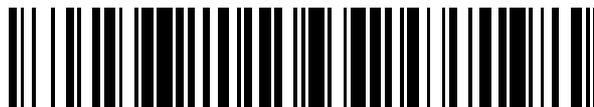


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 953**

21 Número de solicitud: 201531699

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

23.11.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.02.2016

Fecha de la concesión:

11.11.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.11.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITAT DE LLEIDA (45.8%)

Pl. Víctor Siurana 1

25003 Lleida (Lleida) ES;

**CENTRE DE RECERCA EN AGROTECNOLOGIA-
AGROTECNIO (45.8%) y**

**INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS
AVANÇATS (ICREA) (8.3%)**

72 Inventor/es:

MORENO MARTÍNEZ, José Antonio ;

NOGAREDA BURCH, Carmen;

ANGULO ASENSIO, Eduardo ;

CHRISTOU, Paul;

ZHU, Changfu y

CAPELL, Teresa

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Maíz enriquecido en antioxidantes para mejorar la calidad nutricional del huevo**

57 Resumen:

Maíz enriquecido en antioxidantes para mejorar la calidad nutricional del huevo.

La presente invención se relaciona con una composición nutritiva o nutracéutico que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma y con los usos de dicha composición para la obtención de huevos enriquecidos en antioxidantes. La invención también se relaciona con el uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para la obtención de huevos enriquecidos en antioxidantes. La invención se relaciona también con un huevo y ovoproductos derivados de dicho huevo obtenidos según los usos de la invención.

ES 2 558 953 B1

DESCRIPCIÓN

MAIZ ENRIQUECIDO EN ANTIOXIDANTES PARA MEJORAR LA CALIDAD NUTRICIONAL DEL HUEVO

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se encuadra en el campo de la tecnología de alimentos y particularmente en el desarrollo de nuevos maíces y la mejora de la calidad nutricional del huevo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Los pigmentos carotenoides son compuestos responsables de la coloración de gran número de alimentos vegetales y animales, como zanahorias, naranjas, tomates, salmón y yema de huevo. Desde hace muchos años se sabe que algunos de estos compuestos como α y β - caroteno, así como la β criptoxantina, son provitaminas A. No obstante, estudios recientes han puesto de manifiesto las propiedades antioxidantes de estos
- 15 pigmentos, así como su eficacia en la prevención de ciertas enfermedades del ser humano, como la aterosclerosis o incluso el cáncer. Por otro lado, las observaciones epidemiológicas parecen indicar que el consumo de alimentos ricos en carotenoides está relacionado con un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas.

- Se ha comprobado que los carotenoides potencian tanto las funciones inmunológicas
- 20 específicas como las no específicas. Diversas reacciones de modulación inmunológicas pueden aumentar la actividad tumoricida de las células T citotóxicas, los macrófagos y/o las células asesinas naturales y fomentar las funciones antimicrobianas inmunológicas. Por ejemplo, el beta-caroteno puede reducir la incidencia de sucesos cardiovasculares, habiéndose demostrado en estudios clínicos. Adicionalmente los grupos de población que
- 25 consumen alimentos ricos en beta-caroteno están más protegidos contra los cánceres de piel y pulmón, particularmente los fumadores. Se han propuesto varios mecanismos para explicar la actividad fisiológica de los carotenoides. La más plausible se basa en el fuerte carácter antioxidante y en su capacidad para desactivar sustancias químicas perjudiciales como el oxígeno singlete, los radicales libres y los radicales peróxido lipídicos. También

hay evidencia de que varios carotenoides producen una estimulación directa del sistema inmunológico y de la respuesta inmunológica.

Todo ello ha hecho que desde un punto de vista nutricional, el interés por estos pigmentos se haya incrementado notoriamente.

- 5 El consumo de huevos de ave y muy especialmente de gallina (92% del total mundial, FAO 2012) está extendido en todo el mundo, siendo un elemento esencial en la dieta de muchas personas representando un aporte de carotenoides importante. Durante el año 2012, se consumieron en todo el mundo casi 72 MT de huevo, de ellos más de 66 MT eran de huevo de gallina (FAO, 2012). Los consumidores aprecian un color elevado en la
10 gama amarillo-naranja en la yema del huevo, considerando esta característica como determinante en el momento de la compra y como reflejo de la calidad de los huevos.

- La utilización de carotenoides en avicultura va más allá de sus propiedades pigmentantes de la yema del huevo y la piel y patas de los pollos. A parte del efecto pigmentante estos carotenoides también cumplen una serie de funciones importantes en el animal. Así se
15 conocen sus efectos antioxidantes, estimuladores del sistema inmunitario y sobre la mejora de los parámetros productivos de las aves, especialmente en la eficacia reproductiva y la obtención de pollitos viables, así como actuando como precursores de la vitamina A.

- Las gallinas pueden depositar carotenoides en la yema del huevo y son estos
20 carotenoides los que le darán el color típico. Puesto que las gallinas no pueden sintetizar estas moléculas, es obligado que sean aportadas por la dieta, fundamentalmente por el maíz, la alfalfa y otros vegetales verdes.

- La composición de las diferentes dietas que habitualmente se suministran a las gallinas, aunque incluyan materias primas ricas en carotenoides, no logran una concentración
25 suficiente en la yema para satisfacer las exigencias del consumidor, siendo necesario añadirlos en forma de aditivos, que se obtienen por extracción a partir de los pétalos de la flor de marigold (*Tagetes erecta*), o bien a partir de síntesis química.

Sin embargo estas fuentes de carotenoides presentan desventajas, ya que los carotenoides de maíz son más biodisponibles que los de *Tagetes erecta* y la síntesis

química de carotenoides requiere un gran nivel de control y puede producir compuestos con efectos indeseables y que pueden ser alérgenos en ciertos consumidores.

Por tanto, como alternativa se tratan de identificar otras fuentes de carotenoides como los pigmentos obtenidos a partir de biomasa de levadura *Phaffia rhodozyma*, del alga
5 *Haematococcus pluvialis*, *Chlorococcum* sp o de bacteria *Dietzia natronolimnacea* (Esfahani-mashhopur M. et al., Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol. 22, No. 2: 254 – 259). Sin embargo existen pocos microorganismos capaces de satisfacer las demandas.

El suplemento del alimento de gallinas ponedoras con distintas variedades de zanahorias consigue incrementar el contenido en carotenoides del huevo, sin embargo se reduce la
10 ingesta en las gallinas lo que da lugar a que el peso de los huevos obtenidos y de la yema disminuye al suplementar con cualquiera de las variedades ensayadas e incluso se reduce la tasa de puesta (Hammershoj M. et al., J Sci Food Agric 2010; 90: 1163–1171).

Por tanto, existe la necesidad de encontrar alternativas para la obtención huevos con una mejor calidad nutricional y particularmente enriquecerlos en antioxidantes.

15 **COMPENDIO DE LA INVENCIÓN**

En un primer aspecto la invención se relaciona con una composición nutritiva o nutracéutico que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma.

20 En un segundo aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición nutritiva o nutracéutico de la invención para la obtención de huevos enriquecidos en antioxidantes.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con el uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para la obtención de huevos
25 enriquecidos en antioxidantes.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con un huevo y ovoproductos derivados de dicho huevo obtenidos según los usos de la invención.

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1. Carotenoides en el pienso en $\mu\text{g/g}$ de pienso (5 determinaciones).

Figura 2. Carotenoides en la yema de los huevos a los 31 días del experimento. Los valores son la media \pm error estándar de 5 muestras *C427 es β -cryptoxantina-5,8-epóxido.

5 **Figura 3.** Carotenoides en hígado de gallina al final del experimento. Los valores son la media \pm error estándar de 5 muestras. *C450 es β -caroteno-5,6-epóxido or β -carotene-5,6,5',6'-diepóxido. M37W-Ph3 es la línea enriquecida en antioxidantes.

Figura 4. Carotenoides en hígado de gallina al final del experimento sin retinol para poder observar los demás valores en otra escala. *C450 principalmente β -carotene-5,6-epóxido
10 o β -carotene-5,6,5',6'-diepóxido.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los autores de la presente invención han conseguido mejorar la calidad nutricional del huevo alimentando las gallinas con variedades de maíz enriquecidas en antioxidantes (Ejemplo 1).

15

Definiciones

El término "composición nutritiva" de la presente invención se refiere a aquel alimento que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta
20 beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar. Como consecuencia, dicha composición nutritiva puede ser destinada a la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o del factor causante de una enfermedad. Por tanto, el término "composición nutritiva" de la presente invención se puede emplear como sinónimo de alimento funcional o alimento para fines
25 nutricionales específicos o alimento medicinal. Una composición nutritiva tiene una apariencia similar a la de un alimento convencional y se consume como parte de una dieta normal.

Por "nutracéutico", palabra derivada de nutrición y farmacéutico, se entiende un producto
30 elaborado a partir de un alimento, pero que se encuentra a modo de ejemplo ilustrativo no

limitativo, en forma de píldora, polvos y otras presentaciones farmacéuticas no asociadas generalmente con los alimentos y que presenta propiedades beneficiosas para el tratamiento y/o prevención de enfermedades.

- 5 Por “planta de maíz”, según se emplea en la presente invención, se refiere a un ser vivo fotosintético perteneciente a la especie *Zea mays*. Dicho término incluye también las diversas subespecies.

Una “parte de una planta”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una
10 parte específica de una planta, tal como tallo, hoja, raíz, flor, semilla, endospermo, grano, fruto o yema.

“Derivado de una parte de la planta” se refiere a un producto obtenido tras el procesamiento de una parte de la planta de la invención a partir de la modificación física
15 y/o química, a modo ilustrativo no limitativo, harina, sémola, aceite, sirope, almidón o fécula. Dicho término no incluye un antioxidante aislado.

Según la invención, la planta de maíz se encuentra “enriquecida en antioxidantes”, es decir, presenta niveles superiores de moléculas capaces de retardar o prevenir la
20 oxidación de otras moléculas, comparado con un nivel de referencia. Los antioxidantes se encargan de capturar los radicales libres producidos en las reacciones de oxidación propias del metabolismo. Ejemplos ilustrativos no limitativos de antioxidantes son carotenoides, luteína, licopeno, selenio, vitamina A, vitamina C y vitamina E.

- 25 “Semilla” tal y como se usa en la presente invención, se refiere a cada uno de los cuerpos que forman parte del fruto que da origen a una nueva planta.

El término “endospermo”, según se usa en la presente invención, se refiere al órgano principal de almacenamiento en las semillas de maíz, nutriendo el embrión mientras la
30 semilla se desarrolla y proporcionando nutrientes a la planta joven en germinación.

Por "derivado de semilla o endospermo", tal y como se usa en la presente invención se refiere a cualquier producto obtenido a partir de la modificación física y/o química de la semilla o endospermo.

- 5 El término "harina" según se entiende en la presente invención, es el producto obtenido de la molturación de cualquier semilla de plantas del género *Zea* que puede estar despojado en mayor o menor grado del salvado o la cascarilla de la semilla.

- 10 El término "sémola" hace referencia a harina gruesa (semillas de maíz poco molidas), es decir, fragmentos de endospermo con una cantidad variable de cascarilla de semilla.

"Aceite de maíz", tal y como se usa en la presente invención, se refiere al aceite obtenido tras el secado del grano de maíz germinado.

- 15 Por "almidón de maíz", tal y como se emplea, se refiere a un polvo sedoso blanco finalmente molido hecho del endospermo del maíz seco.

"Fécula de maíz" es el polisacárido obtenido a través de la molienda húmeda.

- 20 "Sirope de maíz", también conocido como jarabe de maíz, es un edulcorante líquido elaborado a partir del almidón o la fécula de maíz tras un proceso de calentamiento e hidrolización.

- 25 "Carotenoides", tal y como se usa en la presente invención, se refiere a pigmentos orgánicos que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos. La mayoría de los carotenoides son tetraterpenoides, compuestos de 40 átomos de carbono formados por ocho unidades isoprenoides y contienen anillos a uno o ambos extremos de la molécula. Pueden funcionar como antioxidantes, protegiendo frente a la auto-oxidación.

30

" β -caroteno" tal y como se usa en la presente invención se refiere al carotenoide más abundante en la naturaleza, precursor de la vitamina A con número CAS 12-88-4.

“γ-caroteno”, según la presente invención se refiere al carotenoide con número CAS 472-93-5.

5 “α-caroteno” tal y como se usa en la presente invención, se refiere al carotenoide precursor de la vitamina A con número CAS 7488-99-5

“α-criptoxantina”, según la presente invención, se refiere al carotenoide con número CAS 472-70-8

10 “β-criptoxantina”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al compuesto con número CAS 472-70-8.

“licopeno” tal y como se usa en la presente invención, se refiere al pigmento vegetal liposoluble con número CAS 502-65-8 de color rojo.

15

“Luteína” tal y como se usa en la presente invención se refiere a un derivado dihidroxilado del α-caroteno de color amarillo con número CAS 127-40-2.

20 “Zeaxantina”, tal y como se emplea en la presente invención se refiere al pigmento liposoluble de color amarillo con número CAS 144-68-3.

25 Por “planta de maíz transgénica”, según se usa en la presente invención, se refiere a aquella planta de maíz cuyo genoma ha sido modificado mediante ingeniería genética con el objetivo de conseguir características biológicas diferentes y/o mejoradas respecto a las de la planta isogénica silvestre.

30 Por “transgén” tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia que codifica un gen de un organismo que ha sido incorporado en el genoma de otro organismo de la misma o diferente especie. El organismo resultante se le denomina transgénico.

Por “Fitoeno sintasa” o *psy1* tal y como se usa en la presente invención se refiere al gen que codifica para la enzima que cataliza la reacción que convierte dos moléculas de GGDP en fitoeno, el primer paso en la síntesis de la provitamina A. La secuencia que

codifica para la fitoeno sintasa de *Zea mays* tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

5 “Caroteno desaturasa” o *crtl*, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al gen que codifica para la enzima encargada de la producción de licopeno a partir de tres substratos, neurosporeno, un aceptor de electrones y oxígeno. La secuencia que codifica para la caroteno desaturasa de *E eurodovora* tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2.

10 “Licopeno β -ciclase” o *Lycb*, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al gen que codifica para la enzima que transforma el licopeno en provitamina A. La secuencia que codifica para la Licopeno β -ciclase de *G. lutea* tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3.

15 “ β -caroteno hidroxilasa” o *bch*, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al gen que codifica para la enzima encargada de la conversión del beta-caroteno a xantofilas. La secuencia que codifica para la β -caroteno hidroxilasa de *Z. mays* tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4.

20 “Carotenoide cetolasa” o *crtw* tal y como se usa en la presente invención, se refiere al gen que codifica para la enzima encargada de añadir un grupo carbonilo con el carbono 4 y 4 'de la molécula de beta caroteno. La secuencia que codifica para la carotenoide cetolasa de *Paracoccus sp.* tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:7.

25 Por “secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto”, tal y como se usa en la presente invención se refiere a secuencias de importación al cloroplasto, estoma y que generalmente son secuencias ricas en Ser, Thr y residuos hidrofóbicos pequeños y de bajo contenido de Glu y Asp. Dicha secuencia se sitúa en el extremo N-terminal dentro de la proteína y es eliminada tras el direccionamiento. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas secuencias son aquellas presentes en enzimas del ciclo de Calvin y que son
30 codificadas por genes nucleares y transportas al cloroplasto después de su síntesis en el citosol, por ejemplo todas las demás enzimas del ciclo de Calvin, excepto la subunidad grande de la Rubisco.

5 “La subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a la subunidad reguladora. La secuencia correspondiente a la proteína en guisante tiene el número de acceso P00868 de la base de datos de Uniprot a fecha 14 de octubre de 2015.

10 “Secuencia terminadora de la transcripción” o señal de parada, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia en el ADN que cuando es reconocida por la ARN polimerasa, el ARNm se separa y se interrumpe la síntesis de ARNm

15 “Nopalina sintasa”, tal y como se usa en la presente invención se refiere a una proteína con actividad oxidoreductasa y cuya secuencia de *Agrobacterium tumefaciens* corresponde con la secuencia con número de acceso WP_032488658. 1 en la base de datos de Genbank a fecha 8 de octubre de 2014

20 “ADP-glucosa pirofosforilasa” La secuencia correspondiente a la proteína en arroz tiene el número de acceso BAF80188.1 de la base de datos de Genbank a fecha 29 de diciembre de 2014.

25 “Promotor específico de endospermo”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una molécula de ácido nucleico que permite dirigir o regular la expresión de un gen en el endospermo. El “endospermo” es una formación característica de las semillas de Angiospermas, es un tejido nutritivo para el embrión. El endospermo de maíz se origina a partir de una serie de divisiones nucleares libres, seguidas de la celularización y posterior formación de un rango de dominios celulares funcionales. El endospermo es el órgano de almacenamiento principal de las semillas de maíz; nutre al embrión mientras la semilla se desarrolla y proporciona nutrientes a la plántula en germinación.

30 “D-hordeína de cebada”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a la proteína con el número de acceso Q40054 de la base de datos Uniprot a fecha 14 de octubre de 2015. En una realización particular, el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12.

“LMW glutenina de trigo”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a proteína con el número de acceso Q41603 de la base de datos Uniprot a fecha 14 de octubre de 2015. En una realización particular, el promotor de LMW de glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.

5

“Gamma zeína”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una proteína de reserva de maíz y que corresponde a la secuencia con número de acceso Q548E9 en la base de datos de Uniprot en fecha 14 de octubre de 2015.

10 “Astaxantina”, según la presente invención es un carotenoide perteneciente a la serie fitoquímica de los terpenos con número CAS 472-61-7.

“Violaxantina”, tal y como se usa en la presente invención se refiere a un derivado del alfa y beta caroteno con número CAS 126-29-4.

15

“Anteraxantina”, se refiere a un pigmento amarillo con número CAS 640-03-9.

“Cantaxantina”, tal y como se usa en la presente invención se refiere al compuesto con número CAS 514-78-3.

20

“Adonixantina”, corresponde al compuesto con número CAS 4418-73-9.

“Adonirubina”, según la presente invención se refiere al compuesto con número CAS 4418-72-8.

25

“3-OH equinenona”, se refiere al compuesto producto de la enzima EC 1.14.13.

“Zeaxantina”, tal y como se usa en la presente invención se refiere a un carotenoide de color amarillo del grupo de las xantofilas con número CAS 114-68-3.

30

“Z-fitoeno”, se refiere al compuesto con número CAS 540-04-5.

“Fitoeno”, según se emplea en la presente invención, se refiere a un intermedio de 40 átomos de carbono en la biosíntesis de carotenoides.

5 “Beta caroteno cetolasa”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a la enzima codificada por el gen *crtW* y que cataliza las dos etapas de introducción del grupo oxo en el anillo de beta-yonona del beta-caroteno por ambos extremos. La secuencia que codifica para la beta caroteno cetolasa de *C. reinhardtii* tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14.

10 “Beta caroteno hidroxilasa”, tal y como se emplea en la presente invención se refiere a la enzima codificada por el gen *crtZ* y que interviene en las dos etapas de hidroxilación del anillo de beta-yonona del beta caroteno en ambos extremos. La secuencia que codifica para la beta caroteno hidroxilasa de *Brevibacterium sp.* tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:15.

15 “Licopeno épsilon ciclasa”, tal y como se usa aquí, se refiere a una enzima que actúa sobre el carotenoide licopeno-todo-trans que posee grupos psi-terminales en ambos extremos, en un primer paso lo convierte en δ -caroteno; y luego en ϵ -caroteno.

20 “ARNi” o ARN de interferencia”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a moléculas de ARN capaces de silenciar la expresión de un gen. Para ese fin, ARNi son típicamente oligonucleótidos de doble cadena que tienen al menos 30 pares de bases de longitud, y más preferiblemente comprenden aproximadamente 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18 o 17 pares de bases de ácidos ribonucleicos. El ARNi de la licopeno épsilon ciclasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 16.

25 “Cruzamiento”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a la reproducción sexual de dos plantas, dando como resultado una descendencia que hereda parte del material genético de cada progenitor. Los organismos parientes deben ser genéticamente compatibles y pueden ser de variedades diferentes o de especies muy cercanas. El cruzamiento originalmente se da bajo polinización cruzada natural entre plantas cuya
30 constitución genética es diferente.

“Línea de maíz con alto nivel de aceite”, tal y como se usa aquí, se refiere a una planta de maíz que presenta en sus granos mayor cantidad de aceite al compararlo con una variedad de maíz silvestre, preferiblemente al menos más de 6% al compararlo con una variedad silvestre que generalmente presenta entre un 3,5 y 5% de aceite.

5

“NSL30876”, también conocida como R78, es una línea de maíz transgénica con alto nivel de aceite.

10 “Codones adecuados para su expresión en plantas”, tal y como se usa se refiere al uso de una secuencia de nucleótidos adecuada para que tras la transcripción y traducción no se vea alterada la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante, como consecuencia de la preferencia de uso de codones.

15 “región 5’UTR”, según se emplea en la invención se conoce a la región no traducida en posición 5’ también conocida como región líder, se refiere a la región de ARNm que está inmediatamente anterior al codón de iniciación. Dicha región no es traducida, sino que forma una estructura secundaria para regular la traducción.

20 “Alcohol deshidrogenasa”, según la invención es un enzima que facilita la interconversión entre alcoholes y aldehídos o cetonas con la reducción de NAD⁺ a NADH. La proteína de alcohol dehidrogenasa clase 3 de arroz tiene la secuencia con número de acceso Q0DWH1 en la base de datos de Uniprot en fecha 16 de septiembre de 2015.

25 “Huevos enriquecidos en antioxidantes”, tal y como se usa en la presente invención se refiere a aquellos huevos cuyo contenido en antioxidantes, es decir de moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, está incrementado comparado con un nivel de referencia en huevos comunes, procedentes de aves que no han sido alimentadas con un maíz enriquecido en antioxidantes, Por incrementado tal y como se
30 usa en la presente invención se refiere el nivel es al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto al valor de referencia en huevos comunes.

“Ave” tal y como se usa en la presente invención, se refiere al animal vertebrado que presentan las extremidades anteriores modificadas como alas, con el cuerpo recubierto de plumas y un pico córneo sin dientes.

5 “Ave de corral”, incluye aves domésticas criadas por el hombre para la obtención de huevos, carne y/o plumas. Los ejemplos de las aves de corral incluyen gallos, gallinas, pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, palomas, palomas, emúes, avestruces y ñandúes.

10 “Gallina”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere al animal hembra procedente del género *Gallus gallus domesticus*.

“Huevo” tal y como se emplea en la presente invención se refiere a un cuerpo redondeado, de diferente tamaño y dureza, que producen las hembras de las aves y que
15 contiene el germen del embrión y las sustancias destinadas a su nutrición durante la incubación.

“Ovoproductos” tal y como se emplea en la presente invención se refiere a los productos transformados resultantes de la transformación de huevos, de diversos componentes o
20 mezclas de huevos, o de la transformación subsiguiente de tales productos transformados. Los ovoproductos pueden clasificarse según distintos criterios, por sus componentes, por su forma física y tratamiento, por su modo de empleo o por la duración de su vida comercial.

25 Composiciones de la invención.

En un primer aspecto, la invención se relaciona con una composición nutritiva o nutracéutico que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma.

30 La expresión “composición nutritiva o nutracéutico” se usa en el presente documento en un sentido amplio y cubre alimentos para seres humanos así como alimentos para animales de producción (es decir, un pienso). En un aspecto preferido, la composición

nutritiva o nutracéutico es para consumo animal. La composición nutritiva o nutracéutico puede estar en forma de una disolución o como un sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Se entiende que una parte de una planta de maíz o un derivado de la misma se encuentra enriquecida en antioxidantes, cuando presenta niveles de antioxidantes superiores a los niveles de una muestra de referencia o muestra control. En particular, se puede considerar que una parte de una planta o derivado de la misma presenta niveles superiores de antioxidantes cuando los niveles son de al menos 1 vez, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la muestra de referencia o muestra control. El experto en la materia entenderá que no es necesario que una planta enriquecida en antioxidantes contenga niveles elevados de dichos antioxidantes en todos los tejidos de dicha planta, sino que es suficiente con que al menos un tejido de la planta contenga niveles elevados de antioxidantes para que la planta pueda ser considerada como "enriquecida en antioxidantes". En ese caso, la muestra de referencia para determinar el grado de enriquecimiento en antioxidantes se determina mediante comparación con los niveles de antioxidantes es una muestra del mismo tejido o parte de una planta control. Por nivel de antioxidantes también se engloba el nivel de un solo tipo de antioxidante.

Una muestra control o de referencia, tal y como se usa en la presente invención, puede ser el valor que corresponde a los niveles de antioxidantes presentes en una parte de una planta de maíz o derivado de la misma que se encuentra en estado salvaje, es decir no modificada genéticamente.

El experto en la materia conoce diversos métodos para determinar si una planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en antioxidantes, por ejemplo determinando los niveles de antioxidantes, particularmente carotenoides mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) o determinando el incremento de la capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante puede determinarse mediante la cuantificación de la capacidad que tienen los compuestos antioxidantes para reaccionar con un radical libre determinado,

o determinando el potencial que tales compuestos tendrían para reducir el complejo formado entre iones Fe(III) y el reactivo TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina).

Entre aquellos ensayos que se basan en la medición de la capacidad de los antioxidantes para reaccionar con un radical libre, caben destacar los siguientes, ensayo ORAC (del
5 inglés "*Oxygen Radical Absorbance Capacity*" o capacidad de absorción de radicales de oxígeno), ensayo TEAC (del inglés Trolox Equivalent Antioxidant Capacity o Capacidad Antioxidante como Equivalentes Trolox) y Ensayo DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil).

Las composiciones nutritivas o nutraceuticos de la invención comprenden al menos un
10 0,01 % de la parte de una planta enriquecida en antioxidantes o derivado de la misma, más preferiblemente al menos un 0,10%, 0,50%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15% 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o, al menos un 95%.

En una realización particular, la composición nutritiva o nutraceutico de la invención comprende al menos entre un 50 y un 80% de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma.

15 En otra realización más particular la composición nutritiva o nutraceutico de la invención comprende al menos entre un 60 y un 70% de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma, más particularmente al menos 61, al menos 62, al menos 63, al menos 64, al menos 65, al menos 66, al menos 67, al menos 68, al menos 69.

20 En otra realización particular, la parte de la planta de maíz es el endospermo, la semilla o derivados de los mismos. A modo de ejemplo ilustrativo no limitativo, el derivado de la semilla o endospermo puede ser una harina, sémola, aceite de maíz, almidón de maíz, fécula de maíz o sirope de maíz entre otros.

25 La composición nutritiva o nutraceutico de acuerdo a la presente invención se puede preparar directamente a partir de la parte de la planta enriquecida en antioxidantes. En una forma preferida de realización, la parte de la planta es el endospermo o granos de maíz, en cuyo caso dicha composición contiene al menos un 40%, preferiblemente más de un 50% o más preferiblemente más de un 60%.

Alternativamente, la parte de la planta que se usa para preparar la composición nutritiva o el nutracéutico de acuerdo a la presente invención puede someterse a una purificación parcial para obtener un derivado enriquecido en el producto antioxidante. Así, en el caso de que los compuestos antioxidantes sean carotenoides y que la parte de la planta que se usa sea el endospermo, la composición nutritiva o el nutracéutico contienen un extracto de granos de maíz o de endospermo que puede encontrarse parcial- o totalmente purificado de forma que el contenido en carotenoides sea superior al que aparece en la parte de la planta de maíz enriquecida. Derivados de maíz que se pueden usar en la presente invención incluyen harina de maíz, salvado de maíz, aceite de maíz, almidón de maíz, sirope de maíz, y similares.

Así, por ejemplo, de acuerdo a la presente invención, es posible extraer los carotenoides presentes en la parte de las plantas de maíz o derivados de la misma para obtener una composición nutritiva o nutracéutico.

El experto en la materia conoce diversos métodos para extraer carotenoides de una parte de una planta de maíz, tal y como extracción a partir de endospermos congelados y HPLC, tal y como se describe en Naqvi S. et al., PNAS 2009, vol. 106, no 19.

Como entenderá un experto en la materia, la composición nutritiva o nutracéutico de la invención deben cumplir las normativas y legislación alimentaria del país.

Existen diversos métodos conocidos para la elaboración de composiciones nutritivas y nutracéuticos ampliamente conocidas por el experto en la materia y que pueden emplearse en la presente invención.

Las composiciones de la invención o nutracéuticos pueden estar en una forma líquida, semisólida o sólida. En una realización particular las composiciones o nutracéutico de la invención se encuentran en forma sólida y más particularmente es un pienso.

Las composiciones nutritivas o nutracéuticos de la invención pueden formularse con los excipientes y adyuvantes usuales para las composiciones orales o suplementos alimentarios, como por ejemplo y sin sentido limitativo, componentes grasos, componentes acuosos, humectantes, conservantes, agentes texturizantes, sabores, aromas, antioxidantes y colorantes comunes en el sector alimentario.

Las necesidades nutritivas de los animales son bien conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, las necesidades nutritivas de las aves de corral son descritas en Gail Damerow The Chicken Encyclopedia: An Illustrated Reference. Storey Publishing. pp. 118–119, 135–136 y en el libro Animal Nutrition handbook, sección 12 páginas 316-331.

- 5 Composiciones nutritivas útiles para la alimentación de aves de corral, y en concreto de engorde para pollos de carne o broilers, de cría de pollitas (semanas 0 a 8), de recría para pollitas (semana 9 -20) o puesta a partir de la semana 21^a son conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo en ES2051706T3.

10 En una forma preferida, los antioxidantes enriquecidos en una planta de maíz son carotenoides.

En otra realización particular de la composición nutritiva o nutracéutico de la invención, la parte de una planta de maíz o un derivado de la misma está enriquecida en carotenoides que se seleccionan del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina y combinaciones de los
15 mismos (composición nutritiva A o nutracéutico A).

En una realización particular de la composición nutritiva A o nutracéutico A, la planta de maíz o derivado de la misma enriquecida en carotenoides se encuentra enriquecida en uno sólo de los carotenoides seleccionado del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno,
20 α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.

En una realización particular de la composición nutritiva A o nutracéutico A de la invención, la planta de maíz o derivado de la misma enriquecida en carotenoides se encuentra enriquecida en al menos 2 carotenoides, a modo ilustrativo se encuentra
25 enriquecida en β -caroteno y γ caroteno; β -caroteno y α -caroteno; β -caroteno y α -criptoxantina; β -caroteno y β -criptoxantina; β -caroteno y licopeno; β -caroteno y luteína; β -caroteno y zeaxantina; γ -caroteno y α -caroteno; γ -caroteno y α -criptoxantina; γ -caroteno y β -criptoxantina; γ -caroteno y licopeno; γ -caroteno y luteína; γ -caroteno y zeaxantina; α -caroteno y α -criptoxantina; α -caroteno y β -criptoxantina; α -caroteno y licopeno; α -caroteno
30 y luteína; α -caroteno y zeaxantina; α -criptoxantina y β -criptoxantina; α -criptoxantina y licopeno; α -criptoxantina y luteína; α -criptoxantina y zeaxantina; β -criptoxantina y licopeno;

β -criptoxantina y luteína; β -criptoxantina y zeaxantina; licopeno y luteína; licopeno y zeaxantina; o en luteína y zeaxantina.

En otra realización de la composición nutritiva A o nutracéutico A de la invención, la planta
 5 de maíz o derivado de la misma enriquecida en carotenoides se encuentra enriquecida en
 al menos 3 carotenoides, a modo ilustrativo se encuentra enriquecido en β -caroteno, γ -
 caroteno y α -caroteno; β -caroteno, γ -caroteno y α -criptoxantina; β -caroteno, γ -caroteno y β -
 criptoxantina; β -caroteno, γ -caroteno y licopeno; β -caroteno, γ -caroteno y luteína; β -
 caroteno, γ -caroteno y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno y α -criptoxantina; β -caroteno, α -
 10 caroteno y β -criptoxantina; β -caroteno, α -caroteno y licopeno; β -caroteno, α -caroteno y
 luteína; β -caroteno, α -caroteno y zeaxantina; β -caroteno, α -criptoxantina y β -criptoxantina;
 β -caroteno, α -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, α -criptoxantina y luteína; β -caroteno, α -
 criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno, β -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, β -
 criptoxantina y luteína; β -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno,licopeno y
 15 luteína; β -caroteno,licopeno y zeaxantina; β -caroteno,luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -
 caroteno y α -criptoxantina; γ -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina; γ -caroteno, α -caroteno
 y licopeno; γ -caroteno, α -caroteno y luteína; γ -caroteno, α -caroteno y zeaxantina; γ -
 caroteno, α -criptoxantina y β -criptoxantina; γ -caroteno, α -criptoxantina y licopeno; γ -
 caroteno, α -criptoxantina y luteína; γ -caroteno, α -criptoxantina y zeaxantina; γ -caroteno, β -
 20 criptoxantina y licopeno; γ -caroteno, β -criptoxantina y luteína; γ -caroteno, β -criptoxantina y
 zeaxantina; γ -caroteno,licopeno y luteína; γ -caroteno,licopeno y zeaxantina; γ -
 caroteno,luteína y zeaxantina; α -caroteno, α -criptoxantina y β -criptoxantina; α -caroteno, α -
 criptoxantina y licopeno; α -caroteno, α -criptoxantina y luteína; α -caroteno, α -criptoxantina y
 zeaxantina; α -caroteno, β -criptoxantina y licopeno; α -caroteno, β -criptoxantina y luteína; α -
 25 caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina; α -caroteno,licopeno y luteína; α -caroteno,licopeno
 y zeaxantina; α -caroteno,luteína y zeaxantina; α -criptoxantina, β -criptoxantina y licopeno;
 α -criptoxantina, β -criptoxantina y luteína; α -criptoxantina, β -criptoxantina y zeaxantina; α -
 criptoxantina,licopeno y luteína; α -criptoxantina,licopeno y zeaxantina; α -
 criptoxantina,luteína y zeaxantina; β -criptoxantina,licopeno y luteína; β -
 30 criptoxantina,licopeno y zeaxantina; β -criptoxantina,luteína y zeaxantina o enriquecido en
 licopeno,luteína y zeaxantina.

En otra realización de la composición nutritiva A o nutracéutico A de la invención, la planta de maíz enriquecida o derivado de la misma en carotenoides se encuentra enriquecida en al menos 4 carotenoides, a modo ilustrativo se encuentra enriquecido en β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno y α -criptoxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno y licopeno; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina y β -criptoxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, β -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, γ -caroteno, β -criptoxantina y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno,licopeno y luteína; β -caroteno, γ -caroteno,licopeno y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno,luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y β -criptoxantina; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y luteína; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina y luteína; β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno,licopeno y luteína; β -caroteno, α -caroteno,licopeno y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno,luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y luteína; β -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno, α -criptoxantina,licopeno y luteína; β -caroteno, α -criptoxantina,licopeno y zeaxantina; β -caroteno, β -criptoxantina,licopeno y luteína; β -caroteno, β -criptoxantina,licopeno y zeaxantina; β -caroteno, β -criptoxantina,luteína y zeaxantina; β -caroteno,licopeno,luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y β -criptoxantina; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y licopeno; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y luteína; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina y licopeno; γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina y luteína; γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno,licopeno y luteína; γ -caroteno, α -caroteno,licopeno y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno,luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y licopeno; γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y luteína; γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y zeaxantina; γ -caroteno, α -criptoxantina,licopeno y luteína; γ -caroteno, α -criptoxantina,licopeno y zeaxantina; γ -caroteno, α -criptoxantina,luteína y zeaxantina; γ -caroteno, β -criptoxantina,licopeno y luteína; γ -caroteno, β -criptoxantina,licopeno y

zeaxantina; γ -caroteno, β -criptoxantina,luteína y zeaxantina; γ -caroteno,licopeno,luteína y zeaxantina; α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y licopeno; α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y luteína; α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y zeaxantina; α -caroteno, α -criptoxantina,licopeno y luteína; α -caroteno, α -criptoxantina,licopeno y zeaxantina; α -caroteno, α -criptoxantina,luteína y zeaxantina; α -caroteno, β -criptoxantina,licopeno y luteína; α -caroteno, β -criptoxantina,licopeno y zeaxantina; α -caroteno, β -criptoxantina,luteína y zeaxantina; α -caroteno,licopeno,luteína y zeaxantina; α -criptoxantina, β -criptoxantina,licopeno y luteína; α -criptoxantina, β -criptoxantina,licopeno y zeaxantina; α -criptoxantina, β -criptoxantina,luteína y zeaxantina; α -criptoxantina,licopeno,luteína y zeaxantina; o enriquecido en criptoxantina,licopeno,luteína y zeaxantina.

En otra realización de la composición nutritiva A o nutracéutico A de la invención, la planta de maíz o derivado de la misma enriquecida en carotenoides se encuentra enriquecida en al menos 5 carotenoides, a modo ilustrativo se encuentra enriquecido en β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y β -criptoxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno,licopeno y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno,licopeno y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno,luteína y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina,licopeno y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina,licopeno y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina,luteína y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, β -criptoxantina,licopeno y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, β -criptoxantina,licopeno y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, β -criptoxantina,luteína y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno,licopeno,luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y luteína; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina,licopeno y luteína; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina,licopeno y zeaxantina; β -caroteno, α -

- caroteno, α -criptoxantina, luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno y luteína; β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y luteína; β -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; β -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y licopeno; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y luteína; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, licopeno y luteína; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno y luteína; γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y luteína; γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y luteína; α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina; α -caroteno, α -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina o enriquecido en α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.
- 25 En otra realización de la composición nutritiva A o nutracéutico A de la invención, la planta de maíz o derivado de la misma enriquecida en carotenoides se encuentra enriquecida en al menos 6 carotenoides, a modo ilustrativo se encuentra enriquecido en β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y licopeno; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, licopeno y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, luteína y zeaxantina, β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno y luteína; β -caroteno, γ -

caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y luteína; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y luteína; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina o enriquecido en α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.

20

En otra realización de la composición nutritiva A o nutracéutico A de la invención, la planta de maíz o derivado de la misma enriquecida en carotenoides se encuentra enriquecida en al menos 7 carotenoides, a modo ilustrativo se encuentra enriquecido en β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y luteína; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; β -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina; o enriquecida en γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.

30

En otra realización particular de la composición nutritiva A o nutraceutico A de la invención, la planta de maíz o derivado de la misma enriquecida en carotenoides se encuentra enriquecida en β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.

5

En otra realización de la composición nutritiva A o nutraceutico A de la invención, la planta de maíz o derivado de la misma enriquecida en antioxidantes es una planta de maíz transgénica que expresa al menos un transgén que codifica una fitoeno sintasa y un transgén que codifica una caroteno desaturasa. Más particularmente la planta de maíz
10 expresa adicionalmente un transgén seleccionado del grupo formado por un transgén que codifica una licopeno β -ciclase, un transgén que codifica una β -caroteno hidroxilasa y un transgén que codifica una carotenoide cetolasa.

En otra realización particular, las secuencias de los transgenes tienen adaptados los
15 codones para su expresión en plantas.

Un experto en la materia puede conocer y determinar la secuencia de los transgenes anteriormente citados.

20 En otra realización más particular el transgén que codifica la fitoeno sintasa procede de *Zea mays* y tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgén que codifica la caroteno desaturasa procede de *Erwinia eurodevora* y tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, el transgén que codifica la licopeno β -ciclase procede de *Gentiana lutea* y tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3, el transgén que codifica la β -caroteno
25 hidroxilasa procede de *Zea mays* y tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4 o procede de *Gentiana lutea* y tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:6 y el transgén que codifica la carotenoide cetolasa procede de *Paracoccus sp.* tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:7.

30 En una realización particular, la planta de maíz es maíz blanco o maíz amarillo. Maíz blanco se refiere a una variedad de maíz en el que el endospermo tiene color blanco, como consecuencia de la ausencia de los pigmentos carotenoides que confieren el color amarillo al endospermo del maíz conocido como maíz amarillo.

Un experto en la materia conoce las técnicas adecuadas para la generación de plantas transgénicas. Para una revisión de la transferencia génica a plantas, incluyendo vectores, métodos de transferencia de ADN, etc, véase, por ejemplo, Twyman RM, 2004, Handbook of Plant Biotechnology. John Wiley & Sons Inc., NY, pp 263-289, o Komari et al., 2004
5 Handbook of Plant Biotechnology. John Wiley & Sons Inc., NY, pp 233-262.

Brevemente dichos métodos pueden incluir: 1) empleo de un vector vivo que lleve el material genético a la célula blanco mediante virus genéticamente modificados o el mecanismo natural de infección de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, 2) El
10 uso de protoplastos, que son células vegetales a las que se les ha liberado de la pared celular, o 3) la biolística que consiste en bombardear las células con partículas metálicas microscópicas recubiertas del ADN que se desea introducir.

En concreto, para la generación de plantas de maíz transgénico se ha propuesto la
15 introducción de ADN en células de maíz incluyendo la electroporación, microinyección, bombardeo con microproyectiles, fusión de liposomas, transferencia mediada por *Agrobacterium*, macroinyección y la exposición a ADN desnudo en solución.

Para lograr que el gen contenido en la molécula de ADN recombinante se exprese en los
20 niveles y en los tejidos adecuados, es deseable, pero no necesario para genes de origen vegetal, que esté contenido en un cassette de expresión que incluya una secuencia promotora de la transcripción funcional en plantas, la parte codificante del gen de interés y un terminador de la transcripción funcional en plantas. Adicionalmente se puede incluir una secuencia que codifique para un péptido de tránsito que dirija la enzima a un
25 compartimiento específico de la célula. El péptido de tránsito y las señales de procesamiento correspondientes pueden ser derivados de cualquier proteína vegetal que se sintetiza en el citoplasma y es translocada al compartimiento subcelular de interés, ya sea el plástido o la mitocondria. Por ejemplo, para localizar en los plástidos pueden ser usadas secuencias derivadas de genes que codifican para la subunidad pequeña de la
30 ribulosa bisfosfato carboxilasa o las proteínas CAB que son aquellas que se unen a las clorofilas a y b para formar las antenas cosechadoras de luz (Van den Broek et al Nature (London) 313, 358-363 (1985)).

Para el caso de genes que no son de origen vegetal, en la secuencia iniciadora de la transcripción se debe incluir un promotor y se puede emplear también una señal de inicio de la traducción óptima para plantas o uno de los llamados potenciadores de la traducción.

5

Según la presente invención, si el transgén procede de un organismo que no es de origen vegetal, entonces las proteínas codificadas por dicho transgén forman parte de una proteína de fusión que comprende en posición N con respecto a la proteína codificada por dicho gen, una secuencia de direccionamiento de proteínas al cloroplasto.

10

Así, si el transgén que codifica la caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, entonces la caroteno desaturasa forma parte de una proteína de fusión que comprende en posición N con respecto a la caroteno desaturasa una secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto.

15

En una realización particular, la secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto es la secuencia de la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa, y más particularmente tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 8.

20

En otra realización particular, al menos uno de los transgenes presenta adicionalmente en el extremo 3' una secuencia terminadora de la transcripción. La secuencia terminadora de la transcripción puede ser derivada del mismo gen de donde se obtuvo la secuencia promotora de la transcripción o de un gen distinto. La secuencia terminadora puede ser derivada de genes contenidos en el T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium*, del virus del mosaico de la coliflor o de genes de origen vegetal. Por ejemplo, la secuencia terminadora del gen de la nopalina sintetasa es frecuentemente usado en la Ingeniería Genética de plantas. Más particularmente la secuencia terminadora empleada es la secuencia terminadora del gen que codifica nopalina sintasa o la secuencia terminadora del gen que codifica la ADP-glucosa pirofosforilasa. Aún más particularmente, la

25

30

la secuencia terminadora de nopalina sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9 y la secuencia terminadora de ADP- glucosa pirofosforilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 10.

En una realización de la presente invención cuando la planta de maíz expresa el transgén correspondiente a la fitoeno sintasa con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, dicha secuencia presenta adicionalmente en el extremo 3' la secuencia terminadora de nopalina sintasa con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9.

En otra realización particular, cuando la planta de maíz expresa el transgén correspondiente a la caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, dicha secuencia presente adicionalmente en el extremo 3' la secuencia terminadora de ADP- glucosa pirofosforilasa SEQ ID NO: 10. En otra realización, la caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, entonces la caroteno desaturasa forma parte de una proteína de fusión que comprende en posición N con respecto a la caroteno desaturasa una secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto, y adicionalmente en el extremo 3' presenta la secuencia terminadora de ADP- glucosa pirofosforilasa SEQ ID NO: 10.

Los transgenes que pueden emplearse en la presente invención pueden ponerse bajo el control de elementos reguladores que aseguran la expresión en las células de las plantas. En general, tales elementos reguladores comprenden un promotor activo en las células de las plantas.

Por tanto, los promotores que pueden ser usados incluyen promotores de la planta que se desea transformar, promotores de otras plantas o de cualquier origen que sean funcionales en la planta blanco y dirijan una expresión constitutiva, inducible o tejido específica. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* como son los promotores de la octopina sintetasa, la nopahna sintetasa o la sgropina Sintetasa. Además, se pueden incluir otros promotores como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor o aquellos derivados de geminivirus. Para una revisión de promotores útiles puede verse Peremarti A. et al, Plant Mol Biol 73:363–378.

La expresión temporal, inducible o tejido específica puede ser lograda mediante el uso de promotores o secuencias reguladoras que tienen la especificidad de expresión deseada.

Con objeto de conseguir la expresión en tejidos específicos de una planta transgénica es posible utilizar promotores específicos de tejido (véase Stockhaus, EMBO J. 8 (1989), 2245-2251). Se conocen también promotores que son específicamente activos en semillas de diferentes especies de plantas, tales como maíz.

5

Los elementos reguladores pueden comprender adicionalmente intensificadores de la transcripción y/o traducción funcionales en las células de las plantas. Adicionalmente, los elementos reguladores pueden incluir señales de terminación de la transcripción, tales como una señal poli-A, que conducen a la adición de una cola poli-A al transcrito que puede mejorar su estabilidad.

10

En una realización particular el transgén o transgenes se encuentra bajo el control de un promotor específico de endospermo.

15 Promotores específicos de endospermo útiles en la presente invención, son entre otros los promotores de genes que codifican para proteínas de almacenamiento en semillas, Galili y col., 1993, *Trends Cell Biol* 3:437-442. Las prolaminas, son las proteínas de almacenamiento de cereales más abundantes, en maíz las zeínas (zeínas α , β , γ y δ -zeínas, en trigo las gluteninas, en cebada hordeína, secalina en centeno y acenina en
20 avena.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de promotores específicos de endospermo que pueden emplearse en la presente invención son entre otros los promotores de glutenina LMW de trigo, hordeína de cebada, prolamina de arroz, glutelina 1 de arroz, zeína de
25 maíz, de zeína 27 Kda, ADP-glucosa pirofosforilasa de arroz, glutelina I de arroz tal y como se describe en Russel DA. et al., *Transgenic research* 6, 157-168 (1997). También son útiles, los promotores de MEG-1 tal y como se describe en EP1680506B1.

En una realización particular el promotor específico de endospermo es el promotor de D-
30 hordeína o el promotor de LMW glutenina. Más particularmente el promotor de D-hordeína es de cebada con secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12 o del promotor de LMW glutenina de trigo con secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.

En una forma preferida de realización, el gen de la fitoeno sintasa se encuentra bajo control del promotor de la LMW glutenina, preferiblemente del promotor de la LMW glutenina de trigo. En otra forma preferida de realización, el gen de la carotena desaturasa se encuentra bajo control del promotor de la D-hordeina, preferiblemente del promotor de la D-hordeina de cebada.

La diferentes secuencias de ácidos nucleicos que forman parte de la molécula de ADN recombinante pueden ser unidas por métodos convencionales descritos en la literatura. Las secuencias deben ser clonadas y unidas en la orientación y orden correcto para lograr la expresión funcional en células vegetales.

De acuerdo con uno de los aspectos de esta invención, las plantas de interés son transformadas con una o varias moléculas de ADN recombinante. En el desarrollo de la molécula recombinante, las diferentes secuencias nucleotídicas que la componen y que comprenden las secuencias regulatorias de la transcripción y la secuencia codificante de interés, pueden haber sido sujetas a diferentes tipos de procesamiento, como son ligaciones, digestiones con enzimas de restricción, mutagénesis *in vitro*, adición de oligonucleótidos o modificaciones por medio de la reacción de polimerización en cadena (PCR). Por lo tanto, los componentes de la molécula recombinante antes de ser unidos pueden estar sujetos a deleciones, inserciones o modificaciones internas. Como la molécula recombinante es derivada de componentes que se originan de diferentes organismos y que han sido aislados, purificados o sintetizados, no es una molécula que existe como tal en la naturaleza.

Dependiendo del método de transformación utilizado para introducir la molécula recombinante a la célula vegetal de interés, puede ser necesario la inclusión de otras secuencias de ADN. Por ejemplo, es necesario incluir un vector de clonación molecular que permita su replicación en *E. coli* y, para algunos casos, que permita la replicación en *A. tumefaciens*. Para el uso del sistema de transformación genética mediada por el plásmido Ti de *Agrobacterium* para introducir la molécula recombinante en el genoma de la célula vegetal, es necesario incluir las secuencias bordes del T-DNA, de manera tal que estén presentes a ambos extremos del gen que codifica la enzima que sintetiza ácidos orgánicos y en algunos casos el gen de selección dominante. El uso de cepas de

Agrobacterium desarmadas, es decir aquellas a las que se les han removido los genes responsables de la formación de tumores, pero que mantienen la capacidad de transferir ADN a células vegetales, permite la regeneración de plantas transgénicas que contienen la molécula recombinante de interés.

5

También generalmente se incluye un gen de selección dominante que permita identificar y seleccionar las células que incorporaron de manera estable la molécula recombinante en su genoma. A modo de ejemplo ilustrativo no limitativo, los genes marcadores pueden ser la mutación *rrn16* (16S rRNA) que confiere resistencia a espectinomicina y estreptinomicina, la mutación *rps12* (ribosoma) que confiere resistencia a estreptinomicina, gen *aadA* (*E. coli*) que codifica la enzima aminoglucósido 3' adeniltransferasa que confiere resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptinomicina, gen *nptII* procedente del transposón bacteriano Tn5 codifica la enzima neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, el gen *aphA-6* de *Acinetobacter baumannii* que codifica la enzima aminoglucósido fosfotransferasa la cual le confiere resistencia al antibiótico kanamicina, gen *cat* de *E. coli* confiere resistencia a cloranfenicol, gen ASA2 responsable de la resistencia a análogos del triptófano, el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* que codifica para la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) que confiere resistencia a fosfinotricina y el gen *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* convierten el glufosinato de amonio en nacetil glufosinato que es un compuesto no fitotóxico para la planta.

15
20
25

En una realización preferida el gen de selección es el gen *bar*. En una realización más particular, el gen *bar* tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5.

Dependiendo del tipo de gen de selección que se incluya, puede ser aconsejable que una vez se ha identificado la planta transgénica, se elimine el gen marcador de selección de la planta.

30 En otra realización particular de la composición nutritiva o nutracéutico de la invención, la parte de la planta de maíz o un derivado de la misma está enriquecida en un carotenoide seleccionado del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH

equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno, fitoeno y combinaciones de los mismos (composición nutritiva B o nutracéutico B).

5 En una realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B de la invención, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en uno solo de los carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno, fitoeno.

10 En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 2 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno, incluyendo cualquier combinación de los
15 mismos.

En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 3 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína,
20 beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la
25 planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 4 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno, fitoeno y combinaciones de los mismos.

30 En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 5 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH

equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno , incluyendo cualquier combinación de los mismos.

5 En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 6 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno , incluyendo cualquier combinación de los mismos.

10

En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 7 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno , incluyendo cualquier combinación de los mismos.

20 En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 8 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno , incluyendo cualquier combinación de los mismos.

25 En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 9 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno , incluyendo cualquier combinación de los mismos.

30

En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 10 carotenoides

seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno , incluyendo cualquier combinación de los mismos.

5

En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 11 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno , incluyendo cualquier combinación de los mismos.

10

En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 12 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

15

En otra realización particular de la composición nutritiva B o nutracéutico B, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 13 carotenoides, concretamente astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno.

20

25

En otra realización de la composición B nutritiva o nutracéutico B de la invención la parte de la planta de maíz o derivado de la misma enriquecida en antioxidantes expresa un transgén que codifica una fitoeno sintasa, un transgén que codifica una beta caroteno cetolasa y un transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa. En otra realización de dicha composición, la planta de maíz enriquecida en antioxidantes, expresa adicionalmente un ARNi específico de la licopeno épsilon ciclasa de maíz.

30

En otra realización de la composición nutritiva o nutracéutico de la invención la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en un carotenoide seleccionado del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona y combinaciones de los mismos (composición nutritiva C o nutracéutico C).

En una realización particular de la composición nutritiva C o nutracéutico C, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en uno solo de los carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina y 3-OH equinenona.

En otra realización de la composición nutritiva C o nutracéutico C, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 2 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina y 3-OH equinenona, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

En otra realización de la composición nutritiva C o nutracéutico C, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 3 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina y 3-OH equinenona, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

En otra realización de la composición nutritiva C o nutracéutico C, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 4 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina y 3-OH equinenona, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

En otra realización de la composición nutritiva C o nutracéutico C, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 5 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno,

cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina y 3-OH equinenona, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

5 En otra realización de la composición nutritiva C o nutracéutico C, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 6 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina y 3-OH equinenona, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

10 En otra realización de la composición nutritiva C o nutracéutico C, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 7 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina y 3-OH equinenona, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

15

En otra realización de la composición nutritiva C o nutracéutico C, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 8 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina y 3-OH equinenona, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

20

En otra realización de la composición nutritiva C o nutracéutico C, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma nutraceutico se encuentra enriquecida en 9 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina y 3-OH equinenona, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

25

En otra realización de la composición nutritiva C o nutracéutico C, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en 10 carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina y 3-OH equinenona, incluyendo cualquier combinación de los mismos.

30

En otra realización de la composición nutritiva C o nutracéutico C de la invención, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma enriquecida en antioxidantes procede del cruzamiento entre una línea de maíz con alto nivel de aceite y un maíz que expresa un transgén que codifica una fitoeno sintasa, un transgén que codifica una beta caroteno cetolasa y un transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa. En una realización más particular, el maíz que expresa un transgén que codifica una fitoeno sintasa, un transgén que codifica una beta caroteno cetolasa y un transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa expresa adicionalmente un ARNi específico de la licopeno épsilon ciclasa de maíz.

10

El experto en la materia conoce diversos métodos para identificar una planta de maíz con alto nivel de aceite, a modo de ejemplo ilustrativo no limitativo mediante la determinación del contenido de aceite en grano de maíz empleando la metodología descrita en Galicia, L., E. Nurit, A. Rosales, and N. Palacios–Rojas. 2009. Maize Nutrition Quality and Plant Tissue Analysis Laboratory. Laboratory Protocols 2008. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México, D.F. 42 p. Se puede considerar que una planta de maíz presenta alto nivel de aceite, cuando el nivel de aceite en los granos de maíz es al menos un 6% mayor que el contenido en granos de un maíz silvestre.

20 En otra realización particular de la composición nutritiva C o nutracéutico C de la invención, la línea de maíz con alto nivel de aceite es la línea NSL30876.

En una realización particular de las composiciones nutritivas B y C o nutracéuticos B y C de la invención, las secuencias de los transgenes tienen adaptados los codones para su expresión en plantas.

25

En otra realización particular de las composiciones B y C de la invención el transgén que codifica una fitoeno sintasa procede de *Zea mays* y tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgén que codifica una beta caroteno cetolasa procede de *Chlamydomonas reinhardtii* y tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14, el transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa procede de *BreviDOMONAS sp.* y tiene la

30

secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15 y/o el ARNi específico de la licopeno épsilon ciclasa de maíz tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 16.

5 En otra realización particular de las composiciones B y C de la invención si el transgén que codifica una beta caroteno cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14 y/o el transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15, entonces la proteína codificada por dichos genes se encuentra formando parte de una proteína de fusión que comprende una secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto. Particularmente, la secuencia para el direccionamiento de
10 proteínas al cloroplasto es la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa y más particularmente la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:8.

15 En otra realización particular de las composiciones B y C de la invención, al menos un transgén o ARNi se encuentran bajo el control de un promotor específico de endospermo, particularmente el promotor específico de endospermo se selecciona de entre el promotor de D-hordeína, el promotor de LMW glutenina y el promotor de gamma-zeina. Más particularmente, el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:
20 12, el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11 y el promotor de gamma-zeina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13.

En otra realización, el transgén comprende adicionalmente en el extremo 3' la región 5'UTR del gen de la alcohol deshidrogenasa de arroz, más particularmente dicha región
25 tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 17.

Usos de las composiciones de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición nutritiva o
30 nutracéutico según cualquiera la invención (composición nutritiva A, B o C, o nutracéutico A, B o C) para la obtención de huevos enriquecidos en antioxidantes.

Un experto en la materia conoce diversos métodos para determinar el nivel de antioxidantes tal y como se ha explicado en detalles anteriormente, en relación con una planta enriquecida en antioxidantes.

5 Las composiciones de la invención pueden emplearse para la obtención de huevos enriquecidos en antioxidantes de cualquier individuo ovíparo hembra que sea alimentada con dichas composiciones.

10 En una realización preferida los huevos son huevos de un ave de corral, más particularmente de gallina.

Usos de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para la obtención de huevos enriquecidos en antioxidantes.

20 En una realización particular del uso de la invención, la parte de la planta de maíz es el endospermo, la semilla o derivados de los mismos.

En otra realización particular, los antioxidantes que se encuentran enriquecidos en una parte de una planta de maíz o en un derivado de la misma son carotenoides.

25 En una realización más particular del uso de la invención, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en carotenoides seleccionados del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina y combinaciones de los mismos (uso A de la invención)

30 En una realización particular del uso A de la invención, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en uno solo de los carotenoides, o en 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 seleccionados de β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina y combinaciones de los mismos.

Todas las combinaciones mencionadas anteriormente, en relación con la composición nutritiva A o nutracéutico A de la invención, son igualmente aplicables a este aspecto.

- 5 En otra realización del uso A de la invención la parte de la planta de maíz o derivado de la misma enriquecida en antioxidantes es una planta de maíz transgénica que expresa al menos un transgén que codifica una fitoeno sintasa y un transgén que codifica una caroteno desaturasa. En otra realización, la planta de maíz expresa adicionalmente un transgén seleccionado del grupo formado por un transgén que codifica una licopeno β -
10 ciclasa, un transgén que codifica una β -caroteno hidroxilasa y un transgén que codifica una carotenoide cetolasa.

En una realización particular, las secuencias de los transgenes tienen adaptados los codones para su expresión en plantas.

15

- En una realización particular, el transgén que codifica la fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgén que codifica la caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, el transgén que codifica la licopeno β -ciclase tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3, el transgén que codifica la β -caroteno hidroxilasa
20 tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6 y/o el transgén que codifica la carotenoide cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:7.

- En otra realización más particular, si el transgén que codifica una caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 entonces la proteína codificada por dicho
25 gen se encuentra formando parte de una proteína de fusión que comprende en el extremo 5' una secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto, más particularmente la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa, y más particularmente dicha secuencia, tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 8.

30

En otra realización, si el transgén que codifica una fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, dicha secuencia presenta adicionalmente en el extremo 3' la secuencia terminadora de nopalina sintasa con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9.

Los transgenes pueden presentar adicionalmente en el extremo 3' una secuencia terminadora de la transcripción, particularmente es la secuencia terminadora de nopalina sintasa o la secuencia terminadora de ADP-glucosa pirofosforilasa. Más particularmente la
5 secuencia terminadora de nopalina sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9 y la secuencia terminadora de ADP- glucosa pirofosforilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 10.

De acuerdo a este aspecto, un al menos un transgén se encuentra bajo el control de un
10 promotor específico de endospermo, particularmente el promotor específico de endospermo es el promotor de D-hordeína o el promotor de LMW glutenina. Más particularmente, el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12 y el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.

15 En otra realización, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma está enriquecida en carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno, fitoeno y combinaciones de los mismos (uso B de la invención).

20

En una realización particular del uso B de la invención, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en uno solo de los carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH
25 equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno.

En una realización particular, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en uno solo de los carotenoides, o en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 seleccionados de astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno,
30 cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno y fitoeno, incluyendo todas las posibles combinaciones.

En una realización particular del uso B de la invención, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma enriquecida en antioxidantes expresa un transgén que codifica una fitoeno sintasa, un transgén que codifica una beta caroteno cetolasa y un transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa, y más particularmente expresa adicionalmente un
5 ARNi específico de la licopeno épsilon ciclasa de maíz.

Todas las combinaciones mencionadas anteriormente, en relación con la composición nutritiva B o nutracéutico B de la invención, son igualmente aplicables al uso B de la invención.

10

En otra realización particular, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona y combinaciones de los mismos (uso C de la
15 invención).

En una realización particular del uso C de la invención, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en uno solo de los carotenoides seleccionados del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina y 3-OH equinenona.
20

En una realización particular, la parte de la planta de maíz o derivado de la misma se encuentra enriquecida en uno solo de los carotenoides, o en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, seleccionados de astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona incluyendo todas las posibles combinaciones.
25

Todas las combinaciones mencionadas anteriormente, en relación con la composición nutritiva C o nutracéutico C de la invención, son igualmente aplicables a este aspecto.
30

En una realización particular del uso C de la invención, la planta de maíz enriquecida en antioxidantes procede del cruzamiento entre una línea de maíz con alto nivel de aceite,

particularmente la línea NSL30876 y un maíz que expresa un transgén que codifica una fitoeno sintasa, un transgén que codifica una beta caroteno cetolasa, un transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa. Más particularmente, la planta expresa adicionalmente un ARNi específico de la licopeno épsilon ciclasa de maíz.

5

En otra realización particular, las secuencias de los transgenes tienen adaptados los codones para su expresión en plantas. Más particularmente, el transgén que codifica una fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgén que codifica una beta caroteno cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14, el transgén
10 que codifica una beta caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15 y/o el ARNi específico de la licopeno épsilon ciclasa de maíz con secuencia SEQ ID NO: 16.

Al menos un transgén o ARNi se pueden encontrar bajo el control de un promotor
15 específico de endospermo, particularmente el promotor específico de endospermo se selecciona de entre el promotor de D-hordeína, el promotor de LMW glutenina y el promotor de gamma-zeína y más particularmente el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:12 , el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11 y el promotor de gamma-zeína tiene la secuencia mostrada
20 en SEQ ID NO: 13.

En otra realización particular de los usos B y C de la invención, si el transgén que codifica para una beta caroteno cetolasa tiene la secuencia SEQ ID NO: 14 y/o el transgén que codifica para la beta caroteno hidroxilasa tiene la secuencia SEQ ID NO: 15, entonces el
25 transgén presenta en el extremo 5' una secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto. Más particularmente, la secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto es la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa, más particularmente, la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa tiene la secuencia mostrada
30 en SEQ ID NO: 8.

En otra realización particular, el transgén comprende adicionalmente en el extremo 3' la región 5'UTR del gen de la alcohol deshidrogenasa de arroz, más particularmente la

región 5'UTR del gen de la alcohol deshidrogenasa de arroz tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 17.

5 En otra realización particular, los huevos son huevos de un ave de corral, particularmente gallina.

Todas las realizaciones y limitaciones previamente descritas son igualmente aplicables a este aspecto.

10 **Huevo y ovoproductos**

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con un huevo y ovoproductos derivados de dicho huevo obtenidos según cualquier uso de la invención, concretamente del uso de la composición nutritiva o nutracéutico A, B o C, o usos de la parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes A, B o C.

20 Como entenderá el experto en la materia, los huevos de la invención son obtenidos tras alimentar un ave hembra con una composición nutritiva o nutracéutico A, B o C o con una planta de maíz enriquecida en antioxidantes A, B o C.

Todas las realizaciones y limitaciones previamente descritas son igualmente aplicables a este aspecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

25

Transformación del Maíz

Maíz

30 El maíz (*Zea mays*) variedad M37W (endospermo blanco) se obtuvo de CSIR, Pretoria, Sudáfrica. La línea de alto aceite NSL 30876 denominada R38 en la presente descripción fue proporcionado amablemente por el USDA, ARS, NCRPIS, la Universidad Estatal de Iowa, Estación Regional de Introducción de Plantas, Ames, Iowa, Estados Unidos, 50011-

1170. Ambas variedades, la línea transgénica seleccionada y los cruces, fueron cultivadas en el invernadero a 28 / 20°C temperatura día/temperatura noche con un fotoperíodo de 10-h y 60-90% de humedad durante los primeros 50 días, seguidos de mantenimiento en 21/18°C temperatura día/temperatura noche con un fotoperíodo de 16-h a partir de
5 entonces.

La línea M37-pH3 ha sido descrita anteriormente en ES2501367A2 y en Naqvi S. et al, PNAS, 2009 vol., 106, no. 19 páginas 7762-7767.

10 La línea M37-BKT fue cruzada con M37W y NSL30876 y generaciones homocigotos T2 y T3 fueron derivados por autofecundación. Se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C antes de su uso, muestras de endospermo de semillas inmaduras recogidas a los 30 días después de la polinización (DAP).

15 *Construcción de vectores y transformación*

1)-Construcción P326-Zmpsy1 que comprende el ADNc de fitoeno sintasa 1 de *Zea mays* dirigidos por el promotor de la glutenina LMW de trigo.

20 El ADNc PSY1 (fitoeno sintasa 1) de *Zea mays* (zm) fue clonado a partir de la línea consanguínea B73 por RT-PCR con el cebador directo 5'-AGGATCCATGGCCATCATACTCGTACGAG-3' (SEQ ID NO: 18) con el sitio BamHI (subrayado) y cebador inverso 5'-AGAATTCTAGGTCTGGCCATTTCTCAATG-3' (SEQ ID NO:19) con sitio EcoRI (subrayado). El plásmido P326-ZmPSY1 (Zhu et al. 2008 Proc Natl
25 Acad Sci USA 105:18232–18237) está bajo el control del promotor de la glutenina LMW (Colot et al. 1987 EMBO J 6:3559-3564).

2)- Construcción pHorP-RNAi-Zmlyce que comprende el fragmento largo de 417 pb del ARNm de licopeno épsilon-ciclasa de maíz (SEQ ID NO: 16) elegido para construir la
30 doble cadena de la construcción de ARNi conducida por el promotor de la D-hordeína de cebada SEQ ID NO: 12) junto con el gen de selección bar (SEQ ID NO: 5) conducido por el promotor del gen ubiquitina-1 del maíz (SEQ ID NO: 24).

Un fragmento de ADNc LYCE (licopeno épsilon ciclasa de maíz) se amplificó por RT-PCR con ADNc de ZmLYCE como plantilla utilizando el cebador directo (5'-ggaattctctagacgatctcggcgccgctcggctgct-3') (SEQ ID NO: 20) con los sitios EcoRI y XbaI (subrayado) y el cebador reverso (5'-gactagtggatcccaatgagacctacgtgagacct-3') (SEQ ID NO:21) con sitios SpeI y BamHI en base a información de la secuencia en GenBank (números de acceso EF622043 a fecha 4 septiembre 2009). Este ADN sentido se clonó en el vector pHorP (Sørensen et al. 1996 Molec Gen Genetics 250:750 –760) que contiene el promotor de la hordeína D de la cebada (SEQ ID NO: 12) con un fragmento de 306 pares de bases del gen *gusA* (SEQ ID NO: 25) y el terminador de la ADP-glucosa pirofosforilasa a través de la restricción con XbaI y BamHI y el fragmento de LYCE antisentido en sitios SpeI y EcoRI.

3)- Construcción pGZ63-sCrbkt, que comprende sCrbkt truncado y sintetizado químicamente (beta-caroteno cetolasa) de *Chlamydomonas reinhardtii* fusionado con la subunidad pequeña de la rubisco de guisante (SSU) y la región 5' no traducible (5'UTR) del gen de la alcohol deshidrogenasa del arroz, conducido por el promotor gamma-zeína de maíz (la secuencia útil del codón sCrbkt fue modificada para maíz).

El gen truncado β -caroteno cetolasa (sCrBKT) *Chlamydomonas reinhardtii* sintetizado químicamente (Zhong et al. 2011 J Exp Bot 62:3659-3669) se fusionó a la subunidad pequeña de guisante Rubisco (SSU) (Schreier et al. 1985 EMBO J 4:25-32) (el CrBKT y codón SSU se modificó a una preferencia de plantas monocotiledóneas, cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO: 22) y la región 5' no traducida (5'UTR) del gen de la alcohol deshidrogenasa de arroz (SEQ ID NO: 17)(Surgio et al. 2008 J Biosci Bioeng 105:300-302) se insertó en el vector pGZ63 (Zhu et al. 2008 Proc Natl Acad Sci USA 105:18232–18237) entre el promotor de γ -zeína y el terminador Nos utilizando los sitios de restricción BamHI y SacI.

4)- Construcción pGZ63-sBrctZ. El gen beta-caroteno hidroxilasa (sBrctZ) sintetizado químicamente de *Brevundimonas sp.* SD212 fusionado con la SSU (subunidad pequeña de la Rubisco) de guisante y 5'UTR del gen de la alcohol deshidrogenasa de arroz,

conducido por el promotor de maíz gamma-zeína específico del endospermo (los codones útiles del BrctZ se modificaron a tipo de planta dicotiledónea – colza).

El gen Crtz que codifica la beta-caroteno hidroxilasa de *Brevundimonas sp.* SD212 Strain
5 (MBIC 03.018) (Nishida et al. 2005 Appl Environ Microbiol 71:4286-4296) fue sintetizado
químicamente de acuerdo con el uso de codones de *Brassic napus* (número de acceso
AB377272 del a base de datos de GenBank 16, junio 2010) y amablemente
proporcionados por el Dr. Norihiko Misawa, Universidad de la Prefectura de Ishikawa,
Japón). El gen sBrCRTZ fusionado con la subunidad pequeña de Rubisco (SSU) de
10 guisante y la región 5'-no traducida (5'UTR) del gen de la alcohol deshidrogenasa de arroz
se digirió con BamHI y SacI. La quimera formada por Crtz con codones optimizados y
SSU corresponde a la SEQ ID NO: 23 Los fragmentos digeridos fueron clonados en el
sitio BamHI y SacI de pGZ63 con el promotor del gen de gamma zeína de maíz para
generar pGZ63-sBrCRTZ. El gen *bar* que codifica fosfinotricina N-acetiltransferasa
15 (Thompson et al., 1987 EMBO J 6:2513-2518) se utilizó como un marcador seleccionable.

El procedimiento utilizado para la transformación de maíz M37W se describe en Zhu et al.
2008, Proc Natl Acad Sci USA 105:18232–18237. Las plantas M37M-BKT- con mayor
acumulación de astaxantina se cruzaron con una línea de alta aceite (NSL30876) para
20 generar NSL30876-BKT.

Selección de la línea elite de producción de astaxantina y otros cetocarotenoides

La mejor línea BKT con alta producción de astaxantina y otros cetocarotenoides en el
25 endospermo fue elegida para los cruzamientos con la línea de maíz con alto nivel de
aceite NSL30876, también denominada R78 (Jugenheimer RW Euphytica 10 (1961): 152-
156, y el libro Specialty corns, Hallauer Arnel R. Capítulo 5 “High-oil corn hybrids” Robert
J. Lambert)

30 La línea híbrida NSL30876 x M37W BKT (F3) sobreexpresante produjo niveles de
astaxantina de hasta 18.83µg/g peso seco. La cantidad de cetocarotenoides totales
alcanzó aproximadamente 35µg/g peso seco (más del 73% del total de carotenoides -
48.63µg/g peso seco). Fue confirmada la expresión específicamente en el endospermo

del maíz mediante análisis de ARNm de transferencia de todos los transgenes introducidos involucrados en la ruta metabólica diana.

Análisis de la calidad de huevo

- 5 Para determinar la calidad del huevo se midió el grosor de la cáscara mediante un micrómetro específico 4001-DIG (Baxlo Precisión, Polinya, España), con una sensibilidad de 1 μ y provisto de contactos para superficies curvas. El peso del huevo, el color según la ESCALA DSM (del inglés DSM yolk color fan (DYCF), la altura del albúmen y las Unidades Haugh (UH = 100 x Log [Altura de la clara densa -1.7 x (peso huevo) 0,37 +
- 10 7,57] se midieron con el Egg Analyzer™ (ORKA Technology Ltd., Ramat Hasharon, Israel).

Análisis de carotenoides

- 15 Las muestras para el análisis de carotenoides se recogieron el día 0 del experimento para comprobar el nivel de carotenos de la yema de huevo que tenían los animales en granja, a día 13 para poder comprobar si el periodo de depleción había conseguido disminuir los carotenos en la yema, y a día 20 y 30 para ver la evolución y diferencias en las cantidades de carotenos de los distintos tratamientos experimentados. Las muestras se congelaron a
- 20 -80°C, posteriormente se liofilizaron y se enviaron a analizar. La técnica de análisis fue la siguiente:

- Los carotenoides totales, fueron extractados en 20 ml de metanol conteniendo un 6% de KOH a 60°C y durante 15-20 minutos. Los compuestos lipofílicos, se separaron en una
- 25 solución con 30% de éter en petróleo y la fase superior fue recogida. Los carotenoides totales fueron determinados midiendo la absorbancia a 450 nm. Para la separación por HPLC, el solvente fue evaporado en vapor de nitrógeno a 37°C, disuelto en 100 μ L de metanol/diclorometano (50:50) y una alícuota de 20 μ l fue inyectada inmediatamente. Los compuestos fueron separados en una columna de 15 cm Nucleosil C18 3- μ con
- 30 acetonitril/metanol/2-propanol (85:15:5) v/v/v en fase móvil a 20°C. Las muestras fueron monitorizadas con un Kontron DAD 440 fotodiodo detector, con registro online del espectro. Todos los carotenoides fueron identificados por cromatografía con compuestos auténticos de referencia, los cuales fueron biosintetizados en *E.coli* como describe

Sandmann (Sandmann, G. (2002) Combinatorial biosynthesis of carotenoids in a heterologous host: a powerful approach for the biosynthesis of novel structures. ChemBioChem. 3: 629–635) y sus espectros fueron comparados. Esos estándares también fueron usados para la cuantificación, en combinación con los coeficientes de extinción de Davies (Davies, B.H. (1976) Carotenoids. In: Chemistry of Plant Pigments (Goodwin, T.W., ed), pp. 149–155. London, UK: Academic Press). El retinol fue comprado a Sigma Chemicals. El ácido retinoico conjugado (RAC), derivado del retinol, fue identificado por el espectro típico del ácido retinóico con picos máximos a 328, 350 y 368 nm. Fue cuantificado usando retinol como estándar con corrección por el coeficiente de extinción mM para el retinol (45,0 para 325 nm) y ácido retinóico (53,5 para 350 nm)

EJEMPLO 1

Como se demuestra a continuación es posible el aporte de Vitamina A, carotenos y cetocarotenoides a las gallinas ponedoras de forma exclusiva y completa a través del maíz incorporado en la dieta, mediante el uso de dos variedades obtenidas por ingeniería genética y que expresan elevadas cantidades de carotenos y cetocarotenoides. La suficiencia en el aporte de carotenos desde el punto de vista del consumidor viene marcada cuando se alcanzan los valores comerciales habituales de color amarillo-naranja en la yema de huevo fresco y que se miden generalmente de acuerdo con la escala la escala DSM (en inglés DSM yolk color fan (DYCF)) de color.

Las dos variedades de maíz estudiadas son las siguientes: M37W-Ph-3 y NSL30876 x BKT.

25

Los carotenoides mayores en la línea silvestre NSL30876 son luteína y zeaxantina y de la línea silvestre M37W luteína y zeaxantina

La líneas transgénicas desarrolladas presentan los siguientes carotenoides:

- 30
- BKT: violaxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina, β -caroteno, astaxantina, cantaxanthin, β -cryptoxantina, Z-fitoeno, Adonixantina, adonirubina, 3-OH-equinenona, β -zeacaroteno, fitoeno
 - M37W-Ph-3: luteína, zeaxantina, β -carotenos, licopeno y alfa y beta criptoxantina

- NSL30876 x BKT: astaxantina violaxantina, antheraxantina , luteína, zeaxantina, β -caroteno, β -cryptoxantina, 3-OH-equinenona y otros cetocarotenoides como cantaxantina, adonixantina, adonirubina

5 El ensayo se realizó con gallinas ponedoras de tipo comercial en las instalaciones de la Universidad de Lleida (España). En las dietas experimentales se usó un 62% de maíz. Los diferentes tipos de maíz empleados fueron los siguientes: maíz isogénico control blanco, maíz M37W-Ph-3, maíz NSL30876 x BKT y maíz estándar comercial. Se recogieron muestras de pienso, de yemas de los huevos y de hígados que se liofilizaron
10 para su posterior análisis de carotenos

Se determinó el contenido en carotenos en muestras de pienso (Figura 1) yema de huevos (Figura 2) y en hígados liofilizados (Figura 3).

15 El uso en la dieta de las gallinas ponedoras de maíz rico en pigmentos antioxidantes, (M37W-Ph-3) producen huevos con una mayor calidad nutricional derivada del aporte de carotenoides (57,5 $\mu\text{g/g}$ de materia seca de yema).

El uso en la dieta de las gallinas ponedoras de maíz rico en antioxidantes, NSL30876 x
20 BKT produce huevos con una mayor calidad nutricional derivada del aporte de carotenoides (24,49 $\mu\text{g/g}$ de materia seca de yema).

En cambio la variedad salvaje de maíz blanco M37W produce huevos de yema decolorada, (Valor DSM <1) y concentración total de carotenoides en la yema 1,81 $\mu\text{g/g}$
25 de materia seca de yema).

El uso en la dieta de las gallinas ponedoras de maíz rico en antioxidantes, M37W-Ph-3 produce yemas de huevos con alto contenido en zeaxantina (29,89 $\mu\text{g/g}$ de materia seca de yema).
30

El uso en la dieta de las gallinas ponedoras de maíz rico en antioxidantes, NSL30876 *BKT produce yemas de huevos con alto contenido en carotenos, zeaxantina (10,77 \pm 1,33

µg/g de materia seca de yema) y cetocarotenos, astaxantina (6,56±0,56 µg/g de materia seca de yema)

En la tabla 1 se pueden observar los datos de calidad del huevo al Inicio (a la entrada del experimento, ya que las gallinas provenían de una granja con pienso estándar de ponedoras), Depleción (a los 13 días del ensayo después de la ingestión del pienso con maíz blanco maíz control blanco, M37W y Tratamiento (después del final del ensayo y de 20 días de consumo de los piensos elaborados con los diferentes tipos de maíz.

10 En el experimento no se observaron diferencias en los distintas medidas de calidad del huevo excepto en el color según ESCALA DSM, en el que se observa que se llegan a conseguir los valores comerciales previos e incluso superarlos en el color de la yema en ambos casos con sólo el maíz (M37W-Ph-3 y NSL30876xBKT).

		M37W	M37W-Ph3	NSL30876xBKT	Maíz comercial
Peso huevo (g)	Inicio	63,81±1,124	61,76±1,531	64,75±1,478	65,17±1,350
	Depleción	60,90±1,682	61,35±1,578	64,05±1,281	64,91±1,523
	Tratamiento	68,06±1,352	63,71±1,168	66,85±1,274	68,92±1,479
Resistencia rotura (Kg)	Inicio	3,35±0,245	3,23±0,405	3,53±0,314	3,68±0,190
	Depleción	3,01±0,157	3,86±0,215	3,81±0,227	3,56±0,280
	Tratamiento	3,71±0,258	3,87±0,195	3,81±0,146	3,25±0,185
Altura albúmen (Hmm)	Inicio	5,88±0,340	6,59±0,636	6,16±0,632	6,98±0,296
	Depleción	5,12±0,322	5,72±0,275	5,58±0,367	5,62±0,256
	Tratamiento	6,08±0,417	5,70±0,229	5,01±0,511	5,56±0,214
Color DSM	Inicio	9,83±0,207	9,86±0,143	10,13±0,227	10,11±0,000
	Depleción	1,08±0,077	1,33±0,256	1,64±0,308	1,00±0,261
	Tratamiento	1,25±0,250	10,08±0,313	11,38±0,241	4,22±0,222

Unidades Haugh	Inicio	73,97±2,608	74,61±4,728	74,80±4,943	81,10±2,472
	Depleción	69,02±3,073	75,28±1,578	70,76±2,983	71,97±1,794
	Tratamiento	73,08±3,328	69,73±3,335	66,22±3,601	69,69±1,787
Grosor cáscara (mm)	Inicio	320,33±10,227	315,29±22,561	343,25±11,965	319,67±13,317
	Depleción	347,36±7,443	339,12±11,078	356,68±11,242	332,60±7,294
	Tratamiento	359,58±19,434	357,46±10,377	364,08±10,117	359,25±10,547

Tabla 1.

Durante el ensayo, el color de la yema se determinó obteniendo las coordenadas L*, a*, b* en el espacio CIELAB mediante un colorímetro Konica Minolta CM-700d (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) con un área de medida de 8 mm, iluminante D65 y ángulo de observación de 10°. Como contenedor de la yema se utilizó una cápsula de cristal óptico cilíndrica de 34 mm de diámetro (Hellma, Müllheim, Germany).

En la tabla 2 se muestran los valores de L*, a* y b* medios para cada tratamiento al final del experimento (días 32 y 33 del experimento). Se puede apreciar que la L* se mantiene constante en todos los tratamientos, en cambio los valores de a* y b* fluctúan según el tratamiento y el contenido de carotenos presentes en los maíces de las dietas.

	L*	a*	b*
M37W	57,96±0,598	-1,16±0,073	9,72±0,951
M37W-Ph3	51,69±0,554	10,82±0,435	22,67±1,407
NSL30876 x BKT	49,37±0,938	13,63±0,620	17,45±0,895
Maíz comercial	56,78±0,696	3,58±0,176	25,43±2,382

Tabla 2.

El uso de las variedades de maíz M37W-Ph-3 y NSL30876 x BKT a concentraciones del 62% en la dieta hace innecesario el uso de los pigmentos exógenos para conseguir

huevos con yemas dentro de la gama de color aceptada por el consumidor. Este efecto no es conseguido por el maíz estándar convencional empleado en la misma proporción en la dieta.

- 5 El empleo de las variedades de maíz desarrolladas, permite reducir el coste de pienso fabricado al eliminar el coste que supone añadir los carotenos exógenamente y simplifica el proceso de fabricación de pienso.

El término “Sequence listing” en la lista de secuencias se refiere a “Lista de secuencias”, “Artificial Sequence” a “Secuencia artificial” y el término “DNA” se refiere a “ADN”.

REIVINDICACIONES

- 1- Composición nutritiva o nutracéutico que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma.
- 5
- 2- Composición según la reivindicación 1 que comprende al menos entre un 50 y un 80% de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma
- 10
- 3- Composición según la reivindicación 2 que comprende al menos entre un 60 y un 70% de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma.
- 15
- 4- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la parte de la planta de maíz es el endospermo, la semilla o derivados de los mismos.
- 5- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde los antioxidantes parte de una planta de maíz son carotenoides.
- 20
- 6- Composición según la reivindicación 5 en donde los carotenoides se seleccionan del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina y combinaciones de los mismos.
- 25
- 7- Composición según la reivindicación 6 en donde la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es una planta de maíz transgénica que expresa al menos un transgén que codifica una fitoeno sintasa y un transgén que codifica una caroteno desaturasa.
- 30
- 8- Composición según la reivindicación 7 en donde la planta de maíz expresa adicionalmente un transgén seleccionado del grupo formado por un transgén que codifica una licopeno β -ciclase, un transgén que codifica una β -caroteno hidroxilasa y un transgén que codifica una carotenoide cetolasa.

- 9- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en donde las secuencias de los transgenes tienen adaptados los codones para su expresión en plantas.
- 5 10- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 en donde el transgén que codifica la fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgén que codifica la caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, el transgén que codifica la licopeno β -ciclasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3, el transgén que codifica la β -caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:15 y el transgén que codifica la carotenoide cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:7.
- 10
- 11- Composición según la reivindicación 10, en donde si el transgén que codifica la caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, entonces la caroteno desaturasa forma parte de una proteína de fusión que comprende en posición N con respecto a la caroteno desaturasa una secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto.
- 15
- 12- Composición según la reivindicación 11 en donde la secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto es la secuencia de la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa.
- 20
- 13- Composición según la reivindicación 12 en donde la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 8.
- 25
- 14- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13 en donde al menos uno de los transgenes presenta adicionalmente en el extremo 3' una secuencia terminadora de la transcripción.
- 30

- 15- Composición según la reivindicación 14 en donde la secuencia terminadora de la transcripción es la secuencia terminadora del gen que codifica nopalina sintasa o la secuencia terminadora del gen que codifica la ADP-glucosa pirofosforilasa.
- 5 16- Composición según la reivindicación 15 en donde la secuencia terminadora de nopalina sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9 y la secuencia terminadora de ADP- glucosa pirofosforilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 10.
- 10 17- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16 en donde al menos uno de los transgenes se encuentra bajo el control de un promotor específico de endospermo.
- 15 18- Composición según la reivindicación 17 en donde el promotor específico de endospermo es el promotor de D-hordeína o el promotor de LMW glutenina.
- 19- Composición según la reivindicación 18 en donde el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12 y el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.
- 20 20- Composición según la reivindicación 5 en donde los carotenoides se seleccionan del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno, fitoeno y combinaciones de los mismos.
- 25 21- Composición según la reivindicación 20 en donde la planta de maíz enriquecida en antioxidantes expresa un transgén que codifica una fitoeno sintasa, un transgén que codifica una beta caroteno cetolasa y un transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa
- 30 22- Composición según la reivindicación 21 en donde la planta de maíz enriquecida en antioxidantes expresa adicionalmente un ARNi específico de la licopeno épsilon ciclasa de maíz.

- 5 23- Composición según la reivindicación 5 en donde los carotenoides se seleccionan del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona y combinaciones de los mismos.
- 10 24- Composición según la reivindicación 23 en donde la planta de maíz enriquecida en antioxidantes procede del cruzamiento entre una línea de maíz con alto nivel de aceite y un maíz que expresa un transgén que codifica una fitoeno sintasa, un transgén que codifica una beta caroteno cetolasa y un transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa.
- 15 25- Composición según la reivindicación 24 en donde la planta de maíz que expresa un transgén que codifica una fitoeno sintasa, un transgén que codifica una beta caroteno cetolasa y un transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa expresa adicionalmente un ARNi específico de la licopeno épsilon ciclasa de maíz.
- 20 26- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 24 o 25 en donde la línea de maíz con alto nivel de aceite es la línea NSL30876.
- 25 27- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 21, 22, 24-26 en donde las secuencias de los transgenes tienen adaptados los codones para su expresión en plantas.
- 30 28- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 21, 22-27 en donde el transgén que codifica una fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgén que codifica una beta caroteno cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14, el transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15 y el ARNi específico de la licopeno épsilon ciclasa de maíz con secuencia SEQ ID NO: 16.

- 29- Composición según la reivindicación 28, en donde si el transgén que codifica una beta caroteno cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14 y/o el transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15, entonces la proteína codificada por dichos genes se encuentra formando parte de una proteína de fusión que comprende una secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto.
- 5
- 30- Composición según la reivindicación 29 en donde la secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto es la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa.
- 10
- 31- Composición según la reivindicación 30 en donde la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:8.
- 15
- 32- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 21,22,24-31 en donde al menos un transgén o ARNi se encuentran bajo el control de un promotor específico de endospermo.
- 20
- 33- Composición según la reivindicación 32 en donde el promotor específico de endospermo se selecciona de entre el promotor de D-hordeína, el promotor de LMW glutenina y el promotor de gamma-zeina.
- 25
- 34- Composición según la reivindicación 33 en donde el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12, el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11 y el promotor de gamma-zeina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13.
- 30
- 35- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 21, 22, 24-34 en donde el transgén comprende adicionalmente en el extremo 3' la región 5'UTR del gen de la alcohol deshidrogenasa de arroz.

- 36- Composición según la reivindicación 35 en donde la región 5'UTR del gen de la alcohol deshidrogenasa de arroz tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 17.
- 5 37- Uso de una composición nutritiva o nutracéutico según cualquiera de las reivindicaciones 1-36 para la obtención de huevos enriquecidos en antioxidantes.
- 38- Uso según la reivindicación 37 en donde los huevos son huevos de un ave de corral.
- 10 39- Uso según la reivindicación 38 en donde el ave de corral es gallina.
- 40- Uso de una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma para la obtención de huevos enriquecidos en antioxidantes.
- 15 41- Uso según la reivindicación 40 en donde la parte de la planta de maíz es el endospermo, la semilla o derivados de los mismos.
- 42- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 40-41 en donde los antioxidantes en una parte de una planta de maíz son carotenoides.
- 20 43- Uso según la reivindicación 42 en donde los carotenoides se seleccionan del grupo formado por β -caroteno, γ -caroteno, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina, licopeno, luteína, zeaxantina y combinaciones de los mismos.
- 25 44- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 40-43 en donde en donde la planta de maíz enriquecida en antioxidantes es una planta de maíz transgénica que expresa al menos un transgén que codifica una fitoeno sintasa y un transgén que codifica una caroteno desaturasa.
- 30 45- Uso según la reivindicación 44 en donde la planta de maíz expresa adicionalmente un transgén seleccionado del grupo formado por un transgén que codifica una licopeno β -ciclase, un transgén que codifica una β -caroteno hidroxilasa y un transgén que codifica una carotenoide cetolasa.

- 46- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 44 a 45 en donde las secuencias de los transgenes tienen adaptados los codones para su expresión en plantas.
- 5 47- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 44-46 en donde el transgén que codifica la fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, el transgén que codifica la caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, el transgén que codifica la licopeno β -ciclasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:3, el transgén que codifica la β -caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:6 y/o el transgén que codifica la carotenoide cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:7.
- 10
- 48- Uso según la reivindicación 47 en donde si el transgén que codifica una caroteno desaturasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 entonces la proteína codificada por dicho gen se encuentra formando parte de una proteína de fusión que comprende en el extremo 5' una secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto.
- 15
- 49- Uso según la reivindicación 48 en donde la secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto es la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa.
- 20
- 50- Uso según la reivindicación 49 en donde la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 8.
- 25
- 51- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 44-50 en donde el transgén presenta adicionalmente en el extremo 3' una secuencia terminadora de la transcripción.
- 30
- 52- Uso según la reivindicación 51 en donde la secuencia terminadora de la transcripción es la secuencia terminadora de nopalina sintasa o la secuencia terminadora de ADP-glucosa pirofosforilasa.

- 53- Uso según la reivindicación 52 en donde la secuencia terminadora de nopalina sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 9 y la secuencia terminadora de ADP- glucosa pirofosforilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 10.
- 5
- 54- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 44-53 en donde al menos un transgén se encuentra bajo el control de un promotor específico de endospermo.
- 55- Uso según la reivindicación 54 en donde el promotor específico de endospermo es el promotor de D-hordeína o el promotor de LMW glutenina.
- 10
- 56- Uso según la reivindicación 55 en donde el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 12 y el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11.
- 15
- 57- Uso según la reivindicación 42 en donde los carotenoides se seleccionan del grupo formado por astaxantina, violaxantina, anteraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona, zeaxantina, Z-fitoeno, fitoeno y combinaciones de los mismos.
- 20
- 58- Uso según la reivindicación 57 en donde la planta de maíz enriquecida en antioxidantes expresa un transgén que codifica una fitoeno sintasa, un transgén que codifica una beta caroteno cetolasa y un transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa
- 25
- 59- Uso según la reivindicación 58, en donde planta de maíz enriquecida en antioxidantes expresa adicionalmente un ARNi específico de la licopeno épsilon ciclasa de maíz.
- 30
- 60- Uso según la reivindicación 42 en donde los carotenoides se seleccionan del grupo formado por astaxantina, violaxantina, antheraxantina, luteína, beta-caroteno, cantaxantina, beta-criptoxantina, adonixantina, adonirubina, 3-OH equinenona y combinaciones de los mismos.

- 5 61- Uso según la reivindicación 60 en donde la planta de maíz enriquecida en antioxidantes procede del cruzamiento entre una línea de maíz con alto nivel de aceite y un maíz que expresa un transgén que codifica una fitoeno sintasa, un transgen que codifica una beta caroteno cetolasa, un transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa.
- 10 62- Uso según la reivindicación 61, en donde la planta de maíz enriquecida en antioxidantes expresa adicionalmente un ARNi específico de la licopeno épsilon ciclase de maíz.
- 15 63- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 61 o 62 en donde la línea de maíz con alto nivel de aceite es la línea NSL30876.
- 15 64- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 58, 59, 61-63 en donde las secuencias de los transgenes tienen adaptados los codones para su expresión en plantas.
- 20 65- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 58,59,61-64 en donde el transgén que codifica una fitoeno sintasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13, el transgén que codifica una beta caroteno cetolasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 14, el transgén que codifica una beta caroteno hidroxilasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15 y/o el ARNi específico de la licopeno épsilon ciclase de maíz con secuencia SEQ ID NO: 16.
- 25 66- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 58, 59,61-66 en donde al menos un transgén o ARNi se encuentran bajo el control de un promotor específico de endospermo.
- 30 67- Uso según la reivindicación 66 en donde el promotor específico de endospermo se selecciona de entre el promotor de D-hordeína, el promotor de LMW glutenina y el promotor de gamma-zeina.

- 5 68- Uso según la reivindicación 67 en donde el promotor de D-hordeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:12 , el promotor de LMW glutenina tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 11 y el promotor de gamma-zeína tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13.
- 10 69- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 58, 59, 61-68 en donde si el transgén que codifica para una beta caroteno cetolasa tiene la secuencia SEQ ID NO: 14 y/o el transgén que codifica para la beta caroteno hidroxilasa tiene la secuencia SEQ ID NO: 15, entonces el transgén presenta en el extremo 5' una secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto.
- 15 70- Uso según la reivindicación 69 en donde la secuencia para el direccionamiento de proteínas al cloroplasto es la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa.
- 20 71- Uso según la reivindicación 70 en donde la secuencia que codifica la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 8.
- 25 72- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 58, 59, 61-71 en donde el transgén comprende adicionalmente en el extremo 3' la región 5'UTR del gen de la alcohol deshidrogenasa de arroz.
- 73- Uso según la reivindicación 72 en donde la región 5'UTR del gen de la alcohol deshidrogenasa de arroz tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 17.
- 74- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 40-73 donde los huevos son huevos de un ave de corral.
- 30 75- Uso según la reivindicación 74 en donde el ave de corral es gallina.
- 76- Huevo y ovoproductos derivados de dicho huevo obtenidos según cualquiera de las reivindicaciones 37-75.

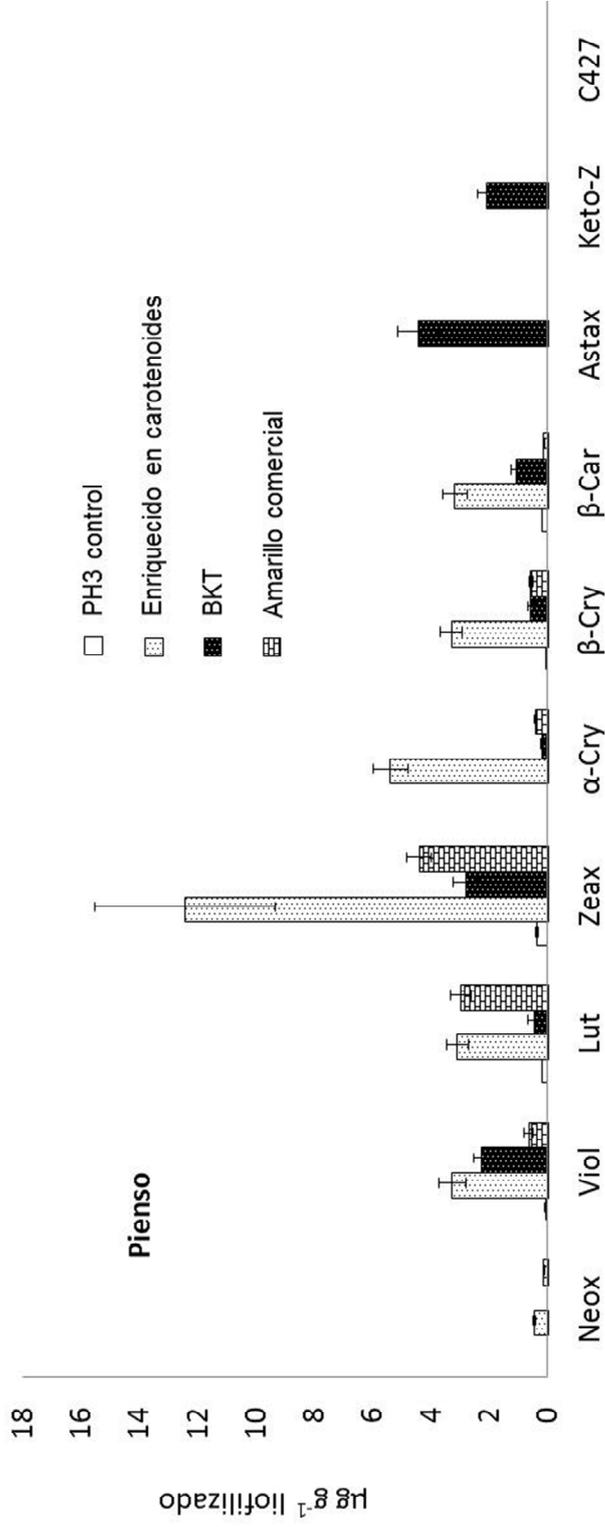


Fig. 1

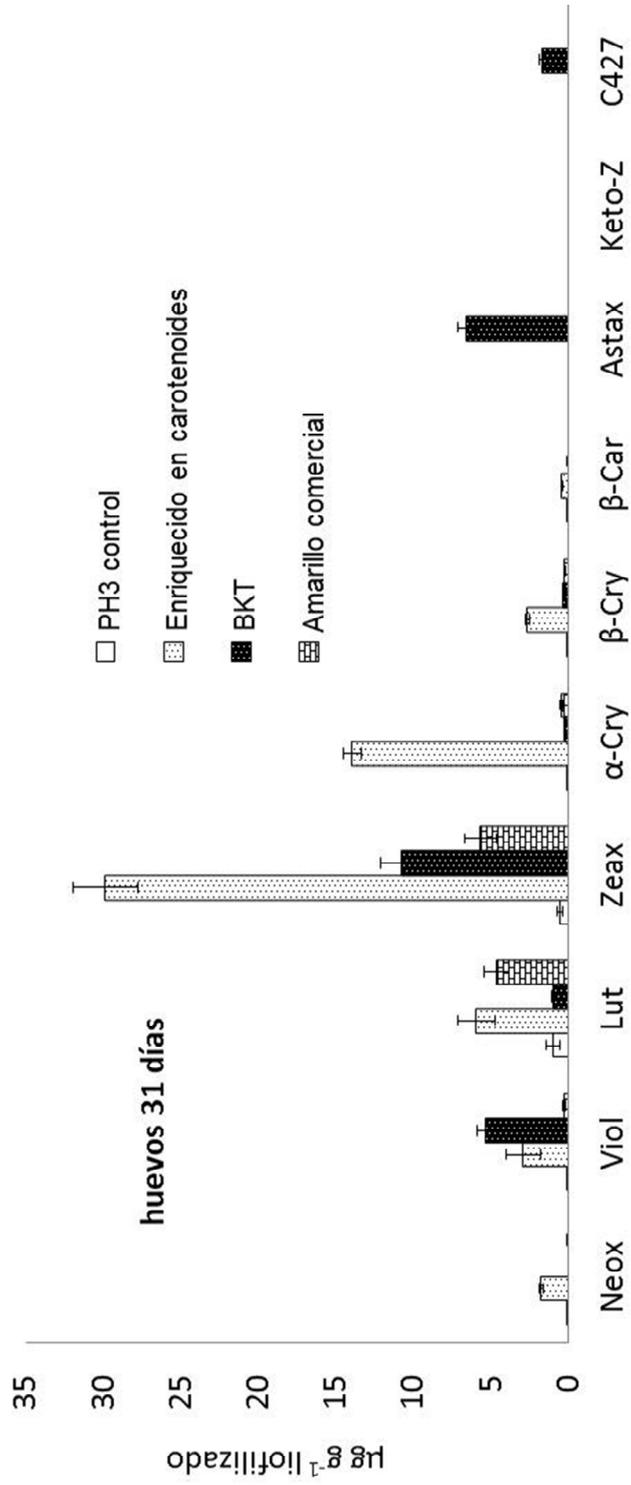


Fig. 2

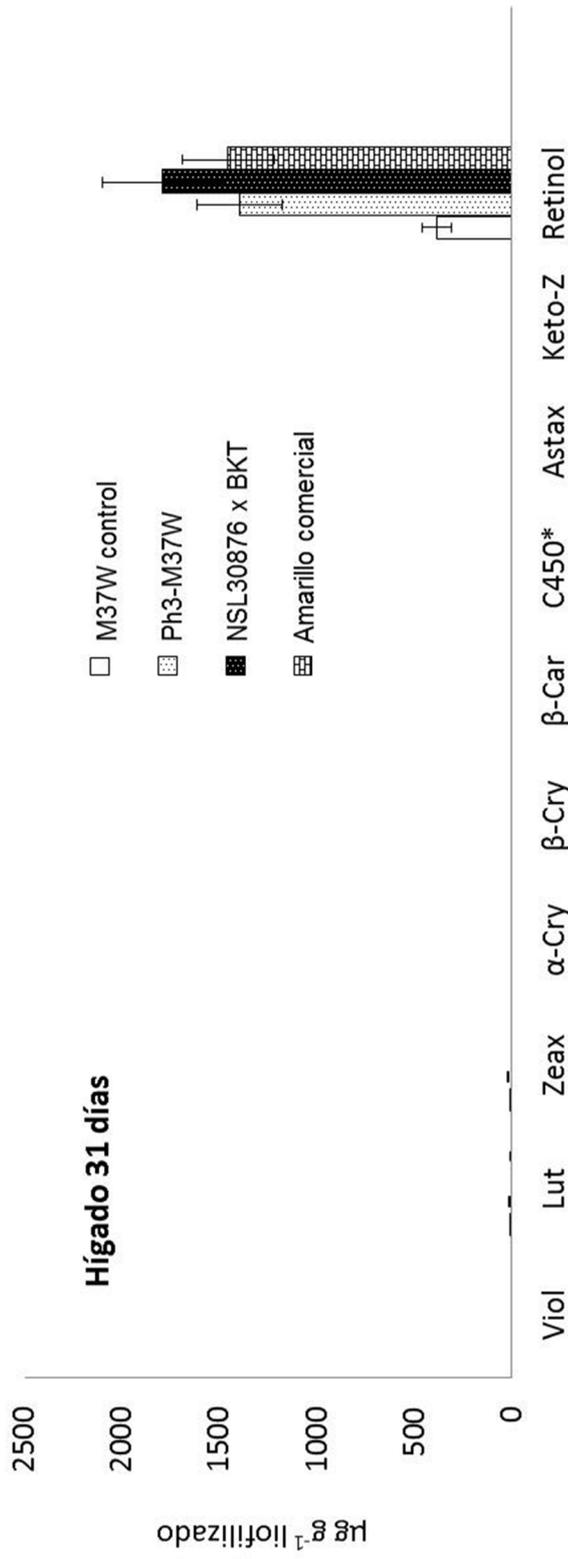


Fig. 3

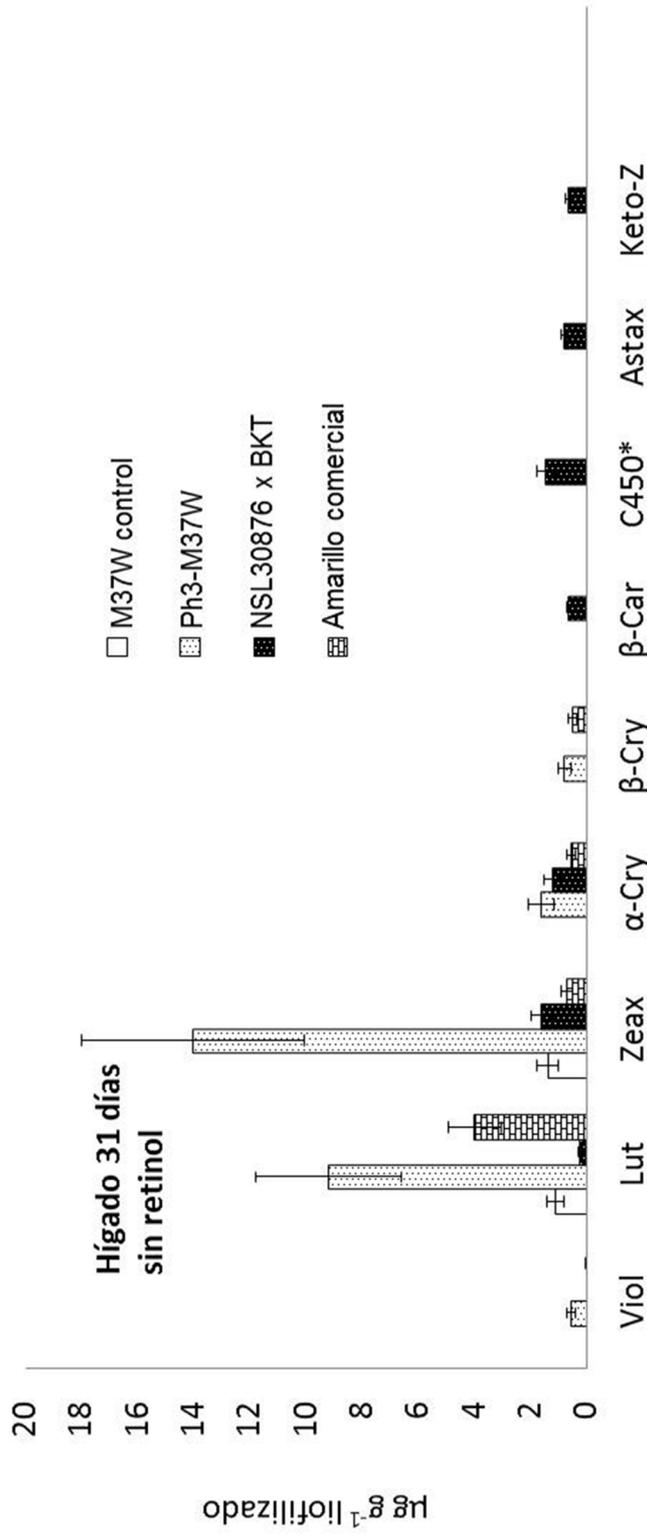


Fig. 4

Lista de Secuencias

<110> UNIVERSITAT DE LLEIDA
 AGROTECNIO
 5 INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS (ICREA)

<120> MAIZ ENRIQUECIDO EN ANTIOXIDANTES PARA MEJORAR LA CALIDAD
 NUTRICIONAL DEL HUEVO

10 <130> P11387ES00

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1
 <211> 1233
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> Transgén que codifica la fitoeno sintasa de maíz

<400> 1

25 atggccatca tactcgtacg agcagcgtcg ccggggctct ccgccgccga cagcatcagc 60
 caccagggga ctctccagtg ctccaccctg ctcaagacga agaggccggc ggcgcgccgg 120
 tggatgccct gctcgtcctt tggcctccac ccgtgggagg ctggccgtcc ctccccgcc 180

30 gtctactcca gcctcgccgt caaccggcg ggagaggccg tcgtctcgtc cgagcagaag 240
 gtctacgacg tcgtgctcaa gcaggccgca ttgctcaaac gccagctgcg cacgccggtc 300

35 ctcgacgcca ggccccagga catggacatg ccacgcaacg ggctcaagga agcctacgac 360
 cgctgccggc agatctgtga ggagtatgcc aagacgtttt acctcggaac tatgttgatg 420

40 acagaggagc ggcgccgcgc catatgggcc atctatgtgt ggtgtaggag gacagatgag 480
 cttgtagatg ggccaaacgc caactacatt acaccaacag ctttggaccg gtgggagaag 540

agacttgagg atctgttcac gggacgtcct tacgacatgc ttgatgccgc tctctctgat 600

45 accatctcaa ggttccccat agacattcag ccattcaggg acatgattga agggatgagg 660
 agtgatctta ggaagacaag gtataacaac ttcgacgagc tctacatgta ctgctactat 720

50 gttgctggaa ctgtcggggtt aatgagcgta cctgtgatgg gcatcgcaac cgagtctaaa 780
 gcaacaactg aaagcgtata cagtgtgcc ttggctctgg gaattgcgaa ccaactcacg 840
 aacatactcc gggatggttg agaggatgct agaagaggaa ggatatatatt accacaagat 900

ES 2 558 953 B1

	gagcttgcac aggcagggct ctctgatgag gacatcttca aaggggtcgt cacgaaccgg	960
	tggagaaact tcatgaagag gcagatcaag agggccagga tgttttttga ggaggcagag	1020
5	agaggggtaa ctgagctctc acaggctagc agatggccag tatgggcttc cctgttgttg	1080
	tacaggcaga tcctggatga gatcgaagcc aacgactaca acaacttcac gaagagggcg	1140
10	tatgttggta aaggaagaa gttgctagca cttcctgtgg catatggaaa atcgctactg	1200
	ctcccatgtt cattgagaaa tggccagacc tag	1233
15	<210> 2 <211> 1479 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
20	<220> <223> Transgén que codifica la caroteno desaturasa de Erwinia uredovora	
25	<400> 2 atgaaaccaa ctacggtaat tggatgcaggc ttcggtggcc tggcactggc aattcgtcta	60
	caagctgctg ggatccccgt cttactgctt gaacaacgtg ataaaccgg cggctgggct	120
	tatgtctacg aggatcaggg gtttacctt gatgcaggcc cgacggttat caccgatccc	180
30	agtgccattg aagaactggt tgcaactggca ggaaaacagt taaaagagta tgtogaactg	240
	ctgccgggta cgccgtttta ccgcctgtgt tgggagtcag ggaaggtcct taattacgat	300
35	aacgatcaaa cccggctcga agcgcagatt cagcagttta atccccgcga tgtcgaaggt	360
	tatcgtcagt ttctggacta ttcacgcgcg gtgtttaaag aaggctatct aaagctcgg	420
	actgtccctt ttttatcggt cagagacatg cttcgcgcgg cacctcaact ggcgaaactg	480
40	caggcatgga gaagcgttta cagtaagggt gccagttaca tcgaagatga acatctgcgc	540
	caggcgtttt ctttccactc gctgttggtg ggcggcaatc ccttcgccac ctcattcatt	600
45	tatacgttga tacacgcgct ggagcgtgag tggggcgtct ggtttccgcg tggcggcacc	660
	ggcgcattag ttcaggggat gataaagctg tttcaggatc tgggtggcga agtcgtgta	720
	aacgccagag tcagccatat ggaaacgaca ggaaacaaga ttgaagccgt gcatttagag	780
50	gacggctcga ggttctgac gcaagccgtc gcgtaaatg cagatgtggt tcatacctat	840
	cgcgacctgt taagccagca ccctgccgcg gttaagcagt ccaacaaact gcagactaag	900
	cgcatgagta actctctggt tgtgctctat tttggtttga atcaccatca tgatcagctc	960

ES 2 558 953 B1

	gcgcatcaca cggtttgttt cggcccgcgt taccgcgagc tgattgacga aatTTTTaat	1020
5	catgatggcc tcgcagagga cttctcactt tatctgcacg cgccctgtgt cacggattcg	1080
	tcaactggcgc ctgaaggttg cggcagttac tatgtgttgg cgccggtgcc gcatttaggc	1140
	accggaacc tcgactggac ggttgagggg ccaaaactac gcgaccgtat ttttgcgtac	1200
10	cttgagcagc attacatgcc tggcttacgg agtcagctgg tcacgcaccg gatgtttacg	1260
	ccgtttgatt ttcgcgacca gcttaatgcc tatcatggct cagccttttc tgtggagccc	1320
15	gttcttacc agagcgcctg gtttcggccg cataaccgcg ataaaacat tactaatctc	1380
	tacctggctg gcgcaggcac gcatcccggc gcaggcattc ctggcgtcat cggctcggca	1440
	aaagcgacag caggtttgat gctggaggat ctgatatga	1479
20	<210> 3	
	<211> 2272	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Transgén que codifica la licopeno beta-ciclasa de Gentiana lutea	
30	<400> 3	
	ctcgcaggat catacgcact tcatcagttc atccacattt cactgcaagc tcacatccac	60
	aatctccaag acacatgctg ctaattccca tcatagaaaa cccgaaaacg gaaacggccc	120
35	ctcagatttt tagattacaa tcagttcaat ggtgagtctg caaattgttt ctagtaattt	180
	atctcctgta ggcagagata gcacttcaat tttatcagca gttttcaatc tottgatgta	240
	gttgaactcg agccaattct cgaaattcag tttgctttct gggcaacaat tggaaattcc	300
40	at ttggtttc tgaagaaata aagtacacc aatagagaaa agatggatac tttagtgaaa	360
	acaccaaata agcttgaatt tctgcaccct ttatgtgggt ttgttgataa agtctgctcc	420
45	tttagctggt tgaggtctca taatcaagaa tacaataagt atttcttgaa gaagtctcat	480
	ctgaaaacgg gtagtaaaaa gggcttttgt gttaaggctg gaagtagcag tgctatTTTg	540
	gagcttgTtc ctgaaactaa aatggagaat cttgaatttg agctcccatt atttgatcac	600
50	tcaaaagggga tagtcgttga tttggctatt gttggtggtg gtctctccgg acttgctgTt	660
	gcacaacagg tttccgaggc ggggctttcg gtttgttcta ttgatccatc tccaaaactg	720
	at ttggccaa acaattatgg tgtttgggtt gatgaatttg aggccatgga tttattagat	780

ES 2 558 953 B1

	tgccttgatg ctacatggtc tggagcagtt gtatttatag acgaccataa aagtaaagat	840
5	ctcgggaaggc cgtatggaag ggtaaatagg aagcagttga aatctaaaat gatgcaaaaa	900
	tgcatatcga atgggtgtgaa gtttcataaa gctaaagtgt tgaaagttac tcacgaggaa	960
	tcaaaatcat tagtaatttg taacgatggc gttactattc aagctgctgt ggttcttgat	1020
10	gcaaccgggtt tttctagatg tttggttcaa tataataagc catataatcc tggttatcag	1080
	gtggcttatg ggatttttagc tgaagtagaa gaacaccctt ttgatataaa caagatgggt	1140
15	ttcatggatt ggcgcgattc acatcttaac aataacacaa acctaaagga aagaaacaga	1200
	aaggtgceca cttttcttta tgccatgcca ttttctaaag acaaaatfff tctagaagaa	1260
	acgtcccttg tagctcgtcc cgggttggca atagaagata tccaagagag gatggttgct	1320
20	cgattaaggc acctcgggat aaaagtgaat tccatcgaag aagatgagcg ttgtgtgatt	1380
	ccaatggggg gtccacttcc tgtaatacct cagagagtag ttggaatagg tgggtactgca	1440
25	ggaatggttc atccatcaac tggttatatg gtagcaagaa ctcttgccagc agcaccatt	1500
	gttgctaattg cgatagtgcg atatcttggg tccgaaaaga ggcatttagg tgctgagtta	1560
	tctgggtgaag tttggaaaga tttgtggcca attgagagga gacgccaag ggaattcttc	1620
30	tgttttggca tggatatatt gcttaagctt gatttagatg cttaagaag atttttcgat	1680
	gcattttttg atttagagcc tcgatattgg catggattct tgtcttctcg gctatttctt	1740
35	ccagagctgg ctttatttgg gctttctctt ttctctcatg ctaccaacac ctcaaggctt	1800
	gaaataatgt caaaaggaac gcttctctt ataaatatga taaacaactt attgcgggac	1860
	aaagaataac cgaaaacagg ttcattatta ttcttactca ttcaagtggg tactggcatg	1920
40	atgaagccat tggattata aagctttatt ctctcttttg ttcattctgt ttacattcaa	1980
	gtcgaatcct agctgaagct gctatatagg tatcagccat atatgctgta aggttcctat	2040
45	gaagttggct atcaaccttt tttcctgtaa attatcaaat gcgatgtggt ggtctattgc	2100
	aattgcattg ttgacctttc tgtattctca taggtgctaa gagtgtttca gctcctgtat	2160
	tgttgacttt ctgtattctc atagatacta agagtgtttc agctcgtgta acgaatgaac	2220
50	ctcactgtct tactgtcttg aataaagatg tgattgcagg cacaaattac tg	2272

<210> 4
<211> 945

ES 2 558 953 B1

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
5 <223> Transgén que codifica la beta-caroteno hidroxilasa de maíz

<400> 4
ccatggccgc cggctctgtcc ggcgccgca tgaccagctt cgtcgccaag aaccgctgc      60
10  tggcggccgc ggcgcgccgc agggcgctgc ctcccctcgc cgggcgcgcc ctgccgttct      120
    cgccgctcac caccgccagg gccccgcgcc gccgcgggct cgggaccgtc acgtgcttcg      180
15  tgccgcagga cacggagcac ccggcgccgg cggcaccggc cccggtcgct cccgtgccgg      240
    agacggcgct ggacgaggag gccagggccg cggcggcgcg gcgcgtcgcg gagaggaagg      300
    cgcggaagcg gtccgagcgg cgtacctacc tggtggccgc cgtgatgtcc agcctcgggg      360
20  tcacgtccat ggccgtcgcc gccgtgtact atcgcttcag ctggcaaatg gagggcggcg      420
    cggctcccggg gagcgagatg ttcggcacgt ttgcgctctc cgtcggcgcg gcggtcggga      480
25  tggagttctg ggcgcggtgg ggcaccggg cgtgtgga caacctcctg tggcacatgc      540
    acgagtcgca ccaccggccg cgcgagggcc cattcgagct caacgacgtg ttgccatcg      600
    tcaacgccgt gccggccatc tccctcctcg cctacggctt cttccaccgc ggccctcgtgc      660
30  ccggcctatg cttcggcgcg ggccctcggga ttacgctggt cggcatggcc tacatgttcg      720
    tccacgacgg cctggtccac cgccgcttcc cggtcggccc catcgccaac gtgcctact      780
35  tccgccgagt ggctgccgct cacaagatac accacatgga caagtttgag ggcgtcccgt      840
    atgggctggt cctgggacca aaggagctgg aggaggtcgg tggcctggac gagctggaaa      900
    aggagctcgc gcgaatcggc cggaccatct gatggattcg tccgg      945

40
<210> 5
<211> 555
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

45
<220>
<223> ADNc del gen bar

<400> 5
50  atgagcccag aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcca ccgaggcgga catgccggcg      60
    gtctgcacca tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg taccgagccg      120
    caggaaccgc aggagtggac ggacgacctc gtccgtctgc gggagcgcta tccctggctc      180

```

ES 2 558 953 B1

	gtcgccgagg tggacggcga ggtcgccggc atcgctacg cgggccctg gaaggcacgc	240
5	aacgcctacg actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct cccccgcca ccagcggacg	300
	ggactgggct ccacgtctta caccacctg ctgaagtccc tggaggcaca gggcttcaag	360
	agcgtggctg ctgtcatcgg gctgccaac gaccgagcg tgcgcatgca cgaggcgctc	420
10	ggatatgcc cccgcgcat gctgcggcg gccggttca agcacgggaa ctggcatgac	480
	gtgggtttct ggcagctgga cttcagcctg ccggtaccgc cccgtccggt cctgcccgtc	540
15	accgagatct gatga	555
	<210> 6	
	<211> 1519	
	<212> DNA	
20	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Transgén que codifica la beta-caroteno hidroxilasa de Gentiana lutea	
25	<400> 6	
	cttcgtgcac ttaatctgca actccaccgt tcaattcccc aaaatctcct ccatttccat	60
30	tttgctctaa ttctctcctc tcagctgttt ctccggtttc cggtcaccat tttccggtaa	120
	tggagactca atttttggtc tccggtagaa acagcaacat tcattgccgt atcgattcaa	180
	tttcatcttc ttctcttact ccgaaatcaa gtctgtatc gacatcaacc cctacgctgg	240
35	ttgtttttcc gccatttaag ctggtttcga aaagcttaag aacgaggagt aaaccgagat	300
	tgacggtttg ttttgtgctt gaggaaaagg aattgaaagg aaaattggtg gtggcgagtg	360
40	acgacgacga cggcgccggc gaggtgagaa aacagagaga gaaagagatt tcagcttcag	420
	cggagaaatt agcacagaaa ttggcgagga agaagtcaga gagatttact tatttagttg	480
	cagctgtcat gtctagcttt ggaattacct ccatggctgt tctctctggt tattacagat	540
45	tttcatggca aatggagggc ggcgagatac cgttatccga gatgtttggt acatttgctt	600
	tgtcagttgg agctgcagtg ggaatggaat tttgggcgag atgggctcac gaagcgtgt	660
	ggcatgcttc attatggcac atgcatgagt cacaccataa gccaaaggag ggtcccctcg	720
50	agctaaatga catatttgcc attatcaatg cagtcccagc aatagcactc ctctcctatg	780
	gtttcttcca caaaggcctt atccctggcc tttgttttgg tgcaggcctt ggaattacgg	840

ES 2 558 953 B1

	tgtttggaat ggcgtacatg ttcgtccacg atggtcctgt acacaagcgg ttcocctgtag	900
	gacccatcgc cgatgttcct tatttcagaa gagttgctgc tgctcacacg cttcatcact	960
5	ccgacaaatt caatggcgtc ccttatggct tgtttttagg acctaaggaa cttgaagaag	1020
	taggagggct gcaggtgttg gaaatggaga tcaaccgcag aactaaaaac aaccaatcat	1080
10	gattttcctg aggaagatct tgtgatgcca ttaaaaacaa aaattagaaa agaaaacat	1140
	gggatcagtt tcagtttgca tctaactaca atggtgcatg tagccggttt gaaactctcg	1200
	agcgtctata tttacaccac catgatteta ccgataaatc aactacatt tgcatac	1260
15	caaatcgact ttctgaaagt caattctgtg tttttggtgt ggtgcaccgg tagaatcgg	1320
	ggggtgcaaa taataagcgt gtgtatgatt ttccattgta tagcttaaaa gttcaaagtt	1380
20	gccaatatct gaatagttga agttgaaaaa aagaggcatc tatatgcatg gagtgttttt	1440
	gttggtgtaa tctactatgc cgtaatggtt tataatgaag ctgaggtgta aacgttcatt	1500
	gaaaaaaaa aaaaaaaaa	1519
25	<210> 7	
	<211> 729	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
30	<220>	
	<223> Transgén que codifica la carotenoide cetolasa de Paracoccus	
	<400> 7	
35	atgagcgcac atgccctgcc caaggcagat ctgaccgcca ccagcctgat cgtctcgggc	60
	ggcatcatcg ccgcttggct ggcctgcat gtgcatgcgc tgtggtttct ggacgcagcg	120
40	gcgcatccca tcctggcgat cgcaaatttc ctggggctga cctggctgtc ggtcggattg	180
	ttcatcatcg cgcatacgc gatgcacggg tcggtggtgc cggggcgtec gcgcgccaat	240
	gcggcgatgg gccagcttgt cctgtggtgt tatgccgat tttcgtggcg caagatgatc	300
45	gtcaagcaca tggcccatca ccgcatgcc ggaaccgacg acgaccccgga tttcgacat	360
	ggcggcccgg tccgctggta cgcccgttc atcggcacct atttcggctg gcgcgagggg	420
	ctgctgctgc ccgtcatcgt gacggctctat gcgctgatcc ttggggatcg ctggatgtac	480
50	gtggtcttct ggccgctgcc gtcgatcctg gcgtcgatcc agctgttcgt gttcggcacc	540
	tggctgccgc accgccccgg ccacgacgcg ttcccggacc gccacaatgc gcggtcgctg	600

ES 2 558 953 B1

	cggatcagcg accccgtgtc gctgctgacc tgctttcact ttggcggtta tcatcacgaa	660
	caccacctgc acccgacggt gccgtgggtg cgctgcccga gcacccgcac caagggggac	720
5	accgcatga	729
	<210> 8	
	<211> 171	
10	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
15	<223> Secuencia de la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa	
	<400> 8	
	atggcttcta tgatatactc ttccgctgtg acaacagtca gccgtgcctc tagggggcaa	60
20	tccgccgcag tggctccatt cggcggcctc aatccatga ctggattccc agtgaagaag	120
	gtcaaacactg acattacttc cattacaagc aatggtggaa gagtaaagtg c	171
25	<210> 9	
	<211> 256	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
30	<220>	
	<223> Secuencia terminadora de nopalina sintasa de A. tumefaciens	
	<400> 9	
35	gcagatcggt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgccgggtctt	60
	gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa	120
	tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcaatt atacatttaa	180
40	tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcggtgtca	240
	tctatgttac tagatc	256
45	<210> 10	
	<211> 486	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
50	<220>	
	<223> Secuencia terminadora de ADP- glucosa pirofosforilasa de arroz	
	<400> 10	
	atggcttggc ttacttggat cgctcttttc cttactgctt ttttgggaat ggaggctttc	60

ES 2 558 953 B1

	gcttggatca tgcatagata tgttatgcat ggtttccttt ggtcttggca tagaagtcac	120
5	catgaacctc acgatcaccc tcttgagaag aacgatctct tcgctggtat cttcgctgct	180
	cctgctatcg ttatggttgc tgttggactt catctttggc cttgggctct tcctgttgga	240
	cttggaatca ccgcttacgg aatgggtgtac ttcttcttcc acgatggact cgttcataga	300
10	agattcccta ccggattctc tggaagatct ggattctgga ccagaagaat ccaggctcat	360
	agacttcac acgctgtag aactagagag ggatgcgttt ctttcggatt cctctggggt	420
15	aggctctgcta gagctttgga ggctgagttg gctcaaaaga ggggatcttc ttctagcgga	480
	gcttga	486
20	<210> 11 <211> 347 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
25	<220> <223> Promotor de LMW glutenina	
	<400> 11 tgacagccta tacaaggttc caaactcggg tgtaaaagtg atactatctt gataagtgtg	60
30	tgacatgtaa agttaataag gtgagtcata tatagcaaat atcgggggtt ctgtactttg	120
	tgtgtgatcg tatgcacaac taaaaatcaa ctttgatgat caatatatcc aaaagtagcg	180
35	ttgtagctag tgcaaaccta acccaatgta acaaaataat tcatttcaga tggagccaaa	240
	cagaattatt aaagctgatg caaagaagga aaagaggtgg ttctctgggt actataaata	300
	ggcatgaagt ataaagatca tcacaagcac aagcatcaga accaagc	347
40	<210> 12 <211> 434 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
45	<220> <223> Promotor de D-hordeína de cebada	
	<400> 12 cttcgagtgc ccgccgattt gccagcaatg gctaacagac acatattctg ccaaaacccc	60
50	agaacaataa tcacttctcg tagatgaaga gaacagacca agatacaaac gtccacgctt	120
	cagcaaacag taccacagaa ctaggattaa gccgattacg cggccttagc agaccgtcca	180

ES 2 558 953 B1

	aaaaaactgt tttgcaaagc tccaattcct ccttgcttat ccaatttctt ttgtgttggc	240
5	aaactgcact tgtccaaccg attttgttct tcccgtgttt cttcttaggc taactaacac	300
	agccgtgcac atagccatgg tccggaatct tcgcctcgtc cctataaaag cccagccaat	360
	ctccacaatc tcatcatcac cgagaacacc gagaaccaca aaactagaga tcaattcatt	420
10	gagagtccac cgag	434
<210> 13		
<211> 1699		
15	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
<220>		
20	<223> Promotor de gamma-zeina	
<400> 13		
	gactgaaatg gaagacgatc ataacgaagg atgaaacggt cacgaagcta tgtgcagagg	60
25	agcttoggca tgacagcaga aaggggaaac cgacttaaag atgaaaagcc aaatcagccc	120
	tcaaagaatt actatagagt tattgataaa aagtaaaggg cattaatgta attttatacg	180
	gactgcgtcc cgtgcctata aatagatgaa cagtattcat gtattgttca cgctgacttg	240
30	gcattggtat cacgcctcta cccttacttt cettcaagcc gaagtacatt tgttgttgtc	300
	gtttatataa gcaaaataaa tgaaaatgaa ttaatgttca aaagtaatca tattatttta	360
35	tgtgtgaatc ttctttactt tttcatttga ttatgattat gaaggtatga ccttcataac	420
	cttgcgtcga aatccattat atccaaagga aaataatgct tcgaaggacg aaggattttg	480
	atatttaaca ttttatgttg ccttgttctt aattcatagc atttgagaac aagtccccaa	540
40	caccaatctt tatctttact atattaaagc accagttcaa cgatcgtctc gtgtcaatat	600
	tattaaaaaa ctctacatt tctttataat caaccgcac tcttataatc tcttctctta	660
45	ctactataat aagagagttt atgtacaaaa taaggtgaaa ttatgtataa gtgttctgga	720
	ccttggttgt tggctcatat tcacacaacc taatcaatag aaaacatatg ttttattaaa	780
	acaaaattta tcatatatat atatatatat atatatatat atatatatat atataatata	840
50	aaccgtagca atgcacaggc atatgactag tggcaactta ataccatgtg tgtattaaga	900
	tgaataagag gtatccaaat aaataacttg ttcgcttacg tctggatcga aaggggttgg	960
	aaacgattaa atctcttctt agtcaaaatt aaatagaagg agatttaatc gatttctccc	1020

ES 2 558 953 B1

	aatccccttc gatccaggtg caaccgaata agtccttaaa tgttgaggaa cacgaaacaa	1080
5	ccatgcattg gcatgtaaag ctccaagaat tcgttgatc cttacaact cacagaacat	1140
	caacccaaat tgcacgtcaa gggatttggg taagaaacaa tcaaacaaat cctctctgtg	1200
	tgcaaagaaa cacggtgagt catgccgaga tcatactcat ctgatataca tgcttacagc	1260
10	tcacaagaca ttacaaacaa ctcatattgc attacaaaga tcgtttcatg aaaaataaaa	1320
	taggcgggaa caggacaaaa atccttgacg tgtaaagtaa atttacaaca aaaaaaagc	1380
15	catatgtcaa gctaaatcta attcgtttta cgtagatcaa caacctgtag aaggcaacaa	1440
	aactgagcca cgcagaagta cagaatgatt ccagatgaac catcgacgtg ctacgtaaag	1500
	agagtgaoga gtcatataca tttggcaaga aacctgaag ctgcctacag ccgtctcggc	1560
20	ggcataagaa cacaagaaat tgtgttaatt aatcaaagct ataaataacg ctgcgatgcc	1620
	tgtgcacttc tccatcacca ccaactgggtc ttcagacat tagctttatc tactccagag	1680
25	cgcagaagaa cccgctaga	1699
	<210> 14	
	<211> 993	
	<212> DNA	
30	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Transgén que codifica beta caroteno cetolasa de C reinhardtii	
35	<400> 14	
	atggggccag gcattcagcc cacttccgct cgccccgtt cgaggacaaa gcactccagg	60
	ttcgcgctgc tcgctgcggc tcttaccgcc cgcagggtaa agcagttcac gaagcagttt	120
40	cgctctcgac gtatggccga ggacatcctc aagctttggc aacggcaata ccatctcccc	180
	agagaagatt ccgataagcg gacactgagg gagagagtgc acctctatcg tccctcacga	240
45	tggatcttg gaggaatagc cgttgccgtt accgtgattg ccctatgggc gacgctcttc	300
	gtgtacggcc tttggttcgt caagctgcca tgggccctca aagtaggtga aactgccacc	360
	tcttgggcca ccatagccgc agttttcttc tcactcgagt tccctgtacac aggcctcttc	420
50	ataaccacc atgatgcgat gcatggcag atcgccctga gaaaccgcag gttgaacgac	480
	ttccttggca accttgcat cagcttgtag gcgtggttcg actactctgt gctgcaccgc	540
	aagcattggg agcaccacaa tcacacaggg gaaccaggg ttgaccgga tttccatagg	600

ES 2 558 953 B1

	ggcaatccga acctagccgt gtggtttgcg cagtttatgg tcagctacat gacgctaagc	660
5	cagtttctca agattgccgt ttggagcaat ctcttctgt tggccggagc gccggtggcg	720
	aaccagttgc tgttcatgac cgcggcacca atcctgtctg cctttcggct gttctactat	780
	gggacctatg tccctcacca cccagagaaa gggcacacag gcgcaatgcc ttggcaagtc	840
10	tccagaacct cctccgcatc caggttgcag tcattcctga catgctacca cttcgacctg	900
	cattgggagc atcaccggtg gccgtagca ccctggtggg agctgcctaa atgcgcgcaa	960
15	attgcgagag gcgctgcact ggctcctggc tga	993
	<210> 15	
	<211> 486	
	<212> DNA	
20	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Transgén que codifica beta caroteno hidroxilasa de Brevidomonas	
25	<400> 15	
	atggccttggc ttacttggat cgctcttttc cttactgctt ttttgggaat ggaggctttc	60
	gcttggatca tgcatagata tgttatgcat ggttcccttt ggtccttggca tagaagtcac	120
30	catgaacctc acgatcacc ccttgagaag aacgatctct tcgctggtat cttcgtctgct	180
	cctgctatcg ttatgggttg tgttggactt catctttggc cttgggctct tcctggttga	240
35	cttggaatca ccgcttacgg aatgggtgtac ttcttcttcc acgatggact cgttcataga	300
	agattcccta ccggattctc tggaagatct ggattctgga ccagaagaat ccaggctcat	360
	agacttcac cgcgtgtag aactagagag ggatgcgttt ctttcggatt cctctggggt	420
40	aggtctgcta gagctttgga ggctgagttg gctcaaaaga ggggatcttc ttctagcgga	480
	gcttga	486
45	<210> 16	
	<211> 417	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
50	<220>	
	<223> ARNi específico de la licopeno épsilon ciclasa de maíz	
	<400> 16	
	gacgatctcg gcgccgctcg gctgctgctg gctgcggtgc ggggcagttg gcggaggtaa	60

ES 2 558 953 B1

	ggccctgaag gcggacgcgg agaggtggcg gcgggcggga tggagccgac gcgttggcgg	120
5	accgaaggtg aggtgcgtgg cgaccgagaa gcacgacgag acggcggcgg tcggggcggc	180
	agtgggcgtg gatttcgcgg acgaggagga ctaccgcaag ggcggcggcg gcgagctgct	240
	ttacgtgcaa atgcagtcaa ccaagcccat ggaaagccag tccaagatcg cttccaagct	300
10	atcgcccata tctgatgaaa atacagtgct tgatttggtt atcattgggt gtggtccagc	360
	tgggttttct ctagcttcag agtcagctaa gaaaggtctc actgtaggtc tcattgg	417
15	<210> 17 <211> 100 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
20	<220> <223> Región 5'UTR del gen de la alcohol deshidrogenasa de arroz	
	<400> 17 gaattccagc aacgaactgc gagtgattca agaaaaaaga aaacctgagc tttogatctc	60
25	tacggagtgg tttcttgttc tttgaaaaag agggggatta	100
30	<210> 18 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
35	<220> <223> Cebador directo	
	<400> 18 aggatccatg gccatcatac tcgtacgag	29
40	<210> 19 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
45	<220> <223> Cebador reverso	
50	<400> 19 agaattctag gtctggccat ttctcaatg	29
	<210> 20 <211> 37	

ES 2 558 953 B1

	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
5	<223> Cebador directo	
	<400> 20	
	ggaattctct agacgatctc ggcgccgctc ggctgct	37
10	<210> 21	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
15	<220>	
	<223> Cebador reverso	
	<400> 21	
20	gactagtgga tcccaatgag acctacagtg agacct	36
	<210> 22	
	<211> 1164	
25	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
30	<223> Quimera formada por beta caroteno cetolasa truncada de Chlamydomonas reinhardtii con codones optimizados y SSU	
	<400> 22	
	atggctagta tgatctcaag ctgagcagtc actacgggtca gtcgggctag tgcgggtcag	60
35	agcgcagctg tggctccggt tgggtgggctc aagtctatga ctggttttcc ggtcaagaag	120
	gtgaacacgg acatcacttc gatcacttcg aatggcggac gtgtgaaatg catggggcca	180
	ggcatttcagc ccacttccgc tcgcccctgt tcgaggacaa agcactccag gttcgcgctg	240
40	ctcgctgctg ctcttaccgc ccgcagggta aagcagttca cgaagcagtt tcgctctcga	300
	cgtatggccg aggacatcct caagctttgg caacggcaat accatctccc cagagaagat	360
45	tccgataagc ggacactgag ggagagagtg cacctctatc gtcctccacg atcggatctt	420
	ggaggaatag ccgttgccgt taccgtgatt gccctatggg cgacgctctt cgtgtacggc	480
	ctttggttcg tcaagctgcc atgggccctc aaagttagtg aaactgccac ctcttggggc	540
50	accatagccg cagttttctt ctactcgag ttctgtaca caggcctctt cataaccacc	600
	catgatgcga tgcatggcac gatcgccctg agaaaccgca ggttgaacga cttccttggc	660

ES 2 558 953 B1

	aaccttgoga tcagcttgta cgcgtggttc gactactctg tgctgcaccg caagcattgg	720
	gagcaccaca atcacacagg ggaaccagg gttgaccgg atttccatag gggcaatccg	780
5	aacctagccg tgtggtttgc gcagtttatg gtcagctaca tgacgctaag ccagtttctc	840
	aagattgccg tttggagcaa tctccttctg ttggccggag cgccgttggc gaaccagttg	900
10	ctgttcatga ccgcggcacc aatcctgtct gcctttcggc tgtttacta tgggacctat	960
	gtccctcacc acccagagaa agggcacaca ggcgcaatgc cttggcaagt ctccagaacc	1020
	tctccgcat ccaggttgca gtcattcctg acatgctacc acttcgacct gcattggggag	1080
15	catcaccggt ggccgtatgc accctgggtg gagctgccta aatgccgcca aattgcgaga	1140
	ggcgctgcac tggctcctgg ctga	1164
20	<210> 23	
	<211> 666	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Quimera formada por beta-caroteno hidroxilasa de Brevibacterium sp. con codones optimizados y SSU	
	<400> 23	
30	atggcttcta tgatatactc ttccgctgtg acaacagtca gccgtgcctc tagggggcaa	60
	tccgccgcag tggctccatt cggcggcctc aaatccatga ctggattccc agtgaagaag	120
	gtcaaacactg acattacttc cattacaagc aatggtggaa gagtaaagtg catgtctaga	180
35	atggcttggc ttacttggat cgctcttttc cttactgctt ttttgggaat ggaggctttc	240
	gcttggatca tgcatagata tgttatgcat ggtttccttt ggtcttggca tagaagtcac	300
40	catgaacctc acgatcacc tcttgagaag aacgatctct tcgctggtat cttcgctgct	360
	cctgctatcg ttatggttgc tgttggactt catctttggc cttgggctct tctggttggc	420
	cttggaatca ccgcttacgg aatggtgtac ttcttcttcc acgatggact cgttcataga	480
45	agattcccta ccgattctc tgggaagatc ggattctgga ccagaagaat ccaggctcat	540
	agacttcac acgctgttag aactagagag ggatgcgttt ctttcggatt cctctggggt	600
50	aggtctgcta gagctttgga ggctgagttg gctcaaaaga ggggatcttc ttctagcggc	660
	gcttga	666

ES 2 558 953 B1

```

<210> 24
<211> 1507
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5
<220>
<223> Promotor del gen ubiquitina-1 de maíz con el primer intrón

<400> 24
10 ctgcagtgca gcgtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta      60
   agttataaaa aattaccaca tttttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta      120
   tctttataca tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa      180
15   tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagttagac atggctctaaa ggacaattga      240
   gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcatgtgt tctccttttt      300
20   ttttgcaaat agcttcacct atataaactc tcatccattt tattagtaca tccatttagg      360
   gtttaggggtt aatgggttttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt      420
   agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaaat aatttagata      480
25   taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaat accctttaag aaattaaaaa      540
   aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga      600
30   tcgacgagtc taacggacac caaccagcga accagcagcg tcgctgctggg ccaagcgaag      660
   cagacggcac ggcattctctg tcgctgcctc tggaccctc tcgagagttc cgctccaccg      720
   ttggacttgc tccgctgtcg gcatccagaa attgctgtgc ggagcggcag acgtgagccg      780
35   gcacggcagg cggcctcctc ctctctcac ggcaccggca gctacggggg attcctttcc      840
   caccgctcct tcgctttccc ttctcgcctc gccgtaataa atagacaccc cctccacacc      900
40   ctctttcccc aacctcgtgt tgttcggagc gcacacacac acaaccagat ctcccccaaa      960
   tccaccogtc ggcacctccg cttcaaggta cgccgctcgt cctccccccc cccccctctc      1020
   taccttctct agatcggcgt tccggccat ggtagggcc cggtagttct acttctgttc      1080
45   atgtttgtgt tagatccgtg tttgtgtag atccgtgctg ctagcgttcg tacacggatg      1140
   cgacctgtac gtcagacacg ttctgattgc taacttgcca gtgtttctct ttggggaatc      1200
50   ctgggatggc tctagccgtt ccgacagcgg gatcgatcta ggataggat acatgttgat      1260
   gtggggttta ctgatgcata tacatgatgg catatgcagc atctattcat atgctctaac      1320
   cttgagtacc tatctattat aataaacaag tatgttttat aattattttg atcttgatat      1380

```

ES 2 558 953 B1

	acttggatga tggcatatgc agcagctata tgtggatfff tttagccctg ccttcatacg	1440
5	ctatfffatfff gcttggfacct gfffctfff gcfatgcfca cctggtggt tggfgtfacct	1500
	tctgcag	1507
10	<210> 25 <211> 306 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
15	<220> <223> Fragmento de 306 pares de bases del gen gusA	
	<400> 25 atccgcacct ctggcaaccg ggtgaaggft atctctatga actgtgcgfc acagccaaaa	60
20	gccagacaga gtgtgatatc taccgcttc gcgtcggcat ccggtcagtg gcagfgaagg	120
	gcgaacagft cctgattaac cacaaccgt tctactttac tggctttggt cgtcatgaag	180
25	atgoggactt gcgtggcaaa ggattcgata acgtgctgat ggtgcacgac cacgcattaa	240
	tggactggat tggggccaac tctaccgta cctcgcatta cccttacgct gaagagatgc	300
	togact	306
30		



- ②¹ N.º solicitud: 201531699
②² Fecha de presentación de la solicitud: 23.11.2015
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C12N15/82** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CN 102321649 A (UNIV TIANJIN) 18.01.2012, (resumen) World Patent Index [en línea]. Thompson Publications, Ltd. [recuperado el 01.02.2016]. Recuperado de EPOQUENET, Base de datos WPI.	1-6,9,14-19, 37-43,74,75,76
A	US 8872006 B1 (COLBERT TERRY R) 28.10.2014, reivindicaciones.	1-76
A	US 2006031963 A1 (SCHOPFER CHRISTEL R et al.) 09.02.2006, reivindicaciones.	1-76

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
01.02.2016

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.02.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-76	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 7, 8, 10-13, 20-36 y 44-73	SI
	Reivindicaciones 1-6, 9, 14-19, 37-43, 74, 75 y 76	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CN 102321649 A (UNIV TIANJIN)	18.01.2012
D02	US 8872006 B1 (COLBERT TERRY R)	28.10.2014
D03	US 2006031963 A1 (SCHOPFER CHRISTEL R et al.)	09.02.2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

En las reivindicaciones 1-36 de la solicitud de patente se reivindica una composición nutritiva que comprende una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma.

En las reivindicaciones 37-76 de la solicitud de patente se reivindica el uso de la citada composición nutritiva para la obtención de huevos enriquecidos en antioxidantes.

El documento D01, que es el que refleja el estado de la técnica más cercano, divulga una licopeno β -ciclasa que puede ser empleada para la preparación de plantas transgénicas de maíz. El transgén implica un incremento en el contenido total de carotenoides de las plantas transgénicas comparado con las plantas sin modificación genética.

Teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D01, la síntesis de una composición nutritiva que comprenda una parte de una planta de maíz enriquecida en antioxidantes o un derivado de la misma, no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia. Por lo que teniendo en cuenta el contenido del documento D01 las reivindicaciones 1-6, 9, 14-19, 37-43, 74, 75 y 76 presentan novedad, pero no actividad inventiva según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la Ley 11/86.