempre que tal progenie muestre las características nuevas del aceite de semilla descrito en la presente memoria. La progenie de esta planta incluye, por ejemplo, semillas formadas sobre F₁, F₂, F₃, y plantas de generaciones posteriores, y semillas formadas sobre BC₁, BC₂, BC₃, y plantas de generaciones posteriores.

Las técnicas transgénicas para usar en esta invención incluyen, sin limitación, transformación mediada por *Agrobacterium*, electroporación, y transformación por acelerador de partículas. Se describen ejemplos ilustrativos de técnicas de transformación en WO 99/43202 y en la patente de EEUU 5.204.253 (acelerador de partículas) y la patente de EEUU 5.188.958 (*Agrobacterium*). Los métodos de transformación que utilizan plásmidos Ti y Ri de *Agrobacterium spp* típicamente usan vectores de tipo binario. Walkerpeach, C. et al., en Plant Molecular Biology Manual, S. Melvin y R. Schilperoort, eds., Kluwer Dordrecht, C1:1-19 (1994). Si se usan cultivos de célula o tejido como los tejidos receptores de transformación, se pueden regenerar plantas a partir de cultivos transformados mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Además, se pueden transformar diversas especies de plantas usando la técnica de ruta del tubo polínico.

Las plantas útiles en la invención muestran un incremento del contenido de ácido esteárico en semillas producidas por tales plantas, en comparación con una planta no transgénica correspondiente. Tal incremento típicamente se debe a una elevada actividad de tioesterasa hacia estearoil-ACP. Acil-ACP tioesterasas que utilizan estearoil-ACP como un sustrato incluyen oleil-ACP tioesterasas y estearoil-ACP tioesterasas. Tales tioesterasas hidrolizan estearoil-ACP a estearato libre y ACP. Los ácidos nucleicos que codifican tales secuencias de tioesterasa se describen, por ejemplo, en WO 97/12047 y en la patente de EEUU número 5.530.186. La actividad de tales tioesterasas se puede incrementar en una planta uniendo operativamente una secuencia codificada de tioesterasa a uno o más elementos de regulación en sentido de la orientación e introduciendo el constructo en una célula de planta usando técnicas y secuencias reguladoras como se describe en la presente memoria. La dosis de genes adicional da como resultado más producto con gen tioesterasa de actividad enzimática incrementada.

Las plantas útiles en la invención también muestran un contenido reducido de poliinsaturados en semillas. Tales plantas se pueden crear provocando una reducción en la actividad de las apropiadas ácido graso desaturasas. Mediante "ácido graso desaturasa" se entiende una enzima que cataliza la rotura de un enlace carbono-hidrógeno y la formación de un doble enlace carbono-carbono en la molécula de ácido graso. El ácido graso puede estar libre o esterificado con otra molécula que incluye, pero no está limitado a, proteína transportadora de acilos (ACP), coenzima A, esteroides, y el resto glicerol de glicerolípidos. Por ejemplo, la enzima delta-12 ácido graso desaturasa (también conocida como oleico desaturasa, omega-6 ácido graso desaturasa, y oleico citoplasmática desaturasa) está implicada en la conversión enzimática de ácido oleico a ácido linoleico. Delta-12 desaturasa cataliza la formación de un doble enlace entre átomos de carbono en posiciones 6 y 7 de un ácido graso de longitud de cadena de 18 carbonos, numerados a partir del extremo metilo. Estos mismos átomos de carbono pueden referirse a radicar en las posiciones 12 y 13 si se numera a partir del carbono carbonilo. Se describen las secuencias de nucleótidos de genes de plantas superiores que codifican ácido graso delta-12 desaturasa microsomal en Lightner et al., WO94/11516. El gen que codifica ácido graso delta-12 desaturasa se llama *fad2* en *Brassica* y *Arabidopsis*. Se puede lograr una reducción de la actividad de delta-12 desaturasa mediante técnicas que incluyen, pero no son limitantes, antisentido, rotura ribosómica, supresión del dominante negativo y cosupresión. Estos fenómenos pueden reducir significativamente la expresión del producto de gen del gen nativo. Se puede deducir una reducción en la expresión del gen *fad2* y la actividad de delta-12 desaturasa del nivel de disminución del producto de reacción (por ejemplo disminución de 18:2) y el nivel aumentado del sustrato en semillas comparado con los niveles correspondientes en plantas no transgénicas.

Delta-9 desaturasa cataliza la desaturación de estearoil-ACP (18:0) en la posición Δ9, para producir oleoil-ACP (18:1) y a menudo se le hace referencia como "estearoil-ACP desaturasa" debido a su alta actividad hacia estearato. Se han descrito secuencias de nucleótidos que codifican delta-9 desaturasas a partir de levaduras, rata y ratones. Stukey, et al., J. Biol. Chem., 265:20144-20149, (1990); Thiede et al., J. Biol. Chem., 261:13230-13235, (1986); Kaestner et al., J. Biol. Chem., 264:14755-14762, (1989). También se han descrito secuencias de nucleótidos que codifican delta-9 desaturasas a partir de plantas superiores. Ver, por ejemplo, las patentes de EEUU números 5.443.974 y 5.723.595. Se puede lograr una reducción de la actividad de delta-9 desaturasa mediante técnicas tales como antisentido, rotura ribosómica, supresión del dominante negativo y cosupresión.

Las plantas útiles en la invención también pueden mostrar una reducción de la actividad de ácido graso delta-15 desaturasa en comparación con una planta no transgénica correspondiente. La ácido graso delta-15 desaturasa (también conocida como ácido graso omega-3 desaturasa, ácido linoleico citoplásmico desaturasa, y linoleato desaturasa) está implicada en la conversión enzimática de ácido linoleico a ácido α-linolénico. Delta-15 desaturasa cataliza la formación de un doble enlace entre átomos de carbono situados en posiciones 3 y 4 (numerados a partir del extremo metilo de la molécula) de una cadena ácido graso de 18 carbonos de longitud. Estos mismos átomos de carbono se pueden referir como estar situados en posiciones 15 y 16 cuando se cuenta a partir del carbono carbonilo. El gen que codifica ácido graso delta-15 desaturasa se llama *fad3* en *Brassica* y *Arabidopsis*. Se describen secuencias de genes de plantas superiores que codifican *fad3* desaturasas microsomal y plastidial, por

ejemplo en, WO 93/11245. Se puede lograr una reducción de la actividad de delta-15 desaturasa mediante técnicas que incluyen, pero no son limitantes, antisentido, rotura ribosómica, supresión del dominante negativo y cosupresión.

La expresión incrementada de KAS II, que elonga palmitoil-ACP a estearoil-ACP, se puede usar para incrementar los niveles de estearoil-ACP. Se describen secuencias de plantas KAS II, por ejemplo, en la patente de EEUU número 5.500.361. Se pueden producir plantas con sobreexpresión de KAS II junto con actividad desaturasa disminuida y/o actividad tioesterasa aumentada.

Los constructos de ácido nucleico adecuados para modificar la expresión de tioesterasas, desaturasas, o KAS II, incluyen una secuencia reguladora operativamente unida a la secuencia codificada deseada. Las secuencias reguladoras típicamente no se codifican a sí mismas para un producto de gen. Por el contrario, las secuencias reguladoras afectan a la expresión de la secuencia codificada. Ejemplos de secuencias reguladoras se conocen en la técnica e incluyen, sin limitación, promotores de genes expresados durante la embriogénesis, por ejemplo, un promotor de napina, un promotor de faseolina, un promotor de oleosina, un promotor de cruciferina y promotores constitutivos tales como el promotor 35S del virus del de coliflor. Las secuencias reguladoras nativas, que incluyen promotores nativos de genes ácido graso delta-9, delta-12, y delta-15 desaturasa, KAS II, y genes oleoil y estearoil-ACP tioesterasa también se pueden usar en constructos de la invención. Otros ejemplos de secuencias reguladoras adecuadas incluyen potenciadores o elementos similares a potenciadores, intrones, y secuencias sin transcribir 5' y 3'. En la técnica son conocidos más ejemplos de secuencias reguladoras adecuadas para la correcta expresión de delta-9, delta-12 o delta-15 desaturasas, KAS II, y secuencias que codifican acil-ACP tioesterasa.

En realizaciones preferentes, las secuencias reguladoras son específicas de semillas, es decir, el producto de gen particular se expresa preferentemente en desarrollo de semillas y se expresa a niveles bajos o no se expresa en absoluto en el resto de tejidos de la planta. Las secuencias reguladoras específicas de semillas preferentemente estimulan o inducen la expresión del fragmento que codifica la secuencia de desaturasa recombinante en el momento en que coincide o precede ligeramente la expresión de la desaturasa nativa o gen de tioesterasa. Murphy et al., J. Plant Physiol., 135:63-69 (1989).

Típicamente, las moléculas de ácido nucleico que codifican tioesterasas, desaturasas, o KAS II, se introducen en una planta parental sobre plasmidios separados. Sin embargo, en la técnica se reconoce que los plasmidios o vectores pueden llevar más de una molécula de ácido nucleico antisentido, cosupresión, o sobreexpresión, cada una de las cuales puede estar bajo los mismos o distintos elementos reguladores.

La preparación de constructos antisentido y de cosupresión para reducir la actividad desaturasa utiliza la secuencia transcrita del gen desaturasa o sus fragmentos. Se ha utilizado ARN antisentido para inhibir genes objetivo de plantas de un modo específico para tejidos. Ver, por ejemplo, las patentes de EEUU números 5.453.566, 5.356.799, y 5.530.192. El constructo de ácido nucleico antisentido incluye una secuencia codificadora de longitud parcial o completa operativamente unida a al menos una secuencia reguladora adecuada en orientación antisentido.

Se pueden producir alteraciones deseadas de los niveles de ácidos grasos en los aceites de semillas de plantas usando un ribosoma. Se pueden usar moléculas de ribosoma diseñadas para romper delta-9, delta-12 desaturasa o delta-15 desaturasa del ARNm transcrito para evitar la expresión de delta-9, delta-12, y delta-15 desaturasa funcional. Mientras se pueden usar diversos ribosomas que rompen el ARNm en lugares específicos de las secuencias reconocidas para destruir ARNm desaturasas, son particularmente útiles los ribosomas cabeza de martillo. Los ribosomas cabeza de martillo rompen los ARNm en localizaciones dictadas por regiones adyacentes que forman pares de bases complementarias con el ARNm objetivo. La construcción y producción de ribosomas cabeza de martillo es bien conocido en la técnica. Ver, por ejemplo, la patente de EEUU número 5.254.678. Las secuencias de ribosomas cabeza de martillo pueden estar embebidos en un ARN estable tal como un ARN transferente (ARNt) para incrementar la eficacia de la rotura *in vivo*. Perriman, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(13): 6175-6179 (1995); de Feyter, R. and Gaudron, J., Methods in Molecular Biology, Vol. 74, chapter 43, "Expressing Ribozymes in Plants", editado por Turner, P.C, Humana Press Inc., Totowa, NJ (1997). También es útil el ARN endorribonucleasas tal como el que se da naturalmente en *Tetrahymena thermophila*, y que ha descrito extensamente Cech y colaboradores. Ver, por ejemplo, la patente de EEUU número 4.987.071.

El fenómeno de cosupresión también se ha usado para inhibir genes objetivo en plantas de un modo específico para tejidos. Se conoce la cosupresión de un gen endógeno usando una secuencia completa de ADNc así como una secuencia parcial de ADNc. Ver, por ejemplo, WO 94/11516, y las patentes de EEUU números 5.451.514 y 5.283.124. La cosupresión de la actividad de delta-9, delta-12, o delta-15 desaturasa en plantas se puede lograr mediante la expresión, en el sentido de la orientación, de la secuencia de codificación total o parcial de un gen desaturasa.

También se puede usar mutagénesis para reducir la actividad de delta-9, delta-12, o delta-15 desaturasa en plantas. Se pueden usar los agentes de mutagénesis para inducir mutaciones genéticas aleatorias en una población de semillas o tejidos de plantas regenerables. Los agentes mutagénicos apropiados incluyen, por ejemplo, etil metil sulfonato, metil N-nitrosoguanidina, bromuro de etidio, diepoxibutano, rayos-x, rayos UV, y otros mutágenos conocidos en la técnica. La población tratada, o la generación posterior de esa población, se examina para comprobar la desaturasa reducida o la actividad de tioesterasa mejorada que resulta de la mutación. La mutación se

5 puede dar en cualquier parte de un gen, incluyendo la región codificante, intrones, y elementos reguladores, que torna el producto de gen que resulta en no funcional o con actividad reducida. Tipos adecuados de mutaciones incluyen, por ejemplo, inserciones o deleciones de nucleótidos, y transiciones o transversiones en la secuencia codificante de tipo salvaje. Tales mutaciones pueden llevar a delección o inserción de aminoácidos, y sustituciones conservadoras o no conservadoras de aminoácidos en los productos de gen correspondientes.

10 Se conocen líneas de planta de *Brassica* que tienen mutaciones en genes desaturasa. Por ejemplo, IMC 129 (US PVP Certificate n° 9100151; patente de EEUU número 5.668.299) contiene una mutación en un gen delta-9 desaturasa y produce aceite que contiene aproximadamente 75,6% de ácido oleico y aproximadamente 4,9% de ácido α -linolénico. La línea *Brassica napus* IMC 130 lleva la mutación delta-12 desaturasa de IMC 129 así como un defecto que origina un contenido de ácido α -linolénico reducido en semillas, presumiblemente debido a una mutación en gen ácido graso delta-15 desaturasa. Ver, patente de EEUU número 5.767.338.

Caracterización de aceites.

15 Se pueden usar técnicas que se practican rutinariamente en la técnica para extraer, procesar y analizar los aceites producidos por plantas de la presente invención. Típicamente, las semillas de plantas se cuecen, presan, y se extraen para producir aceite crudo, que después se desgoma, refina, blanquea y desodoriza. Generalmente, las técnicas de prensado de semillas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las semillas de soja se pueden atemperar aplicando spray con agua para elevar el contenido de humedad a, por ejemplo, 8,5%, y hacerlas virutas usando un rodillo suave con un ajuste de abertura de 0,23 a 0,27 mm. Dependiendo del tipo de semilla, puede no añadirse agua antes del prensado. La aplicación de enzimas desactivadas por calor, facilita más la rotura de células, coalescencia de las gotas de aceite, y aglomeración de partículas de proteína, todo lo cual facilita el proceso de extracción.

20 La mayoría del aceite de semillas se libera al pasar a través de prensas de tornillo. La pasta expelida de la prensa de tornillo después se somete a extracción por disolvente, por ejemplo, con hexano, usando una columna de calentamiento eléctrico. Alternativamente, el aceite crudo producido por la operación de prensado puede pasar a través de un tanque de tratamiento con una parte superior de rejilla de drenaje para retirar los sólidos que están con el aceite durante la operación de prensado. El aceite clarificado puede pasar a través de un filtro de placas para eliminar cualquier partícula sólida fina. Si se desea, el aceite recuperado del proceso de extracción se puede combinar con el aceite clarificado para producir un aceite crudo combinado.

25 Una vez que el disolvente se ha quitado del aceite crudo, las porciones prensadas y extraídas se combinan y someten a procedimientos normales de procesamiento de aceite (es decir, desgomado, refinado caústico, blanqueado y desodorización). El desgomado se puede llevar a cabo mediante la adición al aceite crudo de ácido fosfórico concentrado para convertir los fosfátidos no hidratados a una forma hidratable, y para quelar metales menores que están presentes. La goma se separa del aceite mediante centrifugación. El aceite se puede refinar mediante la adición de una cantidad suficiente de hidróxido sódico para neutralizar todos los ácidos grasos y eliminar los jabones que se forman así.

30 La desodorización se puede llevar a cabo por calentamiento del aceite a 260°C (500°F) a vacío, e introduciendo lentamente vapor en el aceite a una velocidad de aproximadamente 0,1 ml/minuto/100 ml de aceite. Después de aproximadamente 30 minutos de aspersion, se deja el aceite enfriar en vacío. El aceite típicamente se transfiere a un contenedor de vidrio y se gasea con argón antes de almacenarse bajo refrigeración. Si la cantidad de aceite está limitada, el aceite se puede colocar en vacío, es decir, en un reactor Parr y se calienta a 500°F durante el mismo periodo de tiempo que se habría desodorizado. Este tratamiento mejora el color del aceite y elimina la mayoría de las sustancias volátiles.

35 Los aceites de la aplicación se extraen a partir de semillas y tienen un contenido de ácido esteárico de aproximadamente 15% a aproximadamente 30% y un contenido de ácidos grasos poliinsaturados de aproximadamente 2% a aproximadamente 15%, en base a la composición total de ácidos grasos. Como se usa en la presente memoria, "contenido de ácidos grasos poliinsaturados" se refiere a la cantidad total de ácido linolénico (C_{18:2}) y ácido α -linolénico (C_{18:3}). En particular, el contenido de ácido esteárico de un aceite de la invención es aproximadamente 17% a aproximadamente 28%, y el contenido de ácidos grasos poliinsaturados es aproximadamente 2% a aproximadamente 6%.

40 El contenido de α -linolénico puede ser de aproximadamente 0,6% a aproximadamente 2,0%. Los aceites de la invención también pueden tener un contenido de ácido palmítico de aproximadamente 6% a aproximadamente 20%, y en particular, de aproximadamente 7% a aproximadamente 19%. El contenido de ácido oleico de tales aceites es menor que aproximadamente 64%. Por ejemplo, el contenido de ácido oleico puede ser de aproximadamente 34% a aproximadamente 53%, de aproximadamente 34% a aproximadamente 46%, o de aproximadamente 46% a aproximadamente 53%. El valor de yodo de tales aceites puede ser menor que aproximadamente 76. Por ejemplo, el valor de yodo puede ser de aproximadamente 35 a aproximadamente 64 o de aproximadamente 60 a aproximadamente 74. El valor de yodo es una medida de la saturación del aceite. Los aceites que tienen valores de yodo más alto se consideran menos saturados que los aceites con valores de yodo más bajo.

La composición del aceite típicamente se analiza mediante la extracción de ácidos grasos de muestras de semillas en lotes (por ejemplo, al menos 10 semillas). Los ácidos grasos TAGs de la semilla se hidrolizan y se convierten en metil éster de ácido graso. Así, los porcentajes de ácidos grasos descritos en la presente memoria, a menos que se indique otra cosa, están basados en peso y se refieren a metil éster de ácido graso en comparación con los metil éster de ácido graso totales de la muestra que se ha analizado. Las semillas que tienen una composición de ácidos grasos alterada se pueden identificar mediante técnicas conocidas por los expertos, por ejemplo, análisis por cromatografía gas-líquido (GLC) de una muestra de semillas en lote, una única semilla o una única media semilla. El análisis de media semilla es muy conocido en la técnica por ser útil porque la viabilidad del embrión se mantiene y así las semillas que tienen lo que parece ser un perfil de ácidos grasos deseado se pueden plantar para formar la siguiente generación. Sin embargo, el análisis de semillas en lotes típicamente lleva a una representación más precisa del perfil de ácidos grasos de un genotipo dado. También se puede determinar la composición de ácidos grasos de muestras más grandes, por ejemplo, aceite obtenido de una planta piloto o refinado, blanqueado y desodorizado a escala comercial del aceite endógeno de las semillas.

Los aceites de la invención pueden tener un punto de fusión de aproximadamente 4°C a aproximadamente 20°C en ausencia de atemperado o cristalización por almacenamiento en frío, por ejemplo, después del refinar, blanquear y desodorizar un aceite endógeno. Sorprendentemente, estos aceites tienen un punto de fusión de aproximadamente 24°C a aproximadamente 40°C (por ejemplo, de aproximadamente 24°C a aproximadamente 30°C, de aproximadamente 24°C a aproximadamente 37°C, o de aproximadamente 30°C a aproximadamente 37°C) después de un periodo de atemperado o cristalización por almacenamiento en frío. La cristalización por almacenamiento en frío se refiere a un periodo de atemperado en el que el aceite se mantiene a una temperatura fría durante un periodo de tiempo suficiente para cambiar el perfil de fusión del aceite. Sin ser limitante de ningún mecanismo en particular, se cree que un periodo de atemperado permite al aceite cristalizar en una forma polimórfica de más alto punto de fusión. El almacenamiento en frío a temperaturas de aproximadamente 2°C a aproximadamente 12°C durante al menos aproximadamente 10 horas es suficiente para aumentar el punto de fusión. Por ejemplo, el aceite se puede mantener de aproximadamente 2°C a aproximadamente 7°C durante 12 horas, 7 días, o aproximadamente 2 meses.

Alternativamente, el aceite se puede mantener a aproximadamente 10°C durante 15 horas. Los puntos de fusión referidos anteriormente se determinan mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un calorímetro diferencial de barrido Perkin Elmer Model 7. Está claro, sin embargo, que los puntos de fusión se pueden determinar mediante otras técnicas, incluyendo punto de goteo Mettler e inspección visual de un material en un tubo capilar en un baño de agua o aceite.

Los aceites de la invención se pueden fraccionar para obtener una fracción sólida o estearina que tiene un alto contenido de ácido esteárico y un punto de fusión alto. El producto sin fraccionar se cristaliza fraccionadamente bajo condiciones controladas, después se separa en una fracción sólida y una fracción de aceite líquido mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, filtración de placas, filtración por presión, o centrifugación. Los procedimientos de fraccionamiento en seco se pueden usar para separar las fracciones líquida y sólida de los aceites, por ejemplo, un aceite se cristaliza a 10°C durante 15 horas y a 16°C durante 24 horas, se centrifuga, y el líquido se separa. Alternativamente, las fracciones a partir de la mezcla cristalizada se separan por presión o por filtración por vacío. La filtración por presión típicamente utiliza un gas inerte, por ejemplo, N₂ de aproximadamente 14,7 psi a aproximadamente 300 psi (101,3 Kpa a 2067,9 Kpa). Ver, las patentes EP 262.113, WO 95/04123, y WO 95/26391. Además, se puede usar una combinación de los procedimientos anteriores para separar las fracciones líquida y sólida.

La etapa de fraccionamiento se puede repetir sobre la estearina obtenida del primer fraccionamiento. En esta etapa, la estearina se funde, después se recristaliza bajo condiciones controladas como se describió anteriormente. La fracción de estearina obtenida del segundo fraccionamiento (estearina n^o2) también tiene un contenido alto de ácido esteárico y un punto de fusión alto. Tales aceites pueden tener un contenido de ácido esteárico de aproximadamente 20% a aproximadamente 30% y un punto de fusión de aproximadamente 28°C a aproximadamente 42°C. El contenido de ácido oleico de tales aceites puede ser de aproximadamente 46% a aproximadamente 53%.

Una proporción significativa de los restos TAG en aceites de la invención se pueden estructurar de modo que un resto de oleato (O) está en la posición sn-2 y un resto de palmitato (P) o de estearato (S) está en la posición sn-1 y sn-3 (^{P/S}O^{P/S}). Se usa nomenclatura similar para describir otros TAGs. TAGs con la estructura ^{P/S}O^{P/S} pueden constituir aproximadamente 15% de los TAGs en el aceite, de aproximadamente 18% a aproximadamente 30% de los TAGs, o al menos aproximadamente 30% de los TAGs en el aceite. En particular, aproximadamente 31% o más de los TAGs son ^{P/S}O^{P/S}. Por ejemplo, de aproximadamente 10% a aproximadamente 25% de los TAGs en el aceite de la invención son SOS, y de aproximadamente 4% a aproximadamente 12% (por ejemplo de aproximadamente 6% a aproximadamente 12%) de los TAGs en el aceite son POS. Es deseable más incremento en el porcentaje de TAGs de estas conformaciones particulares para aplicaciones de grasa sólida. Las proporciones de TAGs en aceites de la invención se pueden determinar instantáneamente según AOCS Official Method Ce 5B-89. Se identifican TAGs individuales en comparación con estándares externos o internos y se pueden cuantificar usando una curva de ajuste cuadrático no lineal.

TAGs tales como SOS y POS parecen concentrarse en las fracciones de estearina de la invención, siempre que la estearina tenga las características físicas deseables, incluyendo perfil de fusión, contenido de ácidos grasos

saturados, y contenido de grasa sólida. Las fracciones de oleica contienen TAGs con grado de insaturación más alto, tal como OOO (trioleína) y OOS. Los aceites de la invención contienen poco, si algo, TAGs trisaturado (por ejemplo, SSS, SSP, PPP, etc).

5 Los aceites de la invención contienen de aproximadamente 12% a aproximadamente 43% de grasa sólida a 10°C (por ejemplo, de aproximadamente 16% a aproximadamente 43%). Esta primera fracción de estearina tiene un contenido de grasa sólida de aproximadamente 20% a aproximadamente 25% a 10°C y menos de aproximadamente 1% a 21,1°C. La segunda fracción de estearina tiene un contenido de grasa sólida que está en el intervalo de aproximadamente 20% a aproximadamente 15% a temperaturas de aproximadamente 21% a aproximadamente 27%, respectivamente. La grasa sólida es un indicador de la grasa sólida presente en una escala de temperatura definida y se puede medir mediante un Índice de Grasas Sólidas (SFI) o mediante Contenido de Grasas Sólidas (SFC). SFC típicamente se mide mediante resonancia magnética nuclear pulsado (NMR). Ver, AOCS Official Method Cd 16b-93. SFI generalmente se mide mediante dilatometría y utiliza una serie de baños a temperatura controlada a 10, 21,1, 26,7, 33,3 y 40°C y dilatómetros de cristal para determinar el volumen de la muestra a cada temperatura. Ver, Bailey's Industrial, Oil & Food Products, Fifth Edition, John Wiley & Sons., Inc., Vol. 4, p. 403 (1996).

15 Composiciones de aceites.

La invención se caracteriza por un producto que incluye un componente graso, en el que el componente graso comprende un aceite de la invención. Como se usa en la presente memoria, un "componente graso" puede ser un aceite (líquido) o puede ser una grasa (sólido o semisólido). Los aceites de la invención se pueden usar para sustituir o ampliar una grasa tal como manteca de cacao en productos de confitería, por ejemplo, chocolate u otros productos alimentarios. Los aceites de la invención proporcionan utilidad en particular como sustitutos de manteca de cacao, al menos en parte debido al bajo contenido de poliinsaturados y el contenido particular de TAG en comparación con aceites vegetales conocidos.

25 Por ejemplo, los aceites de la invención pueden sustituir de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% (por ejemplo, de aproximadamente 10% a aproximadamente 100%) de la manteca de cacao en composiciones de confitería. Tales composiciones también pueden contener, por ejemplo, azúcares (por ejemplo, sacarosa, fructosa, glucosa, y maltosa), agua, saborizantes tales como polvo de cacao, licor de chocolate, masa de cacao, vainilla, sabores a frutos secos, y sabores a frutas, o sólidos de leche (sin grasa, desnatada o entera). Además, las composiciones pueden contener emulsionantes tales como lecitina, fosfolípidos sintéticos, y ésteres de sorbitán o para mejorar las propiedades reológicas o la cristalización. También se pueden incluir antioxidantes, fibras alimentarias, vitaminas, agentes espesantes o de volumen tales como povidona o almidón modificado, y sal.

Los productos de confitería se pueden preparar instantáneamente sustituyendo al menos una parte del componente de manteca de cacao de una formulación estándar por un aceite de la invención usando métodos estándar. Ver, por ejemplo, Minifie, B.W., Chocolate, Cocoa and Confectionery, 3rd Ed., Van Nostrand Reinhold, New York, 1989, pp 1-33; y Lees, R., A Course in Confectionery, 2nd Ed., Specialised Publications Ltd., Surrey, United Kingdom, 1980, pp. 98-106.

40 También se pueden usar los aceites de la invención para formular grasas sólidas, tales como pastas y mantecas para obtener el contenido deseado de grasa sólida de los productos. Las margarinas contienen al menos 80% de grasa, y típicamente se preparan a partir de base de caldo de aceite hidrogenado. Las margarinas pobres en *trans* que actualmente están disponibles típicamente contienen un aceite con un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados combinados con aceites de palma y babasu hidrogenados que se han interesterificado. Otras margarinas pobres en *trans* contienen aceites líquidos interesterificados que son ricos en contenido de ácido linoléico. Los aceites de la invención se pueden usar como la base para una barra de margarina que contiene al menos aproximadamente 80% de grasa o un bote de pasta blanda, que contiene menos de aproximadamente 80% de grasa. Un SFI objeto de una barra dura de margarina es, por ejemplo, 22-28 a 10°C, 16 a 21,1°C, y 2% a 33,3°C. Un SFI objeto para una pasta blanda es, por ejemplo, 11 a 10°C, 7 a 21,1°C, y 2 a 33,3°C.

Una margarina o una pasta formulada con un aceite de la invención también puede incluir agua, agentes espesantes tales como gelatina, pectina, carragenatos, agar, o almidón, producto de leche tales como suero seco por espray, conservantes, tales como sal, benzoato sódico, sorbato potásico, y ácido láctico, agentes saborizantes, emulsionantes, vitaminas, o agentes colorantes.

50 También se pueden producir mantecas con el contenido deseado de grasa sólida con aceites de la invención. Las mantecas para todos los usos pueden tener un contenido de grasa sólida tal alto como aproximadamente 35%, con un contenido medio de grasa sólida de aproximadamente 25% a 10°C. A la manteca formulada con un aceite de la invención también se puede añadir emulsionantes, agentes antiespumantes tal como dimetilpolisiloxano, antioxidantes tales como tert-butilhidroquinona, hidroxitolueno butilado, y hidroxianisol butilado, quelantes de metales tal como ácido cítrico, colorantes tales como carotenos, bixina, y apo-6-carotenal, y agentes saborizantes tal como acetil.

La invención se describirá más con los siguientes ejemplos, que no limitan el ámbito de la invención descrito en las reivindicaciones.

EJEMPLOS.

- 5 Ejemplo 1: creación de línea C1C de planta que es rica en ácido esteárico y pobre en poliinsaturados (ilustración de la solicitud). Este ejemplo describe la creación de una línea de planta de *Brassica napus* que produce semillas que tienen un contenido de ácido esteárico incrementado y un contenido de poliinsaturados disminuido. La alteración de la composición de ácidos grasos viene a partir de la introducción de tres transgenes diferentes y dos genes con mutación inducida químicamente en una única línea. El primer transgen contiene una secuencia que codifica oleil-ACP tioesterasa que confiere un contenido de ácido esteárico elevado cuando se sobreexpresa en una planta transgénica. El segundo transgen contiene una secuencia que codifica delta-9 ácido graso desaturasa que inhibe la actividad de delta-9 desaturasa por cosupresión. El tercer transgen contiene una secuencia que codifica delta-12 ácido graso desaturasa que inhibe la actividad de delta-12 desaturasa por antisentido. Una de las mutaciones en la línea de la planta es un gen *fad2*, que codifica una delta-12 ácido graso desaturasa. La segunda mutación presumiblemente reside en un gen *fad3*, que codifica una delta-15 ácido graso desaturasa. Estas mutaciones reducen o eliminan la actividad de delta-12 y delta-15 desaturasa en *B. napus* y se obtuvieron a partir de una línea IMC 130 de *B. napus*. Patente de EEUU número 5.767.338.
- 10
- 15 Se preparó un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica acil-ACP tioesterasa de soja, como se describe en la patente de EEUU número 5.530.186, unido a un promotor de faseolina y a una secuencia final poliA faseolina. El constructo se introdujo en una variedad de tipo canola (pobre en ácido erúxico) de *Brassica napus* mediante transformación mediada por *Agrobacterium*, usando un sistema de vector binario. El gen de tioesterasa mostró que tenía estabilidad heredada mediante análisis molecular y mostró que tenía actividad de
- 20 tioesterasa, en base al incremento de ácido esteárico y ácido palmítico en aceite de semillas de plantas transformadas. Después de autopolinizar para obtener homocigóticos la línea se designó 140-241.
- En una segunda transformación, se introdujo un gen delta-9 ácido graso desaturasa de soja, guiado por un promotor de napina y unido a un elemento extremo poliA napina, en una variedad de tipo canola de *Brassica napus* por transformación mediada por *Agrobacterium* como se describió anteriormente. Se identificaron las plantas transgénicas en las que el gen delta-9 desaturasa tenía estabilidad heredada mediante análisis molecular y en el que se inhibió la actividad desaturasa, en base al incremento de ácido esteárico en aceite de semillas de los transformantes. Después de autopolinizar para obtener homocigotos, la línea delta-9 desaturasa por cosupresión se designó 188-173.
- 25
- 30 Se llevó a cabo un cruce de 140-241 X 188-173 y la progenie que contenía ambos transgenes en condición homocigótica se identificó mediante el elevado contenido de ácido esteárico en semillas. El aceite de semillas de doble homocigoto contenía aproximadamente 7% de ácido palmítico, 25% de ácido esteárico, 35% de ácido oleico 8% de ácido α -linolénico y 3% de ácido araquidónico. Las líneas que contenían ambos transgenes en condición homocigótica seleccionadas para reproducción posterior se designaron 241-173.
- 35 Se llevó a cabo una tercera transformación en la que se unió una secuencia que codifica de longitud completa de un gen delta-12 ácido graso desaturasa de *B. napus* (gen D, WO 98/56239) en orientación antisentido a un promotor de napina y a un elemento extremo poliA napina. Se introdujo el constructor de ácido nucleico antisentido en una variedad de tipo canola de *Brassica napus* mediante transformación mediada por *Agrobacterium* como se describió anteriormente. Las plantas transgénicas en las que el gen delta-12 desaturasa tenía estabilidad genética se identificaron mediante análisis molecular y en las que se inhibió la actividad desaturasa. Después de polinizar para obtener homocigotos, una línea delta-12 desaturasa antisentido se designó 158-8. Se llevó a cabo un cruce de 158-8 X IMC 130 y se autopolinizó la progenie que tenía el constructo delta-12 desaturasa antisentido y se identificaron las mutaciones IMC 130 por el bajo contenido de ácido linoleico y α -linolénico en semillas. Una línea, designada 158-8-IMC 130, se seleccionó para reproducción posterior.
- 40
- 45 Se llevó a cabo un cruce de 241-173 X 158-8-IMC 130. Se identificó la progenie que contenía tanto los tres transgenes como ambos el *fad2* y supuestas mutaciones *fad3* en condición homocigótica. Se seleccionó una línea, designada C1C, para posterior análisis y reproducción. La composición de ácidos grasos del aceite de semilla C1C de la progenie F₅ se muestra en la tabla 1.

TABLA 1

Composición de ácidos grasos de plantas C1C

Planta ¹	16:0 ²	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1	Sat.
2433-01	8,4	25,5	47,4	7,7	5,2	3,6	0,5	0,9	0,0	0,3	0,2	38,7
2433-02	8,8	24,3	47,7	8,8	4,6	3,4	0,5	0,9	0,0	0,3	0,2	37,9
2433-03	8,4	25,7	46,6	8,5	4,8	3,7	0,5	1,0	0,0	0,3	0,2	39,1
2433-06	9,3	27,7	44,5	8,4	4,4	3,5	0,4	0,8	0,0	0,3	0,2	41,8
2433-07	8,5	26,5	46,8	7,9	4,0	3,8	0,4	1,0	0,0	0,3	0,3	40,2
2433-10	8,9	26,7	46,4	8,3	3,8	3,7	0,4	0,9	0,0	0,3	0,2	40,6
2433-13	9,0	26,2	46,3	8,0	4,0	3,8	0,4	1,0	0,2	0,3	0,4	40,4
2433-23	7,6	26,9	45,7	8,1	5,6	3,9	0,5	1,1	0,0	0,2	0,2	39,7
2433-26	8,1	26,8	45,9	7,8	5,3	3,8	0,5	1,0	0,0	0,3	0,2	40,0
2433-28	7,7	24,7	48,5	7,7	5,3	3,7	0,5	1,0	0,0	0,3	0,2	37,5

1 Muestra de semilla en lotes a partir de diez individuos F₅ de plantas C1C.

- 5 2 16:0 = ácido palmítico; 18:0 = ácido esteárico; 18:1 = ácido oleico; 18:2 = ácido linoleico; 18:3 = ácido α -linolénico; 20:0 = ácido araquidónico; 20:1 = ácido eicosenoico; 22:0 = ácido behénico; 22:1 = ácido erúcico; 24:0 = ácido lignocérico; 24:1 = ácido nervónico.

10 Ejemplo 2: (ilustración de la invención). Creación de una línea de planta LHS015-08 que es rica en ácido esteárico y pobre en poliinsaturados. Este ejemplo describe la creación de una línea de planta de *Brassica napus* que produce semillas que tienen un contenido de ácido esteárico incrementado y un contenido de poliinsaturados disminuido. Se usó la línea 241-173 X 158-8-IMC 130 del ejemplo 1, que tiene mutaciones y transgenes que causan sobreexpresión de oleil-ACP desaturasa e inhibición de delta-9 y delta-12 desaturasas, en combinación con modificaciones genéticas como se describió anteriormente.

15 Se llevó a cabo una transformación en la que un gen delta-9 ácido graso desaturasa de *B. napus*, guiado por un promotor de napina y unido a un elemento extremo poliA napina, se introdujo en una variedad de tipo canola de *Brassica napus* mediante transformación mediada por *Agrobacterium* como se describió anteriormente. Se identificaron las plantas transgénicas en las que el gen delta-9 desaturasa tenía estabilidad heredada mediante análisis Southern y en las que se suprimió la actividad desaturasa, en base a la disminución de ácido α -linolénico en aceite de semillas de transformantes. Después de autopolinizar se obtienen homocigotos, la línea delta-15 desaturasa por cosupresión se designó 663-40.

20 Se llevó a cabo un cruce de (241-173 X 158-8-IMC 130) X 663-40. Se identificó la progenie que contenía transgenes y mutaciones en condición homocigótica y que producía semillas que eran ricas en saturados y reducidas en poliinsaturados. Se seleccionó una línea y se designó LHS015-08. La composición de ácidos grasos del aceite extraído a partir de muestras de semillas en lotes de plantas LHS015-08 de las generaciones F₄ y F₅ se muestra en las tablas 8 y 9.

30 Como se muestra en los ejemplos 1 y 2, se puede lograr inhibición o reducción de la actividad de delta-12 y/o delta-15 desaturasa vía mutagénesis o a través del uso de un transgen, por ejemplo, por antisentido, ribosoma o cosupresión. Se considera que se puede lograr reducción o inhibición completa de la actividad de delta-9 desaturasa a través de mutagénesis, por ejemplo, mutagénesis química o física de semillas, seguido de selección del factor mutante deseado. Alternativamente, se considera que se puede lograr reducción o inhibición completa de la actividad de delta-9 desaturasa a través del uso de antisentido o transgenes de ribosomas.

Ejemplo 3: extracción y análisis de aceite C1C (ilustración de la solicitud). Para extraer aceite, las semillas producidas por las plantas se cocían y se prensaban con tornillo. Las pastas que se expelían de la prensa de tornillo después se extraían con disolvente usando una columna de calentamiento eléctrico de 4".

35 Se empleaba el siguiente procedimiento de cocido para extraer el aceite de las semillas de la línea C1C del ejemplo 1. Las semillas de la línea se colocaron en una lata de acero grande que contenían serpentinas de vapor (el diámetro interior de la lata era de aproximadamente 12"), y el vapor pasaba a través de las serpentinas para elevar la temperatura de las semillas. Las semillas se cocieron a 70°C durante 30 minutos y después se abrieron por rotura con una prensa de tornillo. Mientras que la mayoría del aceite de las semillas se liberaba pasándolas a través de una prensa de tornillo, la prensa de semilla prensada contenía algo de aceite residual. La humedad inicial de las semillas

para la variedad C1C era 4,5% en peso, y la humedad final de las semillas era 2,7% en peso (no se añadió agua antes del cocido).

5 Las tortas expelidas de la prensa de tornillo se sometieron a extracción con disolvente hexano en lotes. La extracción se llevó a cabo en una lata de aluminio grande (que tenía un diámetro interior de aproximadamente 10") añadiendo 500 gramos de semilla prensada a 1,5 litros de hexano y calentando la mezcla en un baño de vapor a 60°C mientras se agita vigorosamente durante 15 minutos. La mezcla de hexano y aceite se filtró y el hexano se evaporó. Después las tortas se mezclaron con hexano fresco, y el proceso se repitió hasta que se obtuvieron cantidades insignificantes de aceite (<10 gramos). El disolvente se evaporó de la mezcla, produciendo el aceite crudo.

10 El aceite crudo se desgomó añadiendo 0,15% (p/p) de ácido fosfórico concentrado al aceite. La mezcla de aceite-ácido se calentó a 60°C y se agitó rápidamente con un agitador mecánico durante 30 minutos. Después se añadió agua (1% p/p) y la mezcla se agitó durante otros 30 minutos. La goma se separó del aceite por centrifugación a 5.000 rpm durante 15 minutos.

15 El contenido de ácido graso libre del aceite desgomado se determinó por titulación. Se colocó isopropanol (20 ml) en un matraz Erlenmeyer, y se añadieron 2-3 gotas de una disolución 1% fenolftaleína/isopropanol. Se añadió gota a gota una disolución 0,1 N de hidróxido sódico en metanol agitando hasta que la disolución se volvió rosa. En este punto, se añadieron 10 g de aceite crudo, y el color rosa desapareció. Después la mezcla que contenía el aceite crudo se tituló con la base (hidróxido sódico 0,1 N) hasta que el color rosa reapareció y permaneció durante 30 segundos. Entonces el porcentaje de ácidos grasos libres (AALs) se calculó usando la siguiente fórmula:

20
$$\%AAL = (\text{ml titulados})(\text{normalidad de la base})(28,2) / \text{gramos de aceite crudo}$$

25 El aceite se refinó por calentamiento a 60°C y añadiendo suficiente de una disolución de 8% de hidróxido sódico para titular todo los ácidos grasos, más un exceso de 25%. La disolución de hidróxido sódico se añadió durante un periodo de 5 minutos mientras el aceite se mezclaba rápidamente con un agitador mecánico. Después de que se añadió la disolución, la mezcla se agitó durante 30 minutos adicionales. Los jabones se separaron del aceite centrifugando a 5.000 rpm durante 15 minutos.

30 El aceite desgomado se blanqueó del siguiente modo. Se añadió aproximadamente 0,15% Trisyl al aceite y se agitó al vacío durante 30 minutos a 60°C. El Trisyl se eliminó por filtrado y el aceite se calentó a 90°C en vacío. Se añadió una arcilla blanqueante (1,5% Clairion), y el aceite se agitó magnéticamente durante 30 minutos. La arcilla utilizada se eliminó por filtración al vacío y el aceite filtrado se transfirió a un recipiente de vidrio, se gaseó con argón, y se dejó enfriar. Como no había aceite suficiente para desodorización, el aceite blanqueado se colocó al vacío, en un reactor Parr, y se calentó a 500°F (260°C) durante aproximadamente 30 minutos.

Se pesaron las semillas C1C y aceites a lo largo del proceso de extracción y refino. Los resultados fueron los siguientes:

Peso semillas	850 gramos
Después de cocer y extraer el aceite	741 gramos
Aceite real recuperado (el aceite no estaba completamente libre de hexano)	313 gramos
AAL, mediciones con clorofila	4,09 gramos
Restos de aceite	309 gramos
Gomas	0,87 gramos
Jabón	2,47 gramos
Aceite usado para mediciones de AAL	2,01 gramos
Restos de aceite	276 gramos
Aceite después de Trisyl y blanqueo	260 gramos
Después de desodorización**	252 gramos

** calentado al vacío.

35 Las características del aceite C1C procesado, incluyendo el color y el porcentaje de ácidos grasos libres, se muestran en la tabla 2. El contenido de clorofila cruda se midió según el método oficial AOCS Cc Bd-55. Se midió el color Lovibond, una indicación de los componentes de color rojo (carotenoides) y amarillo (clorofila) de un aceite según el método oficial AOCS Cc Be-92 usando un colorímetro McCloskey (McCloskey Scientific Industries).

Tabla 2.

Características del aceite C1C.

Muestra	Clorofila cruda ppm	AAL crudo %	RB aceite Lovibond amarillo /rojo	RB aceite clorofila-a ppm	RBD aceite Lovibond amarillo/rojo	RBD aceite clorofila-b ppm
Aceite C1C	1,5	0,212	20,1/13,3	0	2,2/4	0

- 5 Se determinó la distribución de ácidos grasos según el método oficial AOCS Ce 1c-89. Se calcularon los valores de yodo a partir de FAD según el método AOCS Cd 1c-85. Como muestra la tabla 3, el aceite C1C contenía niveles altos de ácido esteárico (aproximadamente 20%).

Tabla 3.

Composición de ácidos grasos del aceite C1C.

Tipo	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0	22:1	24:0	24:1	IV
Aceite C1C	7,79	0,4	19,75	54,29	7,88	4,78	3,06	0,85	---	0,27	0,15	73,56

- 10 El aceite C1C se caracterizó más mediante la medición del índice de refracción (IR), punto de fusión, contenido de tocoferol, estabilidad oxidativa, metales, contenido de azufre, valor peróxido, y punto de goteo de Mettler.

- 15 El IR se midió a 21°C con un refractómetro ABBE Mark II (Reichert Scientific Instruments, Buffalo, NY). El punto de fusión se midió con DSC en un colorímetro diferencial de barrido Perkin Elmer Model 7. Se colocaron muestras de 7-12 mg en las placas de muestra, se sellaron y se cargaron en el cargador de muestras. Las muestras se enfriaron de la temperatura inicial de 50°C a la temperatura final de -30°C a una velocidad de 5°C. Después de estabilizar a -30°C durante 15 minutos, se registró un escáner DSC final de -30°C a 50°C a una velocidad de 5°C por minuto. Se tomó el punto de fusión de las muestras a partir del perfil DSC en el punto donde se fundió el 98% del material.

- 20 Se midió el contenido de tocoferol según el método oficial AOCS Ce 7-87. Se midió el contenido de fósforo mediante el método oficial AOCS Ca 12-55(93). Se midió la estabilidad oxidativa usando un instrumento Oxidative Stability Index, Omnion, Inc., Rockland, MA, según el método oficial AOCS Cd 12b-92 (revisado en 1993). Este método es un sustituto automático del procedimiento del método del oxígeno activo (AOM), método oficial AOCS Cd 12-57. La estabilidad se midió en horas AOM.

- 25 Se midió el contenido de metal según el método oficial AOCS Ca 18-79 usando espectrometría de absorción atómica con un horno de grafito. El cobre y hierro se midió en partes por millón (ppm). El azufre se detectó mediante el método oficial AOCS Ca 8a-35 (90).

- Se midió el valor de peróxido (PV) según el método oficial Cd 8-53 usando isooctano en lugar de cloroformo. Pv mide la cantidad de oxidación primaria de aceite. Se midió el punto de goteo Mettler, la temperatura mínima a la que fluye el aceite a través de un orificio definido, según el método oficial AOCS Cc 18-80.

- 30 Como se muestra en la tabla 4, el nivel de fósforo en aceite C1C era elevado, lo que sugiere que el proceso de blanqueo descrito anteriormente fue por debajo de óptimo. Idealmente, posniveles de fósforo deberían ser <3 ppm. El proceso de blanqueo se puede alterar instantáneamente para ajustar el nivel de fósforo.

Tabla 4.

Análisis de aceite procesado.

Tipo	R1	Punto de fusión (DSC)	Tocoferol ppm	AOM horas	Cu ppm	Fe ppm	Fósforo ppm	Azufre ppm	Valor de peróxido meq/kg	Punto de goteo Mettler
Aceite C1C	1,47	5,3, 24*	600	27,99	<0,05	0,33	6,84	<0,50	2,45	20,5°C

*después de un periodo de almacenamiento en frío.

Ejemplo 4: alteración del punto de fusión (ilustración de la solicitud).

- 5 Las temperaturas de fusión y los perfiles de fusión de los aceites de la invención tienen interés particular. Después de refinar y blanquear el aceite endógeno, el aceite C1C tenía un punto de fusión de 9,96°C. Sin embargo, después de que el aceite se incubó a 6°C durante 2 meses, el perfil DSD reveló un cambio del punto de fusión a 27°C. Esto sugiere que el aceite se transformó a una forma de cristal (polimórfico) que tenía un punto de fusión alto.
- 10 Se llevaron a cabo experimentos adicionales para examinar los cambios en el punto de fusión, que tenían lugar cuando el aceite se almacenaba a temperaturas frías. El aceite C1C (almacenado a 6°C durante dos meses) se sacó del almacén frío y se cargó rápidamente en el DSC. Se tuvo mucho cuidado en evitar que el material se fundiera durante la preparación DSC. La muestra se enfrió a 0°C y después se llevó a 60°C a una velocidad de 5°C/minuto. Como muestra la figura 1, línea 1, el material fundió entre 25°C y 28°C. En el momento en que la muestra alcanzó 60°C, la memoria estructural se había borrado completamente. En este punto. El aceite se enfrió a -30°C y se calentó de nuevo a 60°C. Después del calentamiento por segunda vez, la mayoría del aceite se fundió entre -20°C y 5°C.
- 15 Esto indica que el aceite ya no estaba en la forma de cristal de punto de fusión más alto. El aceite se enfrió de nuevo a 0°C, después se calentó a 10°C y se mantuvo 1 hora. El aceite después se enfrió a 0°C y se calentó de nuevo a 60°C. El perfil DSC indicó que mantener el aceite a 10°C durante una hora no permitía al aceite cristalizar en la forma con la temperatura de fusión más alta (figura 1, línea 3). El procedimiento se repitió, excepto que el aceite se incubó a 10°C durante 15 horas. Cuando se tomó el perfil DSC otra vez, la temperatura de fusión y la entalpía de fusión eran significativamente más altas mientras el aceite fundía entre 10°C y 25°C (figura 1, línea 2).
- 20 Se ideó un esquema de fraccionamiento en base a los resultados de los estudios DSC. Se incubó una jarra sellada que contenía 73,75 gramos de aceite C1C en un baño de agua circulante (Fisher Isotemp, Model 190) durante 15 horas a 10°C. Se elevó la temperatura a 16°C y se continuó la incubación durante 24 horas adicionales. El aceite se fraccionó por centrifugación (10.000 rpm durante 20 minutos a 16°C) para producir aproximadamente 41,37 gramos de estearina n°1 (rendimiento 56%) y aproximadamente 23,26 gramos de oleína n°1 (rendimiento 31,5%).
- 25 Después de fundirse la estearina n°1 y dejarse reposar a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C), el aceite lentamente experimentó una segunda cristalización. Durante un periodo de un mes, la cristalización produjo pequeñas partículas esféricas (1-2 mm de diámetro), y no parecía atrapar mucha oleína. Las distintas fases sólida y líquida eran fácilmente separables por decantación en fracciones de oleína n°2 y estearina n°2. El esquema de fraccionamiento se muestra en la figura 2. La composición de ácidos grasos se muestra en la figura 2. En la tabla 5 se muestra la composición de ácidos grasos del aceite parental y las fracciones de estearina y oleína.
- 30

Tabla 5.

Composición de ácidos grasos de las fracciones de aceite C1C.

Tipo	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	22:0	22:1	24:0	24:1	IV	MP
C1C	7,79	0,4	19,75	54,29	7,88	4,78	3,06	0,85	---	0,27	0,15	73,56	28
Estearina nº1	7,92	0,33	22,01	52,31	7,36	4,36	3,38	0,9	0,01	0,29	0,13	69,77	29,65
Oleína nº1	7,33	0,41	16,27	57,42	8,43	5,08	2,72	0,75	0,01	0,26	0,14	78,09	3,38
Estearina nº2	7,84	0,3	26,39	48,84	6,5	3,84	3,91	1,01	0,01	0,3	0,11	63,9	36,9
Oleína nº2	8,02	0,4	17,97	55,1	8,2	4,86	3,01	0,84	0,01	0,27	0,14	75,19	4,59

- 5 La diferencia mayor en composición de ácidos grasos entre estearina nº2 y oleína nº2 se ve con el contenido de ácidos grasos C18:0 y C18:1. La fracción de oleína contiene 6% menos en C18:0 y 5% más en C18:1. Sin embargo, la temperatura de fusión entre las dos fracciones era muy diferente. La fracción de estearina tiene un punto de fusión de aproximadamente 27,7°C, mientras que la fracción de oleína tiene un punto de fusión de aproximadamente 3°C. La gran diferencia en la temperatura de fusión está en coherencia con un mecanismo en el que la estructura TAG tiene un papel significativo en la determinación de la temperatura de fusión y contenido de grasa sólida.
- 10 Se llevó a cabo análisis TAG en el aceite C1C y cuatro subfracciones (oleína nº1, estearina nº1, oleína nº2, y estearina nº2). Los resultados se muestran en la tabla 6 (ND = sin determinar en la tabla 6). El ácido linoléico y ácido linoleico están abreviados como "Ln" y "L", respectivamente. Como se muestra en la tabla 6, POP, POS y SOS suponen aproximadamente 19% del TAG de la fracción de estearina nº1. En la fracción de estearina nº2, POP, POS y SOS suponen aproximadamente 31% del TAG. En la tabla 7 se muestra el contenido de grasa sólida para C1C y las fracciones de estearina C1C.
- 15

Tabla 6.

Análisis TAG de C1C y subfracciones.

TAG	C1C	C1C oleína nº1	C1C estearina nº1	C1C oleína nº2	C1C estearina nº2
LnOO	2,72	2,96	2,3	3,43	2,21
LLP	1,76	1,93	1,7	1,94	ND
LnOP	0,86	ND	ND	2,46	ND
LOO	4,52	4,91	4,17	6,86	3,81
LOP	6,43	7,44	5,79	9,79	5,19
PLP	1,54	1,38	1,41	2,04	2,13
OOO	14,67	15,27	13,1	20,06	11,83
LOS	6,33	8,29	6,29	9,85	5,0
POO	12,54	10,75	9,43	15,25	8,25
POP	1,55	1,38	2,11	2,3	2,4
PLs	1,25	1,17	ND	ND	ND
SLnS	1,14	ND	1,12	ND	ND
OOS	24,68	29,97	23,33	9,57	26,32

ES 2 378 108 T3

SLS	1,02	ND	ND	6,03	3,17
POS	4,41	2,83	6,11	6,06	7,88
OOA	3,44	3,81	3,32	6,01	2,1
SPP	0,9	ND	ND	2,0	ND
SOS	6,77	2,06	10,75	6,16	20,9
SSS	0,93	trazas	trazas	trazas	Trazas

Tabla 7.

Contenido de grasa sólida para C1C y fracciones de estearina.

Temp °C	C1C	C1C estearina n°1	C1C estearina n°2
10	16,6%	24,5%	42,8%
21,1	0,1%	0,8%	20,5%
26,7	0%	0%	13,9%
33,3	0%	0%	0,8%
40	0%	0%	0%

- 5 Ejemplo 5: aceite rico en esteárico (ilustración de la solicitud). Se extrajo el aceite a partir de muestras de semillas en lotes de plantas LHS015-08 del ejemplo 2. La composición de ácidos grasos se muestra en las tablas 8 y 9.

Tabla 8.

Composición de ácidos grasos en semillas de una planta F₄ LHS015-08.

16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0	24:1	Sat.
7,8	24,8	53,8	4,8	1,4	4,6	0,5	1,3	0,0	0,4	0,2	>38,5

10

Tabla 9.

Composición de ácidos grasos de semillas¹ LHS015-08.

Ácido graso	Parte 1	Parte 2	Media
C16:0	7,5	7,4	7,4
C16:1	0,4	0,4	0,4
C18:0	17,6	19,2	18,4
C18:1	63,8	62,1	62,9
C18:2	4,3	4,3	4,3
C18:3	1,1	1,1	1,1
C20:0	3,0	3,1	3,1
C20:1	0,6	0,6	0,6
C20:2	0,0	0,0	0,0

C22:0	0,9	0,9	0,9
C22:1	0,0	0,0	0,0
C24:0	0,2	0,2	0,2
C24:1	0,4	0,6	0,5
Sat.	>28,9	>30,6	>29,8

1 Muestras de semillas en lotes unidas de cada una de las dos partes diferentes de plantas F₅.

5 Las semillas de las partes 1 y 2 (tabla 9) se unieron, y se extrajo el aceite. La tabla 10 proporciona la composición de ácidos grasos del aceite (LHS015-08) extraído de las semillas unidas. El nivel de ácidos grasos poliinsaturados en este aceite (5,10%) era más bajo que el contenido de poliinsaturados del aceite C1C (tabla 3, 12,66%). Las pruebas de tocoferol y estabilidad oxidativa indican que este aceite también tenía menos tocoferol que el aceite C1C y tenía estabilidad oxidativa más alta (tabla 11). El incremento de la estabilidad oxidativa se cree que es debido a la reducción de ácidos grasos poliinsaturados.

Tabla 10.

10 Composición de ácidos grasos de aceite F₅LHS01508.

16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	IV	Sat	Mono	Poli
4,78	18,12	63,21	4,08	0,99	64,82	30,33	64,32	5,10

Tabla 11.

Contenido de tocoferol y estabilidad oxidativa de aceites ricos en esteárico.

Aceite	Tocoferol (ppm)	AOM n°1	AOM n°2	Media AOM
C1C	600	23	---	23
LHS015-08	420	106	102	104

15 La adición de 200 ppm del antioxidante TBHQ dio como resultado un incremento de aproximadamente 70% de estabilidad oxidativa (tabla 12).

Tabla 12.

Estabilidad oxidativa de aceites ricos en esteárico con TBHQ.

Aceite	AOM n°1	AOM n°2	Media AOM
LHS015-08 + TBHQ	172	171	171,5

20 El aceite F₅ LHS015-08 cristalizó y se fraccionó en porciones de estearina y oleína. Se vertieron aproximadamente 329 gramos del aceite en un contenedor centrífugo y se colocó en un refrigerador durante la noche (5°C). Después el contenedor se transfirió a un baño de agua (7°C) y se mantuvo durante 24 horas. La temperatura del baño de agua se elevó a 15°C y se mantuvo durante 24 horas, después se centrifugó a 8.000 ppm durante 20 minutos, en una centrífuga preenfriada mantenida a 15°C. Las fracciones se separaron por succión, dando 221,54 gramos de estearina (rendimiento 67%) y 107,68 gramos de oleína (rendimiento 33%). El contenido de ácido graso del aceite sin fraccionar, y de las fracciones de estearina y oleína se muestran en la tabla 13.

25

Tabla 13.

Composición de ácidos grasos de aceite F₅ LHS015-08 y fracciones de estearina y oleína.

Aceite	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	IV	Sat	Mono	Poli
Sin fraccionar	4,78	18,12	63,21	4,08	0,99	64,82	30,33	64,32	5,10
Estearina	7,76	19,83	61,24	3,91	0,97	62,73	32,57	62,28	4,89
Oleína	7,07	14,31	67,38	4,56	1,15	69,81	25,36	68,61	5,77

- 5 Se llevó a cabo DSC con el aceite F₅ LHS015-08 sin fraccionar y las fracciones de estearina y oleína, como se describió en el ejemplo 4. La muestra etiquetada "después de incubación" se calentó de 20°C a 75°C a una velocidad de 40°C por minuto y se mantuvo a 75°C durante 10 minutos, después se enfrió a -20°C a una velocidad de 5°C por minuto y se mantuvo a -20°C durante 30 minutos. Después la muestra se calentó a 7°C a una velocidad de 1°C por minuto y se mantuvo a 7°C durante 12 horas. Después de esta incubación, la muestra se enfrió a -10°C a una velocidad de 1°C por minuto y se mantuvo a -10°C durante 10 minutos, finalmente después se calentó a 75°C a una velocidad de 1°C por minuto. El aceite F₅ LHS015-08 tenía un punto de fusión de 15,5°C y empezó a cristalizar a 3°C, mientras que la muestra que se incubó tenía un punto de fusión más alto (25°C). La fracción de estearina de F₅ LHS015-08 tenía un punto de fusión de 29,3°C y comenzó a cristalizar a 5,7°C.

Tabla 14.

Datos DSC.

Aceite	Punto de fusión °C	Comienzo de cristalización °C	ΔH (i/g)
F ₅ LHS015-08	15,5	3,0	70,9
F ₅ LHS015-08 después de incubación	24,61	2,9	71,1
Fracción de estearina	29,3	5,7	72,7
Fracción de oleína	7,5	-2,0	66,7

- 20 Se analizaron los perfiles TAG del aceite F₅ LHS015-08 (sin fraccionar) y las fracciones de estearina y oleína mediante HPLC, como se describió en el ejemplo 4, y se indican en la tabla 15. Ácido linolénico, ácido linoleico, ácido araquidónico (C20:0), y ácido behénico (C22:0) se abreviaron como "Ln", "L", "A", y "B", respectivamente. Los análisis TAG indicaron que SOS y POS estaban concentrados en la parte de estearina durante el fraccionamiento. Como se muestra en la tabla 15, POP, POS, y SOS componen aproximadamente 15,5% de los TAGs en la fracción de esterarían.

Tabla 15.

Perfil TAG de F₅ LHS015-08 (HPLC).

TAG	Sin fraccionar	Estearina	Oleína
OLnO	0,21	0,25	0,27
OLO	1,53	1,43	1,85
PLO	1,08	0,93	1,17
OOO	26,63	25,27	30,11
SLO	2,92	2,74	2,85
POO	12,98	12,00	14,56
POP	1,02	1,00	0,80

SOO	38,42	36,03	41,43
POS	3,23	4,36	1,17
OOA	3,42	3,13	3,60
SOS	6,34	10,09	0,97
OOB	0,57	0,49	0,53
SOA	0,87	1,41	0,15
SOB	0,17	0,33	0,03

5 Se determinó el contenido de grasa sólida del aceite F₅ LHS015-08 y su fracción de estearina, así como la fracción de estearina con 2% de estearina de soja añadida (tabla 16). Como valores de referencia se proporciona el contenido de grasa sólida de una margarina blanda en bote y de barra. Después del periodo de atemperado descrito por el perfil DSC, el aceite F₅ LHS015-08 era sólido a temperatura ambiente. Este comportamiento mejorado de la grasa sólida se cree que es debido a un incremento en TAGs tal como SOS y POS, lo que contribuye a elevar la temperatura de fusión de la red cristalina. Como se indica en la tabla 16, el contenido de grasa sólida de la fracción de estearina de F₅ LHS015-08 era mayor que el aceite sin fraccionar y era comparable al de la margarina de barra. La adición de 2% de estearina de soja incrementó más el contenido de grasa sólida.

10

Tabla 16.

Contenido de grasa sólida del aceite F₅ LHS015-08 y sus fracciones.

Muestra	10,0°C	21,1°C	26,7°C	33,3°C	37,8°C	40,0°C
LHS015-08	12,48	0	0	0	0	0
Estearina	21,42	0,88	0	0	0	0
Estearina + 2% estearina de soja	25,16	7,24	3,93	2,09	0,98	1,17
Margarina blanda de bote	8-12	4-7		1-3		
Margarina de barra	22-25	13-16		2-4		

Otras realizaciones.

15 Se entiende que mientras la invención se ha descrito junto con su descripción detallada, la descripción precedente pretende ilustrar y no limitar el ámbito de la invención, que se define por el ámbito de las reivindicaciones precedentes.

REIVINDICACIONES

1. Un aceite extraído de semillas de canola, maíz o girasol que tiene un contenido de ácido esteárico de 17% a 28% y un contenido de ácido graso poliinsaturado de 2% a 6%.
- 5 2. El aceite de la reivindicación 1, en el que dicho aceite tiene un contenido de ácido α -linolénico de 0,6% a 2,0%.
3. El aceite de la reivindicación 1 ó 2, dicho aceite tiene además un contenido de ácido palmítico de 6% a 20%.
4. El aceite de la reivindicación 3, donde el contenido de ácido palmítico es de 7% a 19%.
- 10 5. El aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho aceite tiene un valor de yodo menor que 76.
6. El aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el contenido de ácido oleico es de 34% a 53%.
- 15 7. El aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho aceite tiene un punto de fusión DSC de 4°C a 20°C en ausencia de cristalización por almacenamiento en frío y un punto de fusión DSC de 24°C a 40°C después de cristalización por almacenamiento en frío.
8. El aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho aceite es aceite de canola.
9. El aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho aceite es aceite de girasol.
10. El aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho aceite es aceite de maíz.
- 20 11. El aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que al menos 15% de los triacilglicérols de dicho aceite comprenden un resto de oleato en la posición sn-2 y restos de palmitato o estearato en las posiciones sn-1 y sn-3.
12. El aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que al menos 30% de los triacilglicérols de dicho aceite comprenden un resto de oleato en la posición sn-2 y restos de palmitato o estearato en las posiciones sn-1 y sn-3.
- 25 13. El aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 como un aceite vegetal en un producto de confitería.
14. El aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 como un aceite vegetal en un producto de grasa sólida.
15. El aceite de la reivindicación 14, en el que dicho producto es una margarina.
16. El aceite de la reivindicación 15, en el que dicha margarina es una margarina de barra o una margarina blanda de bote.
- 30 17. El aceite de la reivindicación 15, en el que dicha margarina además comprende agua, un agente espesante, un producto de leche, un conservante, un agente saborizante, un emulsionante, una vitamina, o un agente colorante.
18. El aceite de la reivindicación 17, en el que dicho agente espesante es gelatina, pectina, carragenato, agar, o almidón.
19. El aceite de la reivindicación 17, en el que dicho producto de leche es suero seco por spray.
- 35 20. El aceite de la reivindicación 17, en el que dicho conservante es sal, benzoato sódico, sorbato potásico, o ácido láctico.
21. El aceite de la reivindicación 14, en el que dicho producto es una manteca.
22. El aceite de la reivindicación 21, en el que dicha manteca además comprende un emulsionante, un agente antiespumante, un antioxidante, un quelante de metales, un colorante, o un agente saborizante.
- 40 23. El aceite de la reivindicación 22, en el que dicho antioxidante es tert-butilhidroquinona, hidroxitolueno butilado, o hidroxianisol butilado.
24. El aceite de la reivindicación 22, en el que dicho agente saborizante es diacetilo.
25. El aceite de la reivindicación 22, en el que dicho colorante es un caroteno, bixina, o apo-6-carotenal.
26. Un método para producir un aceite vegetal, que comprende:

- a) moler semillas producidas por canola, maíz o girasol, dichas semillas tienen un contenido de ácido esteárico de 17% a 28% y un contenido de ácidos grasos poliinsaturados de 2% a 6%; y
- b) extraer un aceite endógeno a partir de las semillas molidas.
27. El método de la reivindicación 26, en el que dicha planta es una planta de *Brassica*.
- 5 28. El método de la reivindicación 27, en el que dicha planta de *Brassica* muestra actividad reducida de delta-9 desaturasa y actividad reducida de delta-12 desaturasa, y actividad incrementada de esteroil acil-ACP tioesterasa.
29. El método de la reivindicación 28, en el que dicha planta de *Brassica* además muestra una actividad reducida de delta-15 desaturasa.
- 10 30. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 26 a 29, en el que dicho aceite tiene un contenido de ácido palmítico de 6% a 20%.
31. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 26 a 30, que además comprende la etapa de fraccionar dicho aceite endógeno en una fracción de estearina y una fracción de oleína.
32. El método de la reivindicación 31, en el que dicha fracción de estearina tiene un contenido de ácido esteárico de 20% a 30% y un contenido de ácido oleico de 46% a 53%.

15

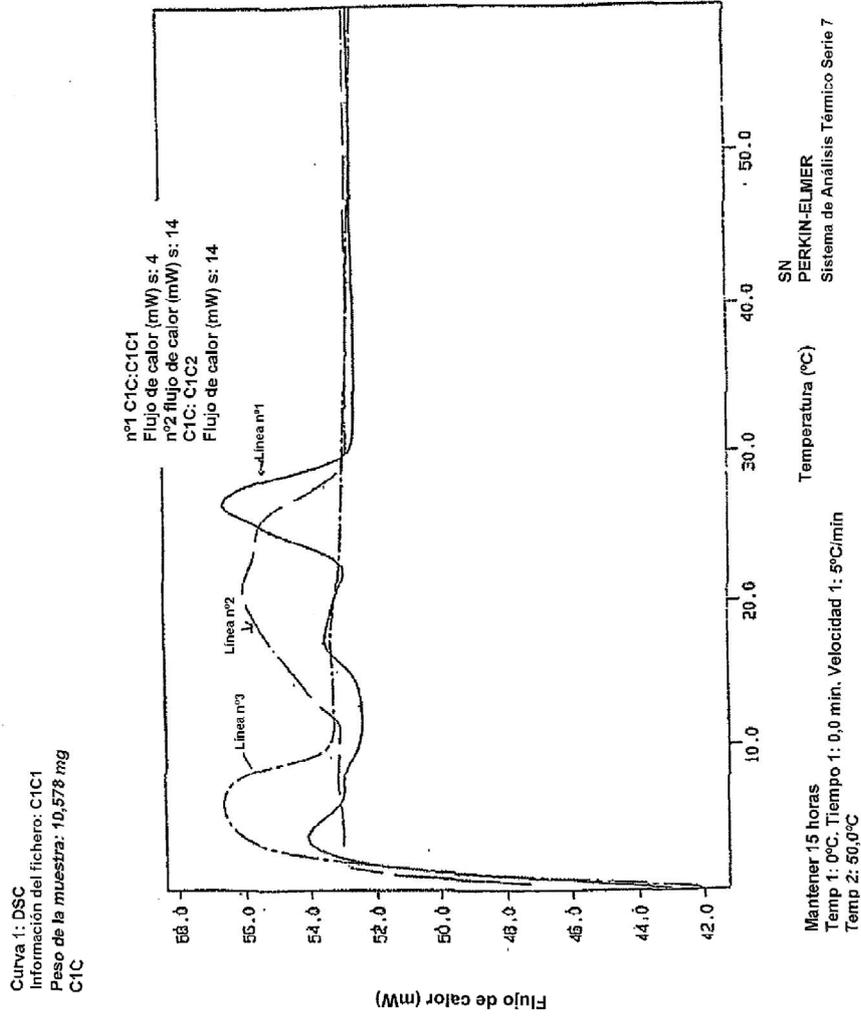


FIG. 1

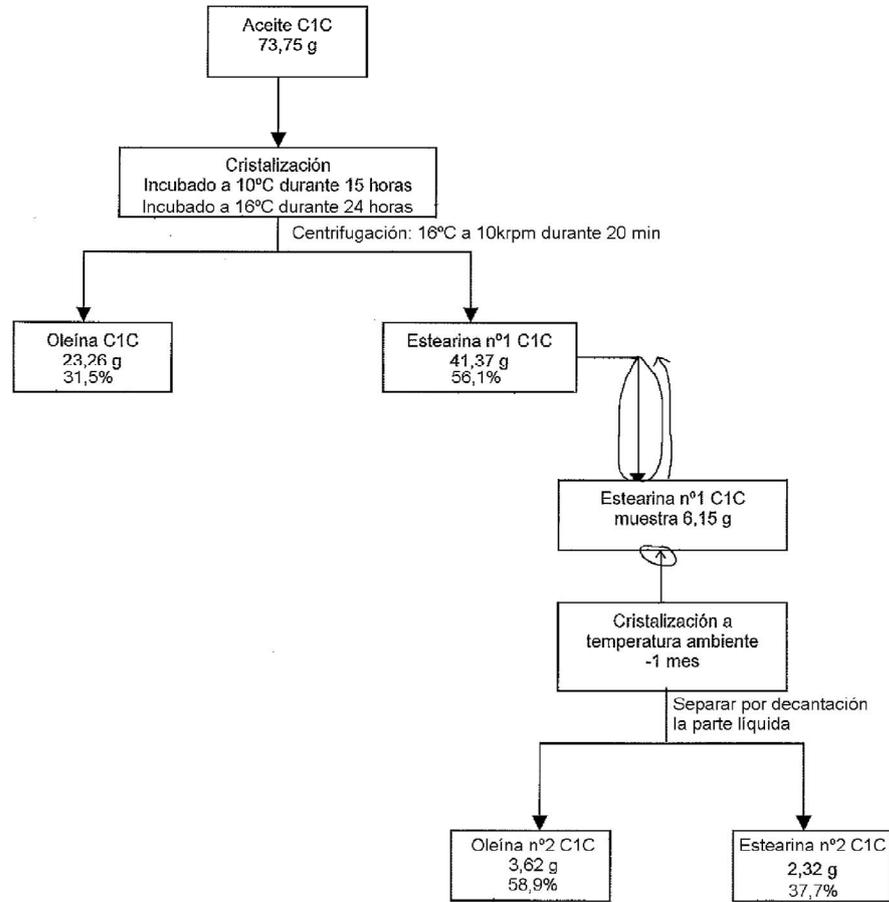


FIG. 2