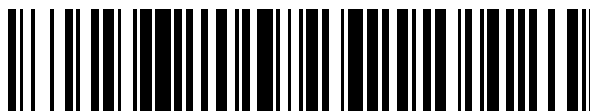


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 456**

51 Int. Cl.:

A23L 33/17

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008** **E 08866441 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 2230928**

54 Título: **Productos de proteínas de soja que tienen características alteradas**

30 Prioridad:

21.12.2007 US 15750

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

14.10.2016

73 Titular/es:

**E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(100.0%)**

**Chestnut Run Plaza, 974 Center Road, P.O. Box
2915**

Wilmington, DE 19805, US

72 Inventor/es:

**KNOWLTON, SUSAN y
BLAISDELL, CHARLES T.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 586 456 T3

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

DESCRIPCIÓN

Productos de proteínas de soja que tienen características alteradas

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a productos de proteínas de soja obtenidos de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico en donde el(los) producto(s) proteínico(s) tiene(n) blancura mejorada, viscosidad reducida y resistencia de gel reducida.

Antecedentes de la invención

- 10 Las semillas de soja tiene el mayor contenido de proteínas de todos los cereales y legumbres. En particular, las semillas de soja tienen aproximadamente 40% de proteínas, mientras que otras legumbres tienen 20-30% y los cereales tienen aproximadamente 8-15% de proteínas. Las semillas de soja también contienen aproximadamente 20% de aceite siendo el resto materia seca, en su mayoría carbohidratos (35%). Sobre una base húmeda (tal cual), las semillas de soja contienen aproximadamente 35% de proteínas, 17% de aceite, 31% de carbohidratos y 4,4% de cenizas. Cuerpos proteicos y lipídicos de almacenamiento de las semillas de soja están contenidos en la carne utilizable de la semilla de soja llamada el cotiledón. Los carbohidratos complejos (o fibras dietéticas) también se encuentran en las paredes celulares del cotiledón. La capa externa de las células (llamada el tegumento de la semilla) constituye aproximadamente el 8% del peso total de la semilla de soja. La semilla de soja descascarillada en bruto, dependiendo de la variedad, tiene aproximadamente 18% de aceite, 15% de carbohidratos insolubles, 14% de humedad y cenizas y 38% de proteínas.

- 20 Los materiales de proteínas de plantas se usan como ingredientes alimenticios funcionales y tienen numerosas aplicaciones para mejorar las características deseables de los productos alimenticios. Los materiales de proteínas de soja, en particular, han visto ampliado su uso como ingredientes alimenticios funcionales. Los materiales de proteínas de soja se utilizan como emulsionantes en carnes para aglutinar la carne y darle una buena textura y una mordida firme. Otra aplicación común de los materiales de proteínas de soja como ingredientes alimenticios funcionales es como agente espesante para proporcionar una viscosidad cremosa al producto alimenticio.

- 25 En general, los materiales de proteínas de soja incluyen copos de soja, sémola de soja, harina de soja, harina fina de soja, concentrados de proteínas de soja y aislados de proteínas de soja, siendo una diferencia principal entre estos materiales el grado de refinado con relación a las semillas de soja enteras.

- 30 Aparte del contenido de proteínas de soja, el sabor, la resistencia de gel, el índice de blancura y la viscosidad de un material de proteínas de soja son también un criterio relevante para la selección de un material de proteínas de soja como ingrediente alimenticio funcional. El material de proteínas de soja convencional puede tener una semilla fuerte, sabor amargo y mal olor como consecuencia de la presencia de ciertos compuestos volátiles y/o un aspecto no deseado debido a la presencia de otros compuestos de peso molecular relativamente bajo en el material de proteínas de soja.

- 35 La presente descripción se refiere en general a una composición que contiene proteínas de soja que tiene resistencia de gel reducida, viscosidad reducida y blancura mejorada.

La patente de EE.UU. N° 6.599.556 B2, concedida a Stark et al., el 29 de julio de 2003, describe productos de confitería, que incluyen material de semillas oleaginosas modificado con alto contenido en proteínas.

La patente de EE.UU. N° 6.716.469 B2, concedida a Stark et al., el 6 de abril de 2004, describe productos de postres congelados, que incluyen material de semilla oleaginosa modificado con alto contenido en proteínas.

- 40 La patente de EE.UU. N° 6.720.020 B2, concedida a Karleskind et al., el 13 de abril de 2004, describe composiciones de bebidas, que incluyen material de semilla oleaginosa modificado con alto contenido en proteínas.

- 45 La patente japonesa N° 5.168.416 A1, concedida a Takeshi et al., el 2 de julio de 1993, describe la obtención de una semilla de soja concentrada que tiene mejorado el gusto, sabor y tono de color y es útil como material alimenticio, etc., con una simple operación a un bajo costo, sin cambiar la naturaleza de las proteínas lavando las semillas de soja, etc., con alcohol que contiene agua bajo condiciones débilmente ácidas en presencia de un ácido.

La patente japonesa N° 4.207.159 A1, concedida a Hiroko et al., el 29 de julio de 1992, describe la materia prima del título que tiene brillo y tono de color blanco y es útil para marinar y manipular líquido dispersado comestible de proteínas de semillas de soja precipitadas con ácido con un hidróxido de metal alcalino para controlar el pH.

- 50 El documento WO2007/013146 A1 publicado el 1 de febrero de 2007, describe composiciones para alimentos de proteínas de soja tratados.

Lynn Grooms (artículo de Internet, 31 de marzo de 1998, http://farmindustrynews.com/mag/farming_modified_soybeans_whats/) describe las semillas de soja modificadas y el uso de vainas con alto contenido en sacarosa para proporcionar aislados y concentrados proteínicos.

El documento US2004/028774 A1 se refiere a un método para producir una harina de soja enzimáticamente estabilizada que contiene un inhibidor de tripsina de origen natural para producir un producto de soja soluble, de sabor agradable que comprende desactivar enzimáticamente los inhibidores de tripsina en la harina de soja sin utilizar calor, y el tratamiento de la harina de soja hace más digeribles los carbohidratos y las proteínas.

- 5 La patente de EE.UU. 6.803.068 B2 se refiere a proteínas de soja de alto peso molecular. Las proteínas de soja de alto peso molecular tienen sabor y propiedades funcionales deseables, tales como altas solubilidad y emulsificación en agua y bajas sedimentación y viscosidad. El método de fabricación de las proteínas utiliza harina fina de soja y agrupa sus proteínas de bajo peso molecular dando proteínas de alto peso molecular sin utilizar alcohol acuoso para modificar la estructura de las proteínas.

10 **Sumario de la invención**

- En una primera realización, la invención se refiere a un producto de proteínas de soja obtenido a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tiene un contenido de ácido oleico de al menos 60%, en donde dicho producto tiene al menos una característica seleccionada del grupo que consiste en blancura mejorada, resistencia de gel reducida y viscosidad reducida cuando se compara con un producto de proteínas de soja obtenido de semillas de soja comerciales, utilizando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico.

- En una segunda realización, la invención se refiere a un producto de proteínas de soja derivado de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tiene un aumento de al menos 3% en el índice de blancura en comparación con un producto de proteínas de soja derivado de semillas de soja comerciales, utilizando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico.

- En una tercera realización, la invención se refiere a un producto de proteínas de soja no hidrolizado derivado de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tienen una reducción de la viscosidad en al menos 9% en comparación con un producto de proteínas de soja obtenido a partir de semillas de soja comerciales, utilizando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico.

- En una cuarta realización, la invención se refiere a un producto de proteínas de soja derivado de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tienen una reducción de la resistencia de gel en al menos 25% en comparación con un producto de proteínas de soja obtenido a partir de semillas de soja comerciales, utilizando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico.

- En una quinta realización, la invención se refiere a productos de proteínas de soja seleccionados del grupo que consiste en un aislado de proteínas de soja, un concentrado de proteínas de soja, harina de soja, harina fina con toda la grasa, harina fina desgrasada, polvo de leche de soja, leche de soja, proteínas texturizadas, harinas texturizadas, concentrados texturizados y aislados texturizados.

- 35 En una sexta realización, la invención se refiere a un método para mejorar la eficacia de secado de un producto de proteínas de soja, que comprende alimentar al menos un producto de proteínas de soja, obtenido a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tienen un contenido de ácido oleico de al menos 60% con mayores contenidos de sólidos de alimentación, a un pasteurizador o un secador en comparación con la alimentación de al menos un producto de proteínas de soja obtenido a partir de semillas de soja comerciales.

- 40 En una séptima realización, la invención se refiere a un método para mejorar la eficacia de secado de un producto de proteínas de soja, que comprende alimentar al menos un producto de proteínas de soja, obtenido a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tiene un contenido de ácido oleico de al menos 60% con no menos de 14% de sólidos de alimentación, a un pasteurizador o un secador.

- 45 La invención proporciona también un método para mejorar la blancura, reducir la resistencia de gel y/o reducir la viscosidad de un producto de proteínas de soja obtenido a partir de semillas de soja comerciales, que comprende preparar un producto de proteínas de soja a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tienen un contenido de ácido oleico de al menos 60%.

Realizaciones adicionales de la invención incluyen productos de proteínas de soja con al menos 40%, 65% o 90% de proteínas (N x 6,25) sobre una base libre de humedad.

- 50 En otros aspectos, los productos de proteínas de soja de la invención se pueden utilizar en alimentos, bebidas y piensos que contienen el producto de proteínas de soja de la invención.

Breve descripción de los dibujos y listados de secuencias

La invención se puede entender más completamente a partir de la siguiente descripción detallada y de los dibujos que se acompañan y del listado de secuencias, que forman una parte de esta solicitud.

La Fig. 1 representa el plásmido pKS210.

La Fig. 2 representa el plásmido PHP17731.

La Fig. 3 representa el plásmido PHP17064.

La Fig. 4 representa el fragmento PHP19340A.

5 La Fig. 5 representa el fragmento PHP17752A.

La Fig. 6 representa el plásmido PHP19340.

La Fig. 7 representa el plásmido PHP17752.

La SEQ ID NO:1 describe la secuencia del fragmento de DNA recombinante PHP21676A.

10 La SEQ ID NO:2 describe la secuencia del fragmento de polinucleótidos de 1533 nucleótidos (nt) que comprende 470 nucleótidos del gen de la FAD2-2 de la semilla de soja, 420 nucleótidos del gen de la FAD2-1 de la semilla de soja, 643 nucleótidos del gen de la FAD3 de la semilla de soja.

La SEQ ID NO:3 describe la secuencia de nucleótidos del cebador oligonucleotídico BM35 usado para amplificar un fragmento de aproximadamente 0,9 Kb a partir del fragmento de DNA recombinante KSFAD2-híbrido.

15 La SEQ ID NO:4 describe la secuencia de nucleótidos del cebador oligonucleotídico BM39 usado para amplificar un fragmento de aproximadamente 0,9 kb a partir del fragmento de DNA recombinante KSFAD2-híbrido.

La SEQ ID NO:5 describe la secuencia de nucleótidos del cebador oligonucleotídico BM40 usado para amplificar un fragmento de DNA de aproximadamente 0,65 kb a partir del plásmido XF1.

La SEQ ID NO:6 describe la secuencia de nucleótidos del plásmido oligonucleotídico BM41 usado para amplificar un fragmento de DNA de aproximadamente 0,65 kb a partir del plásmido pXF1.

20 La SEQ ID NO:7 describe la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA recombinante KSFAD2-híbrido que contiene aproximadamente 470 nucleótidos del gen de la FAD2-2 de semilla de soja y 420 nucleótidos del gen de la FAD2-1 de semilla de soja.

La SEQ ID NO:8 describe la secuencia de nucleótidos del cebador oligonucleotídico KS1 usado para amplificar aproximadamente 470 nucleótidos a partir del gen de la FAD2-2 de semilla de soja.

25 La SEQ ID NO:9 describe la secuencia de nucleótidos del cebador oligonucleotídico KS2 usado para amplificar aproximadamente 470 nucleótidos del gen de la FAD2-2 de semilla de soja.

La SEQ ID NO:10 describe la secuencia de nucleótidos del cebador oligonucleotídico KS3 usado para amplificar aproximadamente 420 nucleótidos del gen de la FAD2-1 de semilla de soja.

30 La SEQ ID NO:11 describe la secuencia de nucleótidos del cebador oligonucleotídico KS4 usado para amplificar aproximadamente 420 nucleótidos del gen de la FAD2-1 de semilla de soja.

La SEQ ID NO:12 describe la secuencia de nucleótidos del casete de silenciamiento de la expresión génica específico de la semilla a partir de pKS133, que comprende los nucleótidos para un promotor KTi3 y el terminador que rodea una cadena de nucleótidos que promueve la formación de una estructura de tramo lineal que está rodeando un único sitio de la endonucleasa de restricción Not I.

35 La SEQ ID NO:13 describe la secuencia de nucleótidos del plásmido pKS210.

La SEQ ID NO:14 describe la secuencia de nucleótidos del plásmido PHP17731.

La SEQ ID NO:15 describe la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA recombinante PHP17731A.

40 La SEQ ID NO:16 describe la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA recombinante marcador seleccionable ALS. Este fragmento de DNA recombinante comprende un promotor unido operativamente a un fragmento de nucleótidos que codifica una acetolactato-sintasa de semilla de soja a la que se han introducido mutaciones para que sea resistente al tratamiento con herbicidas de sulfonilurea.

La SEQ ID NO:17 describe la secuencia de aminoácidos de ALS resistente a herbicidas de semilla de soja que incluye mutaciones en las subsecuencias B y F.

45 La SEQ ID NO:18 es la secuencia de aminoácidos de tipo natural de la "subsecuencia B" de ALS conservada descrita en la patente de EE.UU. N° 5.013.659.

La SEQ ID NO:19 describe la secuencia de aminoácidos de tipo natural de la "subsecuencia F" de ALS conservada descrita en la patente de EE.UU. N° 5.013.659.

La SEQ ID NO:20 describe la secuencia de aminoácidos de los cinco aminoácidos adicionales introducidos durante la clonación en el extremo amino-terminal de ALS de semilla de soja.

5 La SEQ ID NO:21 describe la secuencia de nucleótidos del plásmido PHP17064.

La SEQ ID NO:22 describe la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA recombinante PHP17064A.

La SEQ ID NO:23 describe la secuencia de nucleótidos del fragmento PHP19340A.

La SEQ ID NO:24 describe la secuencia de nucleótidos del fragmento PHP17752A.

La SEQ ID NO:25 describe la secuencia de nucleótidos del plásmido PHP19340.

10 La SEQ ID NO:26 describe la secuencia de nucleótidos del plásmido PHP17752.

El listado de secuencias contiene el código de una letra para los caracteres de las secuencias de nucleótidos y los códigos de tres letras para los aminoácidos, como se define de acuerdo con las normas de la IUPAC-IUBMB descritas en *Nucleic Acids Res.* 13:3021-3030 (1985) y en *Biochemical J.* 219 (N° 2):345-373 (1984). Los símbolos y formatos utilizados para los datos de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos cumplen con las normas establecidas en 37C.F.R. §1.822.

15

Descripción detallada de la invención

En el contexto de esta descripción, se utilizará una serie de términos.

Como se usa en la presente memoria, "semilla de soja" se refiere a las especies *Glycine max*, *Glycine soja* o cualquier especie que sea sexualmente compatible por cruzamiento con *Glycine max*. Una "línea" es un grupo de plantas de origen similar que muestran poca o ninguna variación genética entre los individuos para al menos un rasgo. Dichas líneas pueden ser creadas por una o más generaciones de autopolinización y selección o por propagación vegetativa a partir de un solo progenitor, incluyendo las técnicas de cultivo de tejidos o células. Una "línea agrónomicamente de élite" o "línea élite" se refiere a una línea con un comportamiento agronómico deseable que se puede o no usar comercialmente. Una "variedad", "variedad cultivada", "variedad de élite" o "variedad cultivada de élite" se refieren a una línea de élite agrónomicamente superior que ha sido analizada ampliamente y es o va a ser usada para la producción comercial de semillas de soja. "Mutación" se refiere a un cambio genético detectable y heredable (ya sea espontáneo o inducido) no causado por segregación ni recombinación genética. "Mutante" se refiere a un individuo, o linaje de individuos, que posee una mutación.

20

El "índice de blancura" de un producto de proteínas de soja se refiere al color de la composición que contiene proteínas de soja. Muchas composiciones para alimentación que contienen proteínas de soja tendrán, en diversos grados, un color amarillento o parduzco. En general, el color de estas composiciones se puede "mejorar", es decir, el "índice de blancura" del producto se puede aumentar por el procedimiento de la presente invención. En general, el índice de blancura se determina usando un colorímetro que proporcione los valores de color L, a y b de la composición a partir de los cuales se puede calcular el índice de blancura utilizando una expresión estándar del índice de blancura (abreviadamente WI por la expresión inglesa Whiteness Index), $WI = L - 3b$. El componente L indica generalmente la blancura o "luminosidad", de la muestra; valores de L próximos a 0 indican una muestra negra, mientras que valores de L próximos a 100 indican una muestra blanca. El valor b indica los colores amarillo y azul presentes en la muestra; valores de b positivos indican la presencia de colores amarillos mientras que valores de b negativos indican la presencia de colores azules. El valor de a, que se puede utilizar en otras mediciones de colores, indica los colores rojo y verde; los valores positivos indican la presencia de colores rojos mientras que los valores negativos indican la presencia de colores verdes. Para los valores de b y a, el valor absoluto de la medición aumenta directamente a medida que aumenta la intensidad del color correspondiente. En general, el colorímetro se normaliza utilizando una baldosa patrón blanca suministrada con el colorímetro. A continuación se coloca una muestra en una cubeta de vidrio que se introduce en el colorímetro. La cubeta con la muestra se cubre con una tapa opaca para minimizar la posibilidad de que la luz ambiente llegue al detector a través de la muestra y sirve como constante durante la medición de la muestra. Después que se realiza la lectura, la cubeta con la muestra se vacía y se vuelve a llenar típicamente a medida que se realiza la medición con múltiples muestras del mismo material y el índice de blancura del material se expresa como la media de las mediciones. Los colorímetros adecuados incluyen generalmente los fabricados por HunterLab (Reston, VA) que incluyen, por ejemplo, el modelo n° DP-9000 con sensor óptico D 25.

30

35

40

45

50

Las mediciones del índice de blancura de una muestra con el 5% en peso de sólidos de la suspensión antes y después del tratamiento se determinan utilizando un colorímetro de HunterLab DP-9000 que incluye un sensor óptico D-25, ambos fabricados por Hunter Associates Laboratory (HunterLab) (Reston, VA). Para la medición del índice de blancura en la plataforma de producción a gran escala, se dispersan muestras de proteínas en una base del 5% p/p: (5,25 g) se añaden a agua desionizada (100 mL). Para la medición del índice de blancura en la plataforma de

55

producción a pequeña escala, se dispersa 1 g de muestra de proteínas en 19 mL de agua desionizada en una base p/v. Los resultados obtenidos usando el colorímetro de Hunter se expresan en unidades de L, a y b. El índice de blancura se calcula a partir de los valores de la escala L y b utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de blancura} = L - 3b$$

- 5 Además de color mejorado, el producto de proteínas de soja obtenido por los procedimientos de la presente descripción puede tener una viscosidad reducida.

La viscosidad, la gelificación y otros indicadores de la formación de la estructura son propiedades importantes de las proteínas de semilla de soja puesto que contribuyen a la utilidad global del producto en uso. Las proteínas contribuyen a la solidez y elasticidad de los productos por formación de un retículo tridimensional de moléculas de proteínas agregadas que atrapan agua. Algunas veces es deseable que tengan estas propiedades, por ejemplo, en el caso de productos similares a la carne, o puede ser deseable que tengan menos funcionalidad, por ejemplo en aplicaciones para bebidas. Para aplicaciones para bebidas, puede ser deseable una menor viscosidad para propiedades sensoriales, de sensación en boca y de textura de la bebida. Las composiciones que contienen proteínas de soja de menor viscosidad pueden ser destinadas para uso en productos líquidos (es decir, bebidas); y adicionalmente, en algunas realizaciones, las composiciones que contienen proteínas de soja de viscosidad menor pueden ser deseables para uso en productos cárnicos.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "viscosidad" significa la viscosidad aparente de una suspensión o solución acuosa medida con un viscosímetro de husillo giratorio que utiliza un gran anillo, donde un viscosímetro de husillo giratorio particularmente preferido es un viscosímetro Brookfield. En otra realización, la viscosidad aparente se puede medir usando un analizador rápido de la viscosidad (abreviadamente RVA, por sus siglas en inglés Rapid Visco Analyzer) o un reómetro AR-1000.

En general, el término viscosidad se refiere a la viscosidad aparente de una suspensión o una solución medida con un viscosímetro de husillo giratorio que utiliza un gran anillo, donde un viscosímetro de husillo giratorio particularmente preferido es un viscosímetro Brookfield. La viscosidad aparente de un material de proteínas de soja se puede medir, por ejemplo, pesando una muestra del material de soja y agua para obtener una relación conocida entre el material de soja y el agua (preferiblemente 1 parte de material de soja por 9 partes de agua, en peso), combinando y mezclando el material de soja y el agua en un batidor o mezclador para formar una suspensión homogénea del material de soja y el agua a temperatura ambiente y pH neutro, y midiendo la viscosidad aparente de la suspensión con el viscosímetro de husillo giratorio utilizando un gran anillo, que funciona a aproximadamente 60 revoluciones por minuto y con un par de fuerzas de 30 a 70%.

Otra característica funcional importante es la propiedad de formación de gel de una proteína. La gelificación de proteínas es importante para obtener estructuras sensoriales y de textura deseables en los alimentos.

La formación de un gel de proteínas es un proceso en dos etapas que se inicia por desnaturalización parcial de las moléculas de las proteínas. A medida que se desnaturalizan las proteínas, aumenta la viscosidad de la suspensión como resultado de un aumento en los cambios moleculares asociados a las proteínas desplegantes. Durante la segunda parte del proceso se produce un gran aumento de la viscosidad resultante de la asociación de las proteínas y el desarrollo del retículo molecular.

El fenómeno de gelificación requiere una fuerza impulsora para desplegar la estructura de las proteínas naturales, seguida de una agregación que retenga un cierto grado de orden en la matriz formada por la asociación entre las cadenas de las proteínas. La gelificación de las proteínas se ha conseguido tradicionalmente por calentamiento, pero algunos procesos físicos y químicos forman geles de proteínas de manera análoga a la inducción por calor. Un medio físico, además de calor, es alta presión. Los medios químicos son acidificación, reticulación enzimática y uso de sales y urea, que provocan modificaciones en las interacciones proteína-proteína y proteína-medio. Las características de cada gel son diferentes y dependen de factores como la concentración de las proteínas, el grado de desnaturalización causado por el pH, la temperatura, la fuerza iónica y/o la presión.

El término "resistencia de gel" se refiere a la capacidad o medida de una proteína para formar gel.

El término "ácidos grasos" se refiere a ácidos alifáticos de cadena larga (ácidos alcanóicos) de longitud de cadena variable, desde aproximadamente C₁₂ a C₂₂ (aunque se conocen ácidos de longitud de cadena tanto más larga como más corta). Las longitudes de cadena predominantes están entre C₁₆ y C₂₂. La estructura de un ácido graso está representada por un sistema de anotación sencillo de "X:Y", donde X es el número total de átomos de C en el ácido graso particular e Y es el número de dobles enlaces.

En general, los ácidos grasos se clasifican en saturados o insaturados. El término "ácidos grasos saturados" se refiere a los ácidos grasos que no tienen "dobles enlaces" en su cadena principal de carbonos. Por el contrario, los "ácidos grasos insaturados" tienen "dobles enlaces" en su cadena principal de carbonos (que más comúnmente están en la configuración *cis*). Los "ácidos grasos monoinsaturados" sólo tienen un "doble enlace" en su cadena principal de carbonos (por ejemplo, generalmente entre el 9° y el 10° átomo de carbono, como en el ácido palmitoleico (16:1) y el ácido oleico (18:1)), mientras que los "ácidos grasos poliinsaturados" (o "PUFA" por el

nombre en inglés Polyunsaturated Fatty Acids) tienen al menos dos dobles enlaces en la cadena principal de carbonos (por ejemplo, entre el 9° y el 10° y el 12° y el 13° átomos de carbono para el ácido linoleico (18:2); y entre el 9° y el 10°, el 12° y el 13° y el 15° y el 16° para el ácido α -linolénico (18:3)).

La expresión "contenido total en ácidos grasos" se refiere a la suma de los cinco componentes principales de ácidos grasos encontrados en semillas de soja, es decir, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 y C18:3. El término "contenido total en ácidos grasos poliinsaturados" se refiere al contenido total de C18:2 más C18:3.

Para los fines de la presente descripción, se usará el sistema de referencia omega para indicar el número de carbonos, el número de dobles enlaces y la posición del doble enlace más próximo al carbono omega, contando desde el carbono omega (que es el carbono terminal de la cadena alifática y se numera 1 para este fin). Esta nomenclatura se muestra a continuación en la Tabla 1, en la columna titulada "Notación abreviada"

Tabla 1

Nomenclatura de ácidos grasos poliinsaturados			
Nombre común	Abreviatura	Nombre químico	Notación abreviada
Ácido linoleico	LA	Ácido <i>cis</i> -9,12-octadecadienoico	18:2 ω -6
Ácido α -linolénico	α LIN	Ácido <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	18:3 ω -3

El término "desaturasa" se refiere a un polipéptido que se puede desaturar, es decir, introducir un doble enlace, en uno o más ácidos grasos para producir un ácido graso mono- o poli-insaturado o un precursor del mismo que sea de interés. A pesar de usar el sistema de referencia omega en toda la memoria con referencia a los ácidos grasos específicos, es más conveniente indicar la actividad de una desaturasa contando desde el extremo carboxilo del sustrato usando el sistema Δ .

Los términos "FAD" y desaturasa de ácidos grasos se utilizan indistintamente y se refieren a oleoil- y linoleoil-fosfatidilcolina-desaturasas microsómicas unidas a membrana que convierten el ácido oleico en ácido linoleico y el ácido linoleico en ácido linolénico, respectivamente, en reacciones que reducen el oxígeno molecular a agua y requieren la presencia de NADH.

El término "semillas de soja con alto contenido en ácido oleico" se refiere a semillas de soja que tienen un contenido de ácido oleico de al menos 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% y 95% de la semilla en peso. Los materiales preferidos que proceden del aceite de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico están descritos en la Publicación de patente mundial WO94/11516.

El término "actividad" enzimática se refiere a la capacidad de una enzima para convertir un sustrato en un producto.

Los términos "polinucleótido", "secuencia polinucleotídica", "secuencia de ácidos nucleicos", "fragmento de ácidos nucleicos" y "fragmento aislado de ácidos nucleicos" se usan indistintamente en la presente memoria. Estos términos abarcan secuencias de nucleótidos y similares. Un polinucleótido puede ser un polímero de RNA o DNA que es mono o bicatenario, que contiene opcionalmente bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas. Un polinucleótido en forma de un polímero de DNA puede estar compuesto de uno o más segmentos de cDNA, DNA genómico, DNA sintético o sus mezclas. Los nucleótidos (normalmente encontrados en su forma 5'-monofosfato) se denominan por una designación de una sola letra de la siguiente manera: "A" para adenilato o desoxiadenilato (para RNA o DNA, respectivamente), "C" para citidilato o desoxicitidilato, "G" para guanilato o desoxiguanilato, "U" para uridilato, "T" para desoxitimidilato, "R" para purinas (A o G), "Y" para pirimidinas (C o T), "K" para G o T, "H" para A o C o T, "I" para inosina y "N" para cualquier nucleótido.

Los términos "subfragmento que es funcionalmente equivalente" y "subfragmento funcionalmente equivalente" se usan indistintamente en la presente memoria. Estos términos se refieren a una porción o subsecuencia de un fragmento aislado de ácidos nucleicos en el que la capacidad para alterar la expresión génica o producir un cierto fenotipo es retenida tanto si el fragmento o subfragmento codifica o no una enzima activa. Por ejemplo, el fragmento o subfragmento se puede utilizar en el diseño de genes quiméricos para producir el fenotipo deseado en una planta transformada.

Los genes quiméricos pueden ser diseñados para usar en la supresión uniendo uno de sus fragmentos o subfragmentos de ácidos nucleicos, tanto si codifica o no una enzima activa, en la orientación sentido o antisentido con relación a una secuencia promotora de una planta.

Los términos "homología", "homólogo", "sustancialmente similar" y "sustancialmente correspondiente" se usan indistintamente en la presente memoria. Se refieren a fragmentos de ácidos nucleicos en donde los cambios en una o más bases nucleotídicas no afectan a la capacidad del fragmento de ácidos nucleicos para mediar la expresión génica o producir un cierto fenotipo. Estos términos se refieren también a modificaciones de los fragmentos de

ácidos nucleicos, tales como delección o inserción, de uno o más nucleótidos que no alteran sustancialmente las propiedades funcionales del fragmento de ácidos nucleicos resultante con relación al fragmento inicial, no modificado. Por tanto se entiende, como apreciarán los expertos en la técnica, que se describen más secuencias que las ilustrativas específicas.

"Gen" se refiere a un fragmento de ácidos nucleicos que expresa una proteína específica, que incluye secuencias reguladoras anteriores (secuencias no codificadoras en 5') y posteriores (secuencias no codificadoras en 3') a la secuencia codificadora. "Gen natural" se refiere a un gen como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen natural, que comprende secuencias reguladoras y codificadoras que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que proceden de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que proceden de la misma fuente, pero dispuestas de manera diferente a la encontrada en la naturaleza. Un gen "extraño" se refiere a un gen no encontrado normalmente en el organismo hospedante, pero que es introducido en el organismo hospedante por transferencia de genes. Los genes extraños pueden comprender genes naturales insertados en un organismo no natural o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que ha sido introducido en el genoma por un procedimiento de transformación. Un "alelo" es una de las diversas formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma. Cuando todos los alelos presentes en un locus dado en un cromosoma son iguales, la planta es homocigótica en ese locus. Si los alelos presentes en un locus dado en un cromosoma difieren, la planta es heterocigótica en ese locus. Un "gen con codones optimizados" es un gen que tiene su frecuencia de uso de codones diseñada para imitar la frecuencia del uso de codones preferida de la célula hospedante.

"Secuencia codificadora" se refiere a una secuencia de DNA que codifica una secuencia de aminoácidos específica. "Secuencias reguladoras" se refieren a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias no codificadoras en 5'), dentro o aguas abajo (secuencias no codificadoras en 3') de una secuencia codificadora, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del RNA o traducción de la secuencia codificadora asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir, aunque sin limitación, promotores, secuencias delanteras de la traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de la poliadenilación.

"Promotor" se refiere a una región de DNA capaz de controlar la expresión de una secuencia codificadora o el RNA funcional. La secuencia promotora consiste en elementos aguas arriba próximos y más distantes. Estos elementos aguas arriba se denominan con frecuencia potenciadores. Por consiguiente, un "potenciador" es una secuencia de DNA que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o especificidad tisular de un promotor. Los promotores pueden proceder en su totalidad de un gen natural o estar compuestos de diferentes elementos procedentes de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos sintéticos de DNA. Los expertos en la técnica entenderán que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en tejidos o tipos de células diferentes, o en etapas de desarrollo diferentes o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Se reconoce además que puesto que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no han sido completamente definidos, fragmentos de DNA con alguna variación pueden tener una actividad del promotor idéntica. Los promotores que hacen que un gen se exprese en la mayoría de tipos de células se denominan la mayoría de veces comúnmente "promotores constitutivos". Nuevos promotores de diversos tipos útiles en células vegetales se están descubriendo constantemente; se pueden encontrar numerosos ejemplos en la compilación de Okamoto and Goldberg (1989) *Biochemistry of Plants* 15:1-82.

Se puede utilizar cualquier promotor específico de semillas. Por tanto, el origen del promotor elegido para dirigir la expresión del fragmento de DNA recombinante no es crítico siempre que sea capaz de realizar los métodos descritos por la transcripción de suficiente RNA desde el o los fragmentos de ácidos nucleicos deseados en la semilla.

Una gran cantidad de promotores está descrita en el documento WO 00/18963, publicado el 6 de abril de 2000. Ejemplos de promotores específicos de semillas incluyen, aunque sin limitación, el promotor para el inhibidor de tripsina de Kunitz (Kti3, Jofuku and Goldberg (1989) *Plant Cell* 1:1079-1093), β -conglucina (Chen et al., (1989) *Dev. Genet.* 10:112-122), el promotor de napina y el promotor de faseolina de semillas de soja.

Ejemplos específicos de promotores que pueden ser útiles para expresar los fragmentos de ácidos nucleicos incluyen, aunque sin limitación, el promotor de SAM-sintetasa (publicación PCT WO00/37662, publicada el 29 de junio de 2000), el CaMV 35S (Odell et al., (1985) *Nature* 313:810-812) y el promotor descrito en la publicación PCT WO02/099063 publicada el 12 de diciembre de 2002.

La "secuencia delantera de la traducción" se refiere a una secuencia polinucleotídica localizada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificadora. La secuencia delantera de la traducción está presente en el mRNA completamente procesado aguas arriba de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia delantera de la traducción puede afectar al procesamiento del transcrito primario a mRNA, a la estabilidad del mRNA o a la eficacia de la traducción. Se han descrito ejemplos de secuencias delanteras de la traducción (Turner and Foster (1995) *Mol. Biotechnol.* 3:225-236).

Las "secuencias no codificadoras en 3'" o las "secuencias terminadoras/de terminación de la transcripción" se refieren a secuencias de DNA localizadas aguas abajo de una secuencia codificadora e incluyen secuencias de reconocimiento de la poliadenilación y otras secuencias que codifican las señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del mRNA o a la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza normalmente por

5 afectar a la adición de tramos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de mRNA. El uso de diferentes secuencias no codificadoras en 3' es ilustrado por Ingelbrecht et al., (1989) *Plant Cell* 1:671-680.

Un "intrón" es una secuencia intermedia en un gen que no codifica una porción de la secuencia de la proteína. Por tanto, dichas secuencias se transcriben en RNA pero después se escinden y no son traducidas. El término también se utiliza para las secuencias de RNA escindidas. Un "exón" es una porción de la secuencia de un gen que es

10 transcrito y se encuentra en el RNA mensajero maduro procedente del gen, pero no es necesariamente una parte de la secuencia que codifica el producto génico final.

El "transcrito de RNA" se refiere al producto que resulta de la transcripción catalizada por RNA-polimerasa de una secuencia de DNA. Cuando el transcrito de RNA es una copia complementaria perfecta de la secuencia de DNA, se denomina transcrito primario. Un transcrito de RNA se denomina RNA maduro cuando se trata de una secuencia de

15 RNA derivada del proceso post-transcripcional del transcrito primario. "RNA mensajero (mRNA)" se refiere al RNA que está sin intrones y que puede ser traducido en proteína por la célula. "cDNA" se refiere a un DNA que es complementario de un molde de mRNA y ha sido sintetizado a partir de dicho molde utilizando la enzima transcriptasa inversa. El cDNA puede ser monocatenario o ser convertido en forma bicatenaria utilizando el fragmento de Klenow de la DNA-polimerasa I. "RNA sentido" se refiere al transcrito de RNA que incluye el mRNA y puede ser traducido en proteína dentro de una célula o *in vitro*. "RNA antisentido" se refiere a un transcrito de RNA que es complementario a todo o parte de un transcrito primario diana o mRNA, y que bloquea la expresión de un gen diana (patente de EE.UU. Nº 5.107.065). La complementariedad de un RNA antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito del gen específico, es decir, en la secuencia no codificadora en 5', la secuencia no codificadora en 3', los intrones o la secuencia codificadora. "RNA funcional" se refiere a RNA antisentido, RNA ribozimas u otro

20 RNA que no pueda ser traducido pero todavía tenga un efecto sobre los procesos celulares. Los términos "complemento" y "complemento inverso" se usan indistintamente en la presente memoria con respecto a transcritos de mRNA y se entiende que definen el RNA antisentido del mensaje.

El término "unido operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácidos nucleicos en un solo fragmento de ácidos nucleicos, de modo que la función de uno es regulada por el otro. Por ejemplo, un promotor está unido

30 operativamente a una secuencia codificadora cuando es capaz de regular la expresión de dicha secuencia codificadora (es decir, que la secuencia codificadora está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificadoras pueden estar unidas operativamente a secuencias reguladoras en una orientación sentido o antisentido. En otro ejemplo, las regiones de RNA complementarias pueden estar unidas operativamente, ya sea directa o indirectamente, en 5' al mRNA diana o en 3' al mRNA diana o dentro del mRNA diana, o una primera región complementaria está en 5' y su complemento está en 3' respecto al mRNA diana.

35

El término "RNA endógeno" se refiere a cualquier RNA que esté codificado por cualquier secuencia de ácidos nucleicos presente en el genoma del hospedante antes de la transformación con la construcción recombinante descrita en la presente memoria, ya sea de origen natural o de origen no natural, es decir, introducida por medios recombinantes, mutagénesis, etc.

El término "de origen no natural" significa artificial, no coherente con el que se encuentra normalmente en la naturaleza.

40

Las técnicas estándares de DNA recombinante y de clonación molecular utilizadas en la presente memoria son bien conocidas en la técnica y están descritas más completamente en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989. Los métodos de transformación son bien

45 conocidos por los expertos en la técnica y se describen a continuación.

La "PCR" o "reacción en cadena de la polimerasa" es una técnica para la síntesis de grandes cantidades de segmentos de DNA específicos, y consiste en una serie de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Típicamente, el DNA bicatenario se desnaturaliza con calor, los dos cebadores complementarios a los límites en 3' del segmento diana se reasocian a baja temperatura y después se extienden a una temperatura intermedia. Un conjunto de estas tres etapas consecutivas se denomina un ciclo.

50

El término "recombinante" se refiere a una combinación artificial de dos segmentos de secuencia que de otro modo estarían separados, por ejemplo, por síntesis química o por la manipulación de segmentos aislados de ácidos nucleicos por técnicas de ingeniería genética.

Los términos "plásmido", "vector" y "casete" se refieren a un elemento extracromosómico que a menudo lleva genes que no son parte del metabolismo central de la célula, y por lo general en forma de fragmentos circulares de DNA bicatenario. Dichos elementos pueden ser secuencias que se replican autónomamente, secuencias integrantes del genoma, secuencias de fagos o nucleótidos, lineales o circulares, de un DNA o RNA monocatenario o bicatenario, derivadas de cualquier fuente, en las que se han unido o recombinado varias secuencias de nucleótidos en una

55

construcción única que es capaz de introducir en una célula un fragmento promotor y una secuencia de DNA para un producto génico seleccionado junto con una secuencia no traducida en 3' apropiada. "Casete de transformación" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos además del gen extraño que facilitan la transformación de una célula hospedante particular. "Casete de expresión" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos además del gen extraño que permiten la expresión mejorada de dicho gen en un hospedante extraño.

Los términos "construcción recombinante", "construcción de expresión", "construcción quimérica", "construcción" y "construcción de DNA recombinante" se usan indistintamente en la presente memoria. Una construcción recombinante comprende una combinación artificial de fragmentos de ácidos nucleicos, por ejemplo, secuencias reguladoras y codificadoras que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por ejemplo, una construcción quimérica puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que proceden de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras que proceden de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente de la encontrada en la naturaleza. Dicha construcción se puede usar tal cual o se puede usar junto con un vector. Si se usa un vector, entonces la elección del vector depende del método que se utilice para transformar las células hospedantes, como saben los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un vector plasmídico. Los expertos en la técnica saben qué tipo de elementos genéticos deben estar presentes en el vector para transformar, seleccionar y propagar con éxito las células hospedantes que comprenden cualquiera de los fragmentos de ácidos nucleicos aislados descritos en la presente memoria. El experto en la técnica reconocerá también que diferentes episodios de transformación independientes darán como resultado diferentes niveles y patrones de expresión (Jones et al., (1985) *EMBO J.* 4:2411-2418; De Almeida et al., (1989) *Mol. Gen. Genetics* 218:78-86), y por tanto que deben seleccionarse múltiples episodios con el fin de obtener líneas que muestren el nivel y patrón de expresión deseados. Dicha selección puede ser realizada por análisis de Southern del DNA, análisis de Northern de la expresión de mRNA, análisis de inmunotransferencia de la expresión de proteínas o análisis fenotípico, entre otros.

El término "expresión", como se usa en la presente memoria, se refiere a la obtención de un producto final funcional, por ejemplo, un mRNA o una proteína (precursora o madura).

El término "casete de expresión", como se usa en la presente memoria, se refiere a un fragmento específico de ácidos nucleicos en el que se puede mover una secuencia o fragmento de ácidos nucleicos.

Proteína "madura" se refiere a un polipéptido procesado después de la traducción; es decir, uno del que se han eliminado cualesquiera pre- o pro-péptidos presentes en el producto de traducción primario. Proteína "precursora" se refiere al producto primario de traducción del mRNA; es decir, con pre- y pro-péptidos todavía presentes. Los pre- y pro-péptidos pueden ser, aunque sin limitación, señales de localización intracelular.

"Cosupresión" se refiere a la producción de transcritos de RNA sentido capaces de suprimir la expresión de genes naturales idénticos o sustancialmente similares (Patente de EE.UU. N° 5.231.020, expedida a Jorgensen et al., el 27 de julio de 1999). Las construcciones de cosupresión en plantas han sido diseñadas previamente centrándose en la sobreexpresión de una secuencia de ácidos nucleicos que tiene homología con un mRNA natural, en la orientación sentido, lo que da como resultado la reducción de todo el RNA que tiene homología con la secuencia sobreexpresada (véanse Vaucheret et al., (1998) *Plant J.* 16:651-659; y Gura (2000), *Nature* 404:804-808). "Inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de RNA antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. Se pueden utilizar secuencias virales de plantas para dirigir la supresión de secuencias que codifican el mRNA próximo (Publicación PCT WO 98/36083 publicada el 20 de agosto de 1998). Se han descrito estructuras en forma de "horquilla" que incorporan toda, o parte, de una secuencia que codifica mRNA en una orientación complementaria dando como resultado una estructura potencial "de tramo lineal-bucle" para el RNA expresado (Publicación PCT WO 99/53050 publicada el 21 de octubre de 1999). En este caso, el tramo lineal está formado por polinucleótidos correspondientes al gen de interés insertado, ya sea en orientación sentido o antisentido con respecto al promotor y el bucle está formado por algunos polinucleótidos del gen de interés, que no tienen un complemento en la construcción. Esto aumenta la frecuencia de cosupresión o silenciamiento en las plantas transgénicas recuperadas. Para revisión de la supresión de la horquilla véase Wesley et al., (2003) *Methods in Molecular Biology, Plant Functional Genomics: Methods and Protocols* 236:273-286. Una construcción en la que el tramo lineal está formado por al menos 30 nucleótidos de un gen que se ha de suprimir y el bucle está formado por una secuencia aleatoria de nucleótidos ha sido también utilizado eficazmente para la supresión (documento WO 99/61632 publicado el 2 de diciembre de 1999). También está descrito el uso de secuencias de poli-T y poli-A para generar el tramo lineal en la estructura tramo lineal-bucle (documento WO 02/00894 publicado el 3 de enero de 2002). Incluso otra variación incluye el uso de repeticiones sintéticas para promover la formación de un tramo lineal en la estructura tramo lineal-bucle. Los organismos transgénicos preparados con dicho fragmento de DNA recombinante muestran niveles reducidos de la proteína codificada por el polinucleótido del que procede el fragmento de nucleótidos que forma el bucle como se ha descrito en la publicación PCT WO 02/00904, publicada el 3 de enero de 2002. También se ha descrito el uso de construcciones que dan como resultado dsRNA. En estas construcciones, promotores convergentes dirigen la transcripción de los RNA sentido y antisentido específicos de genes que inducen la supresión génica (véase, por ejemplo Shi et al., (2000) *RNA* 6:1069-1076; Bastin et al., (2000) *J. Cell Sci.* 113:3321-3328; Giordano et al., (2002) *Genetics* 160:637-648; LaCount and Donelson. Solicitud de patente de EE.UU. N° 20020182223, publicada el 5 de diciembre de 2002; Tran et al., (2003) *BMC Biotechnol.* 3:21;

y la solicitud provisional de patente de EE.UU. de la firma solicitante N° 60/578.404, presentada el 9 de junio de 2004).

Otros métodos para suprimir una enzima incluyen, aunque sin limitación, el uso de polinucleótidos que puedan formar un RNA catalítico o puedan tener actividad de ribozima (Patente de EE.UU. N° 4.987.071 concedida el 22 de enero de 1991), y la interferencia por micro RNA (también llamado miRNA) (Javier et al., (2003) *Nature* 425:257-263).

Los microRNA (miRNA) son pequeños RNA reguladores que controlan la expresión génica. Los miRNA se unen a regiones de los RNA diana e inhiben su traducción y, por tanto, interfieren con la producción del polipéptido codificado por el RNA diana. Los miRNA pueden ser diseñados para ser complementarios con cualquier región del RNA de la secuencia diana incluyendo la región en 3' no traducida, la región codificadora, etc. Los miRNA se procesan a partir de precursores de RNA altamente estructurados que son procesados por la acción de una ribonucleasa III denominada DICER. Aunque el mecanismo exacto de acción de los miRNA es desconocido, parece que actúan para regular la expresión del gen diana. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. N° 2004/0268441 A1 que fue publicada el 30 de diciembre de 2004.

El término "expresión", como se usa en la presente memoria, se refiere a la obtención de un producto final funcional, ya sea mRNA o la traducción del mRNA en un polipéptido.

"Inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcritos de RNA antisentido capaces de suprimir la expresión de la proteína diana. "Cosupresión" se refiere a la producción de transcritos de RNA sentido capaces de suprimir la expresión de genes extraños o endógenos idénticos o sustancialmente similares (Patente de EE.UU. N° 5.231.020).

"Sobreexpresión" se refiere a la producción de un producto final funcional en organismos transgénicos que supera los niveles de producción cuando se compara con la expresión de ese producto final funcional en un organismo normal, de tipo natural o no transformado.

"Transformación estable" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácidos nucleicos en un genoma de un organismo hospedante, incluyendo tanto genomas nucleares como organulares, dando como resultado una herencia genéticamente estable. Por el contrario, "transformación transitoria" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácidos nucleicos en el núcleo, u orgánulo que contiene DNA, de un organismo hospedante dando como resultado la expresión génica sin integración ni herencia estable. Los organismos hospedantes que contienen los fragmentos de ácidos nucleicos transformados se denominan organismos "transgénicos".

Las técnicas estándares de DNA recombinante y de clonación molecular utilizadas en la presente memoria son bien conocidas y han sido descritas por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989); por Silhavy et al., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984); y por Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987). Una vez realizada la construcción recombinante, puede ser introducida a continuación en una célula vegetal o célula de levadura elegida por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, por ejemplo, transfección, transformación y electroporación (véase más adelante). Las células vegetales preferidas son las células de plantas oleaginosas. A continuación se cultiva la célula vegetal transformada y se regenera en condiciones adecuadas que permitan la expresión de la construcción recombinante que a continuación se recupera y purifica.

Las construcciones recombinantes se pueden introducir en una célula vegetal o, alternativamente, se puede introducir una construcción en células vegetales separadas.

La expresión en una célula vegetal se puede realizar de una manera transitoria o estable como se ha descrito anteriormente.

Las partes de la planta comprenden tejidos diferenciados y no diferenciados, incluyendo aunque sin limitación: raíces, tallos, brotes, hojas, polen, semillas, tejido tumoral y diversas formas de células y cultivo, tales como células individuales, protoplastos, embriones y tejido calloso. El tejido de la planta puede estar en la planta o en un cultivo de órganos, tejidos o células.

El término "órgano de la planta" se refiere a tejido o grupo de tejidos de la planta que constituyen una parte morfológica y funcionalmente distinta de una planta. El término "genoma" se refiere a lo siguiente: 1. El complemento entero de material genético (genes y secuencias no codificadoras) que está presente en cada célula de un organismo o virus u orgánulo. 2. Un conjunto completo de cromosomas heredados como una unidad (haploides) de uno de los progenitores. El término "integrado establemente" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácidos nucleicos en el genoma de un organismo o célula hospedante dando como resultado la herencia genéticamente estable.

Los métodos para transformar dicotiledones, principalmente por el uso de *Agrobacterium tumefaciens* y obtener plantas transgénicas se han publicado, entre otros, para algodón (patente de EE.UU. N° 5.004.863, patente de EE.UU. N° 5.159.135); soja (patente de EE.UU. N° 5.569.834, patente de EE.UU. N° 5.416.011); *Brassica* (patente

de EE.UU. Nº 5.463.174); cacahuete (Cheng et al., (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657, McKently et al., (1995) *Plant Cell Rep.* 14:699-703); papaya (Ling et al., (1991) *Bio/technology* 9:752-758); y guisante (Grant et al., (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-258). Para una revisión de otros métodos de transformación de plantas comúnmente utilizados véase Newell (2000) *Mol. Biotechnol.* 16:53-65. Uno de estos métodos de transformación usa *Agrobacterium rhizogenes* (Tepfler, and Casse-Delbart (1987) *Microbiol. Sci.* 4:24-28). Está publicada la transformación de soja utilizando el suministro directo de DNA por fusión con PEG (publicación PCT WO 92/17598), por electroporación (Chowrira et al., (1995) *Mol. Biotechnol.* 3:17-23; Christou et al., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:3962-3966), por microinyección o por bombardeo de partículas (McCabe et al., (1988) *Bio/technology* 6:923; Christou et al., (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674).

Existe una variedad de métodos para la regeneración de plantas a partir de tejido vegetal. El método particular de regeneración dependerá del tejido vegetal de partida y de la especie de planta particular que se ha de regenerar. La regeneración, el desarrollo y el cultivo de plantas a partir de transformantes de un solo protoplasto vegetal o de diversos explantes transformados son bien conocidos en la técnica (Weissbach and Weissbach, (1988) en: *Methods for Plant Molecular Biology*, (Eds.), Academic: San Diego, CA). Este proceso de regeneración y crecimiento incluye típicamente las etapas de selección de células transformadas, cultivo de dichas células individualizadas por las etapas habituales de desarrollo embrionario a través de la fase de plántula enraizada. Los embriones y las semillas transgénicos se regeneran de manera similar. Los brotes enraizados transgénicos resultantes se plantan a continuación en un medio apropiado para el crecimiento de plantas, tal como tierra. Preferiblemente, las plantas regeneradas se auto-polinizan para proporcionar plantas transgénicas homocigóticas. O bien, el polen obtenido de las plantas regeneradas se cruza con plantas productoras de semillas de líneas agrónomicamente importantes. Por el contrario, el polen de plantas de estas líneas importantes se usa para polinizar plantas regeneradas. Una planta transgénica que contiene un polipéptido deseado se cultiva utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Además de los procedimientos antes descritos, los profesionales están familiarizados con los materiales de fuentes estándares que describen condiciones y procedimientos específicos para la construcción, la manipulación y el aislamiento de macromoléculas (por ejemplo, moléculas de DNA, plásmidos, etc.), la generación de fragmentos de DNA recombinantes y de construcciones de expresión recombinantes y el cribado y aislamiento de clones (véase, por ejemplo, Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor: NY; Maliga et al., (1995) *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor NY; Birren et al., (1998) *Genome Analysis: Detecting Genes*, 1, Cold Spring Harbor: NY; Birren et al., (1998) *Genome Analysis: Analyzing DNA*, 2, Cold Spring Harbor: NY; *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, eds. Clark, Springer: NY (1997)).

En un aspecto, la presente invención incluye productos proteínicos derivados de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico. Como se menciona en la presente memoria, semillas de soja con alto contenido de ácido oleico tienen un contenido de ácido oleico de al menos 60%.

La presente invención incluye un producto proteínico obtenido de semillas de soja con alta contenido en ácido oleico en donde dicho producto tiene al menos una característica seleccionada del grupo que consiste en blancura mejorada, resistencia de gel reducida y viscosidad reducida en comparación con un producto de proteínas de soja obtenido a partir de una semilla de soja comercial, utilizando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de una semilla de soja con alto contenido de ácido oleico.

Otra realización se refiere a un producto proteínico obtenido a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico, en donde el índice de blancura está aumentado en al menos 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49% o 50% en comparación con un producto de proteínas de soja obtenido a partir de una semilla de soja comercial, utilizando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de una semilla de soja con alto contenido en ácido oleico.

Una realización adicional se refiere a un producto proteínico obtenido a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico, en donde la resistencia de gel está reducida en al menos 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% o 60% en comparación con un producto de proteínas de soja obtenido a partir de una semilla de soja comercial, utilizando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de una semilla de soja con alto contenido en ácido oleico.

Una realización adicional se refiere a un producto proteínico no hidrolizado obtenido a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico, en el que está reducida la resistencia de gel en comparación con un producto de proteínas de soja obtenido a partir de una semilla de soja comercial utilizando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de una semilla de soja con alto contenido en ácido oleico.

Una realización adicional se refiere a un producto proteínico no hidrolizado obtenido a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico, en el que la resistencia de gel está reducida en al menos 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%,

50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% o 60% en comparación con un producto de proteínas de soja obtenido a partir de una semilla de soja comercial, utilizando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de una semilla de soja con alto contenido en ácido oleico.

Incluso otra realización se refiere a un producto proteínico obtenido a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico, en donde la viscosidad está reducida en al menos 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86% u 87% en comparación con un producto de proteínas de soja obtenido a partir de una semilla de soja comercial, utilizando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de una semilla de soja con alto contenido en ácido oleico.

Una ventaja de tener una viscosidad reducida es que mejora la eficiencia de secado. Actualmente con la soja comercial hay una limitación en la concentración de sólidos de alimentación que se pueden alimentar al secador, como resultado de la viscosidad y la propensión a agregarse y formar un gel como resultado de la exposición al calor. Si la soja comercial debe ser secada con alto contenido de sólidos, es necesario aumentar la temperatura de los sólidos de alimentación para prevenir la agregación de proteínas con la gelificación resultante; este aumento del calor es costoso y da como resultado graves daños a la solubilidad de la proteína.

Las propiedades de viscosidad y formación de gel reducidas permiten al operador aumentar significativamente la concentración de sólidos de alimentación, debido a que la suspensión puede ser fácilmente bombeada a través del equipo a temperaturas normales sin gelificación. Eso significa que durante el proceso de secado, se ha de eliminar menos agua por cada kilo alimentado al secador. Esto se traduce en la disminución del consumo de energía y más sólidos que se pueden secar por hora dando como resultado más producto proteínico para la venta.

Otra realización de la invención se refiere a un producto de proteínas de soja como se ha definido en la presente memoria seleccionado del grupo que consiste en un aislado de proteínas de soja, un concentrado de proteínas de soja, harina de soja, harina fina con toda la grasa, harina fina desgrasada, leche de soja, proteínas texturizadas, harinas texturizadas, concentrados texturizados y aislados texturizados.

Como se usa en la presente memoria, "leche de soja" se refiere a una mezcla acuosa de uno cualquiera o más de los siguientes, semillas de soja finamente trituradas, harina fina de soja, copos de soja, concentrado de soja, proteína de soja aislada, proteína de suero de soja y extractos acuosos de uno cualquiera o más de los siguientes, semillas de soja, copos de soja y harina fina de soja, en los que ha sido eliminado el material insoluble. La leche de soja puede comprender componentes adicionales incluyendo, aunque sin limitación, grasas, carbohidratos, edulcorantes, colorantes, estabilizantes, espesantes, aromatizantes, ácidos y bases.

Un modo de preparar la leche de soja se describe a continuación.

Los estabilizantes (carboximetilcelulosa y carragenina) se mezclan en seco con un poco de azúcar y se añaden hasta 90% de agua. La mezcla se agita con cizallamiento de moderado a alto durante un minuto o hasta que no se observen grumos. Se añaden durante un minuto agentes secuestrantes (citrato de potasio, hexametáfosfato de sodio y fosfato de potasio) mezclados. Se añade la proteína y se dispersa bien. La suspensión se calienta hasta 76,66°C (170°F) y se mantiene durante 10 minutos. Los ingredientes secos restantes se añaden a la suspensión de proteínas y se mezclan durante 5 minutos. Se añade el aceite de semilla de soja con agitación constante y se mezcla durante tres minutos. La mezcla de vitaminas y minerales se dispersa en 10% de agua, se añade a la suspensión de proteínas y se mezcla durante 5 minutos. El pH de la suspensión se ajusta a 7,0-7,2 usando si es necesario NaOH. La suspensión se homogeneiza a 3,45 MPa (500 psi) (segunda etapa) y 17,24 MPa (2500 psi) (primera etapa). La suspensión se pasteuriza por tratamiento a temperatura ultra alta (UHT) a 141°C (286°F) durante 6 segundos. La mezcla se enfría a 31°C (88°F) y se envasa en botellas esterilizadas. El producto se almacena a temperaturas de refrigeración.

Como se usa en la presente memoria, "leche de soja en polvo" se refiere a una leche de soja deshidratada. La leche de soja puede ser deshidratada por muchos procesos que incluyen, aunque sin limitación, secado por pulverización, secado en bandeja, secado en túnel y liofilización.

Otra realización de la invención se refiere a un método para mejorar la eficiencia de secado de un producto de proteínas de soja, que comprende alimentar al menos un producto de proteínas de soja obtenido a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tiene un contenido de ácido oleico de al menos 60% en sólidos de alimentación superiores, a un pasteurizador o un secador en comparación con la alimentación de al menos un producto de proteínas de soja obtenido a partir de semillas de soja comercial a un pasteurizador o secador.

Una realización adicional de la invención se refiere a un método para mejorar la eficiencia de secado, que comprende alimentar productos de proteínas de soja con alto contenido en ácido oleico a un pasteurizador o un secador con no menos de 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% o 30% de sólidos de alimentación en comparación con la alimentación de productos de proteínas de soja

comerciales, usando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tiene un contenido de ácido oleico de al menos 60%.

Los productos de proteínas de soja se dividen en tres grupos principales. Estos grupos se basan en el contenido de proteínas y varían del 40% a más del 90%. Los tres grupos de productos básicos de proteínas de soja (excepto harinas con toda la grasa) proceden de copos desgrasados. Son los siguientes: harinas y sémolas de soja, concentrados de proteínas de soja y aislados de proteínas de soja. Estos se estudian más completamente a continuación.

Como se usa en la presente memoria, los términos "producto de proteínas no hidrolizadas", "producto de proteínas de soja no hidrolizadas" se refieren a un producto de proteínas que no ha experimentado una etapa de hidrólisis enzimática de proteínas.

Como se usa en la presente memoria, el término "hidrólisis enzimática" se refiere a la rotura de las proteínas o compuestos químicos por adición de enzimas específicas.

Las realizaciones adicionales de la invención incluyen productos de proteínas de soja con al menos 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96% o 97% de proteínas (N x 6,25) sobre una base libre de humedad.

Los productos de proteínas de soja de la invención pueden ser incorporados en alimentos, bebidas y piensos.

El término "piensos" se refiere a alimentos que se da a los animales, tales como ganado y animales de compañía. Algunos piensos proporcionan una dieta sana y nutritiva, mientras que otros pueden carecer de nutrientes. A los animales se les da una amplia gama de diferentes piensos, pero los dos tipos principales de piensos para animales son piensos procesados para animales (piensos compuestos) y forraje.

Los piensos compuestos son piensos que se mezclan a partir de diversas materias primas y aditivos. Los principales ingredientes utilizados en los piensos preparados comercialmente son los cereales forrajeros, que incluyen maíz, semillas de soja, sorgo, avena y cebada. Estas mezclas se formulan de acuerdo con los requisitos específicos del animal diana (que incluye diferentes tipos de ganado y animales de compañía).

Son fabricados por mezcladores de alimentos del tipo de harina, pellets o migas.

Los piensos compuestos pueden ser piensos completos que proporcionan todos los nutrientes requeridos diariamente, concentrados que proporcionan una parte de la ración (proteínas, energía) o suplementos que sólo proporcionan micronutrientes adicionales, tales como minerales y vitaminas.

La oxidación y por tanto la vida útil de los ingredientes de los piensos es un problema común en la industria. La oxidación es una reacción química irreversible en la que el oxígeno reacciona con el pienso y los componentes del pienso y puede dar como resultado una disminución de la salud y el rendimiento del animal. Los efectos negativos de la oxidación se pueden ver en la pérdida de palatabilidad, la degradación del componente oleoso, el desarrollo de productos de descomposición no deseados, cambios de color y la pérdida de energía. La carne obtenida de animales criados con piensos oxidados tiene significativamente menor estado oxidante en comparación con la de los animales alimentados con un pienso que no ha experimentado una oxidación significativa. La carne de animales alimentados con dietas que contienen productos con alto contenido en ácido oleico muestran una vida útil más larga y una mayor estabilidad frente a la oxidación (Publicación PCT WO/2006/002052, publicada el 5 de enero de 2006), particularmente cuando se combina con antioxidantes, tales como tocoles. Por tanto, es muy deseable evitar la oxidación del pienso y de los ingredientes del pienso para proteger tanto el valor nutricional como la calidad organoléptica.

Se utilizan antioxidantes sintéticos para preservar la calidad del pienso evitando la oxidación de los lípidos, que puede conducir a un mejor rendimiento de los animales. En general, los antioxidantes sintéticos pueden actuar como eliminadores de radicales libres y reducir con ello la oxidación de lípidos. Los antioxidantes sintéticos pueden prolongar la vida útil del pienso y proteger la calidad nutricional y organoléptica.

Existen múltiples métodos para analizar el estado de oxidación de los materiales sólidos, incluyendo la harina de soja y otros productos de proteínas de soja, incluyendo los métodos de aceleración del envejecimiento que predicen la vida útil del material. Un ensayo que se puede utilizar es envejecer un material, bien a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas, y medir el estado oxidante del material en momentos específicos. El instrumento OSI es útil a este respecto porque refleja la cantidad de tiempo necesario para iniciar el proceso de oxidación conocido como el tiempo de inducción. Un tiempo de inducción más largo significa que el material tiene mayor estabilidad frente a la oxidación y por tanto una vida útil más larga. Otros métodos incluyen la medición de compuestos volátiles y de cambio de color.

Los métodos para obtener productos de proteínas de soja son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener productos de proteínas de soja por una variedad de modos. Las condiciones usadas típicamente para preparar aislados de proteínas de soja han sido descritas por (Cho, et al., (1981), patente de EE.UU. N° 4.278.597; Goodnight, et al., (1978), patente de EE.UU. N° 4.072.670). Los concentrados de proteínas de soja se producen por tres procesos básicos: lixiviación ácida (a aproximadamente pH 4,5), extracción con alcohol (aproximadamente 55-80%) y desnaturalización de las proteínas con calor húmedo antes de extracción con agua. Las condiciones utilizadas típicamente para preparar concentrados de proteínas de soja han sido descritas por Pass ((1975), patente de EE.UU. N° 3.897.574) y Campbell et al., ((1985) en *New Protein Foods*, ed. by Altschul and Wilcke, Academic Press, Vol., Chapter 10, *Seed Storage Proteins*, pp. 302-338).

- 10 "Productos que contienen semilla de soja" o "productos de soja" se pueden definir como los productos que contienen/incorporan un producto de proteínas de soja.

Por ejemplo, "productos de proteínas de soja" pueden incluir, aunque sin limitación, los artículos que se recogen en la

Tabla 2

- 15 Productos de proteínas de soja derivados de semillas de soja^a

<u>Productos enteros de semillas de soja</u>	<u>Productos procesados de proteínas de soja</u>
Semillas de soja tostadas	Harinas finas con toda la grasa y desgrasadas
Semillas de soja asadas	Sémola de soja
Brotes de soja	Hipocótilos de soja
Leche de soja	Harina de soja
	Leche de soja
	Leche de soja en polvo
	Aislados de proteínas de soja
<u>Alimentos/ingredientes de soja artesanales</u>	
Leche de soja	Concentrados de proteínas de soja
Tofu	Proteínas de soja texturizada
Tempeh	Harinas finas y concentrados texturizados
Miso	Concentrados texturizados
Salsa de soja	Aislados texturizados
Proteínas vegetales hidrolizadas	Productos crujientes de soja
Batido de proteínas	

^aVéase *Soy Protein Products: Characteristics, Nutritional Aspects and Utilization* (1987). *Soy Protein Council*.

- 20 "Procesamiento" se refiere a cualesquiera métodos físicos y químicos utilizados para obtener los productos recogidos en la Tabla 2, e incluye, aunque sin limitación, acondicionamiento térmico, descascarillamiento y molienda, extrusión, extracción con disolventes o empapamiento acuoso y extracción de las semillas enteras o parciales. Además, el "procesamiento" incluye los métodos usados para concentrar y aislar las proteínas de soja a partir de semillas enteras o parciales, así como los diversos métodos orientales tradicionales en la preparación de productos alimenticios de soja fermentados. Se han establecido normas y especificaciones comerciales para muchos de estos productos (véase *National Oilseed Processors Association Yearbook and Trading Rules* 1991-1992).

- 25 Copos desgrasados se refieren a cotiledones descascarillados en forma de copos que han sido desgrasados y tratados con calor controlado para eliminar el hexano restante. Este término también puede referirse a una harina fina o sémola que ha sido molida.

- Copos "blancos" se refieren a cotiledones descascarillados en forma de copos que han sido desgrasados y tratados con calor controlado para eliminar el hexano restante. Este término también puede referirse a una harina fina que ha sido molida.

- 30 "Sémola" se refiere a cotiledones descascarillados desgrasados que pasan por un tamiz estándar de EE.UU. entre los números 10 y 80.

"Concentrados de proteínas de soja" se refieren a los productos obtenidos a partir de semillas de soja desgrasadas y descascarilladas que contienen típicamente 65% en peso a 90% en peso de proteínas de soja sobre una base libre de humedad. Los concentrados de proteínas de soja son fabricados típicamente por tres procesos básicos: lixiviación ácida (a aproximadamente pH 4,5), extracción con alcohol (aproximadamente 55-80%) y desnaturalización de las proteína con calor húmedo antes de extracción con agua. Las condiciones utilizadas típicamente para preparar concentrados de proteínas de soja han sido descritas por Pass (1975), patente de EE.UU. N° 3.897.574; Campbell et al., (1985) en *New Protein Foods*, ed. by Altschul and Wilcke, Academic Press, Vol. 5, Chapter 10, *Seed Storage Proteins*, pp. 302-338).

Como se utiliza en la presente memoria, el término "aislado de proteínas de soja" o "proteínas de soja aisladas" se refiere a un material que contiene proteínas de soja que contiene al menos 90% de proteínas de soja en peso sobre una base libre de humedad.

"Extrusión" se refiere a procesos mediante los cuales se hace pasar los materiales (sémola, harina fina o concentrado) a través de un tornillo sinfín con camisa utilizando altas presiones y temperaturas como un medio para alterar la textura del material. "Texturización" y "estructuración" se refieren a procesos de extrusión utilizados para modificar las características físicas del material. Las características de estos procesos, incluyendo la extrusión termoplástica, han sido descritas previamente (Atkinson (1970), patente de EE.UU. N° 3.488.770, Horan (1985) en *New Protein Foods*, ed. by Altschul and Wilcke, Academic Press, Vol. 1A, Chapter 8, pp. 367-414). Además, las condiciones utilizadas durante el proceso de extrusión de las mezclas de productos alimenticios complejos que incluyen productos de proteínas de soja han sido descritas previamente (Rokey (1983) *Feed Manufacturing Technology III*, 222-237; McCulloch, patente de EE.UU. N° 4.454.804).

Análisis de ácidos grasos residuales. El procedimiento comercial utilizado para desgrasar copos de soja con hexano deja un residuo de ácidos grasos que pueden actuar como sustrato para la generación de compuestos con mal sabor. Dependiendo del método de análisis, el contenido de grasa residual de copos de soja desgrasados con hexano puede variar desde 0,6-1,0% (p:p) (extraíble con éter; AOCS Method 920.39 (Official Methods of Analysis of the AOAC International (1995), 16th Edition, Method 920.39C, Locator n° 4.2.01 (modified)) hasta 2,5-3% (p:p) (hidrolizable con ácido; AOAC Method 922.06 (Official Methods of Analysis of the AOAC International (1995), 16th Edition, Method 922.06, Locator 32.1.13 (modified)). La principal razón de discrepancia entre estos dos métodos de estimación de ácidos grasos residuales es la naturaleza química de las clases de grasas asociadas a la matriz proteínica después de la extracción con hexano. Una pequeña proporción de los ácidos grasos residuales está en forma de lípidos neutros (es decir, triglicéridos) y el resto está presente como lípidos polares (por ejemplo, fosfolípidos, también conocidos como lecitina). Debido a su naturaleza polar el fosfolípido es inaccesible a la extracción con éter y sólo es separado de la matriz proteínica si se realiza una hidrólisis ácida o algún otro protocolo de extracción restrictivo. Por tanto, la técnica de extracción con éter proporciona una estimación de la fracción neutra de lípidos mientras que el método hidrolizable con ácido proporciona una mejor estimación del contenido total de ácidos grasos residuales (es decir, fracciones neutras y polares).

Ambos métodos de la AOAC antes descritos se basan en determinaciones gravimétricas de los ácidos grasos residuales y, aunque en combinación dan una indicación de las clases de grasas (neutras frente a polares), dichas estimaciones son aproximadas y están sujetas a interferencia con otros materiales hidrófobos (por ejemplo, saponinas). Además, no se obtiene ninguna información sobre la composición de ácidos grasos y de que manera puede verse afectada por diversos tratamientos experimentales o por la genética del material de partida. Están disponibles métodos de la AOAC para la determinación de la composición de ácidos grasos de los ácidos grasos residuales (Official Methods of Analysis of the AOAC International (2000), 17th Edition, Method 983.23 Locator 45.4.02, Method 969.33 Locator 41.1.28, Method 996.06 Locator 41.1.28A). Estos se basan en la conversión de ácidos grasos residuales, extraídos por hidrólisis ácida, en ésteres metílicos de ácidos grasos antes del análisis por cromatografía de gases. Dichas técnicas rara vez se utilizan para evaluar el contenido de ácidos grasos residuales de materiales alimenticios en los ámbitos comerciales aunque se utilizan para evaluaciones de ácidos grasos en apoyo del etiquetado nutricional. Ha sido publicado recientemente un estudio en el que se han utilizado estos métodos para determinar la composición de ácidos grasos residuales de aislados comerciales de proteínas de soja (Solina et al., (2005) *Volatile aroma components of soy protein isolate and acid-hydrolysed vegetable protein. Food Chemistry* 90: 861-873).

Un método fácil para determinar la composición de ácidos grasos de las grasas residuales en los productos de proteínas de soja se describe en el Ejemplo 24. La ventaja de este método sobre otros es que no requiere ninguna extracción de las grasas residuales de la matriz antes de la derivatización para el análisis por cromatografía de gases (CG). Además, la técnica es adecuada para todas las formas de ácidos grasos es decir, si están inicialmente presentes como ácidos grasos libres o ésteres de ácidos grasos, por ejemplo, triglicéridos o fosfolípidos (Chistie (1989) *Gas Chromatography and Lipids*; The Oily Press. Ayr, Escocia). La técnica eliminará también ácidos grasos de la matriz proteínica incluso si el grupo de cabeza polar del fosfolípido está unido covalentemente a la proteína.

También, dentro del alcance de esta invención están alimentos, complementos alimenticios, barras de alimentos y bebidas, así como piensos (tales como, alimentos para animales de compañía) que tienen incorporado un producto de proteínas de semillas de soja de la invención. La bebida puede estar en forma líquida o en polvo seco.

Los alimentos a los que el producto de proteínas de semillas de soja de la invención se pueden incorporar/añadir incluyen casi todos los alimentos, bebidas y piensos (tales como alimentos para animales de compañía). Por ejemplo, se pueden mencionar complementos alimenticios, barras de alimentos, carnes tales como sustitutos de la carne, carnes picadas, carnes emulsionadas, carnes marinadas y carnes inyectadas con un producto de proteínas de soja de la invención. Se pueden incluir bebidas, tales como bebidas nutricionales, bebidas para deportistas, bebidas enriquecidas en proteínas, zumos, leche, alternativas a la leche y bebidas para pérdida de peso. También se pueden mencionar quesos, tales como quesos duros y blandos, queso cremosos y queso fresco. También se pueden incluir postres congelados, tales como helados, leche helada, postres helados con bajo contenido en grasas y postres helados no lácteos. Por último, se pueden incluir yogures, sopas, pudín, productos de panadería, aliño para ensaladas, pastas para untar y salsas (tales como mayonesa y salsas para untar).

Un producto de proteínas de soja se puede añadir en una cantidad seleccionada para suministrar una cantidad deseada a un alimento y/o bebida. Los términos "producto de proteínas de semillas de soja" y "producto de proteínas de soja" se usan indistintamente en la presente memoria.

Se puede utilizar como fuente de producto de proteínas de soja cualquier semilla de soja con alto contenido en ácido oleico ($\geq 60\%$ de ácido oleico), ya sea transgénica o no transgénica.

Se han descrito semillas de soja con niveles disminuidos de ácidos grasos saturados resultantes de la reproducción de mutaciones (Erickson et al., (1994) *J. Hered.* 79:465-468; Schnebly et al., (1994) *Crop Sci.* 34:829-833; y Fehr et al., (1991) *Crop Sci.* 31:88-89) y la modificación transgénica (Patente de EE.UU. N° 5.530.186). Se han descrito semillas de soja con niveles disminuidos de ácidos grasos poliinsaturados resultantes de la reproducción y selección de mutaciones. Se han conseguido niveles reducidos de ácido linolénico a ácido linoleico relativamente constante (Patente de EE.UU. N° 5.710.369 y Patente de EE.UU. N° 5.986.118). También se han obtenido menos ácidos linoleico y linolénico combinados usando reproducción de mutaciones, cruces genéticos y selección (Rahman, S. M. et al., (2001) *Crop Sci.* 41:26-29). Estos métodos produjeron semillas de soja con perfiles oleosos que tienen contenido de ácido linolénico de 1% a 3% de los ácidos grasos totales y niveles totales de ácidos grasos poliinsaturados de aproximadamente 30 a 35% en comparación con más del 6% de ácido linolénico y más del 50% de ácidos grasos poliinsaturados totales en las semillas de soja comerciales.

El descubrimiento de un método para alterar la expresión de las enzimas responsables de la introducción del segundo (publicación de patente internacional WO 94/11516) y tercero (publicación de patente internacional WO 93/11245) dobles enlaces en lípidos de almacenamiento de semillas de soja de manera dirigida ha permitido la producción de semillas de soja con un contenido de ácidos grasos alto de mono-insaturados y muy bajo de poliinsaturados y especialmente un contenido muy bajo de ácido linolénico. La combinación genética de estos dos perfiles de transgenes descrita en la Patente de EE.UU. N° 6.426.448 conduce a una línea de semillas de soja con un mínimo de poliinsaturados y alto contenido de monoinsaturados y estabilidad ambiental extrema del perfil de ácidos grasos de la semilla.

El gen de delta-12-desaturasa de ácidos grasos microsómicas descrito en el documento WO 94/11516, se puede utilizar para preparar una variedad de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico. La variedad de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico resultante fue una en la que los ácidos grasos poliinsaturados se redujeron del 70% de los ácidos grasos totales a menos del 5%.

Dos desaturasa de ácidos grasos de semillas de soja, denominadas FAD2-1 y FAD2-2, son Δ -12-desaturasa que introducen un segundo doble enlace en el ácido oleico formando el ácido linoleico, un ácido graso poliinsaturado. La FAD2-1 se expresa sólo en la semilla en desarrollo (Heppard et al., (1996) *Plant Physiol.* 110:311-319). La expresión de este gen aumenta durante el periodo de deposición de aceite, a partir de alrededor de 19 días después de la floración, y su producto génico es responsable de la síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados encontrados en el aceite de semillas de soja. GmFAD 2-1 ha sido descrito con detalle por Okuley, J. et al., (1994) *Plant Cell* 6:147-158 y en el documento WO 94/11516. Está disponible en la ATCC en forma del plásmido pSF2-169K (número de registro en ATCC 69092). La FAD2-2 se expresa en la semilla, hoja, raíz y tallo de la planta de soja a un nivel constante y es el gen de 12-desaturasa "constitutivo". El producto génico de FAD2-2 es responsable de la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados por las membranas celulares.

Puesto que la FAD2-1 es la enzima principal de este tipo en las semillas de soja, la reducción en la expresión de FAD2-1 da como resultado un aumento de la acumulación de ácido oleico (18:1) y una disminución correspondiente en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados.

La reducción de la expresión de la FAD2-2 en combinación con la FAD2-1 conduce a una mayor acumulación de ácido oleico y una disminución correspondiente del contenido en ácidos grasos poliinsaturados.

La FAD3 es una Δ -15-desaturasa que introduce un tercer doble enlace en el ácido linoleico (18:2) formando ácido linolénico (18:3). La reducción de la expresión de FAD3 en combinación con la reducción de la FAD2-1 y la FAD2-2 conduce a una mayor acumulación de ácido oleico y una disminución correspondiente del contenido de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácido linolénico.

Los fragmentos de ácidos nucleicos que codifican FAD2-1, FAD2-2 y FAD3 han sido descritos en los documentos WO 94/11516 y WO 93/11245. Las construcciones recombinantes quiméricas que comprenden todos o parte de estos fragmentos de ácidos nucleicos o sus complementos inversos unidos operativamente a al menos una secuencia reguladora adecuada se pueden construir cuando la expresión del gen quimérico da como resultado un fenotipo alterado de ácidos grasos. Una construcción recombinante quimérica se puede introducir en las plantas de soja por medio de técnicas de transformación bien conocidas por los expertos.

Se analizan plantas de soja transgénicas resultantes de una transformación con un DNA recombinante para seleccionar plantas con perfiles alterados de ácidos grasos. La construcción recombinante puede contener todo o parte de: 1) el gen de FAD2-1 o 2) el gen de FAD2-2 o 3) el gen de FAD3 o 4) combinaciones de todos o porciones de los genes de FAD2-1, FAD2-2 o FAD3.

Las construcciones recombinantes que comprenden todo o parte de: 1) el gen de FAD2-1 con o sin 2) todo o parte del gen de FAD2-2 con o sin todo o parte del gen de FAD3 se pueden utilizar en la preparación de una planta de soja transgénica que tenga un fenotipo con alto contenido en ácido oleico. Un perfil alterado de ácidos grasos, específicamente un aumento en la proporción de ácido oleico y una disminución en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados, indica que han sido suprimidos uno o más de los genes de FAD de semillas de soja (FAD2-1, FAD2-2, FAD3). Los ensayos pueden realizarse en cultivos y semillas de embriones somáticos de soja para determinar la supresión de FAD2-1, FAD2-2 o FAD3.

Los expertos en la técnica entenderán que se pueden utilizar construcciones recombinantes que comprenden secuencias distintas de las específicamente ilustradas que tengan funciones similares. Estas construcciones pueden incluir cualquier promotor específico de las semillas. Estas construcciones pueden o no incluir también cualesquiera nucleótidos que promuevan la formación de tramo lineal-bucle. Estas construcciones pueden contener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos idéntica a cualquier porción del gen o genes antes mencionados insertada en orientación sentido o antisentido respecto al promotor. Por último, estas construcciones pueden o no contener cualquier señal de terminación de la transcripción.

Una vez que se hayan obtenido suficientes semillas transgénicas que tengan el fenotipo deseado, se pueden preparar productos de proteínas de soja, tales como aislados proteínicos o leche de soja de la semilla completa.

Ejemplos

La presente invención se define adicionalmente en los siguientes Ejemplos, en los que las partes y porcentajes son en peso y los grados son Celsius, a menos que se indique lo contrario. Debe entenderse que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan solamente a modo de ilustración. De los expuesto anteriormente y de estos Ejemplos, los expertos en la técnica puede determinar las características esenciales de esta invención y pueden realizar diversos cambios y modificaciones de la invención para adaptarla a diversos usos y condiciones. Por tanto, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en la presente memoria serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Dichas modificaciones están abarcadas en la medida que están dentro del alcance de las reivindicaciones que se acompañan.

La producción de líneas de soja con alto contenido en ácido oleico se describe con detalle en los Ejemplos 3, 5 y 8, aunque no está limitada a los métodos allí descritos.

Ejemplo 1

Transformación de semillas de soja (*Glycine max*).

Cultivos de embriones y regeneración de plantas de soja.

Se transforman cultivos embriogénicos de semillas de soja en suspensión por el método de bombardeo con pistola de partículas usando procedimientos conocidos en la técnica (Klein et al., (1987) *Nature* (London) 327:70-73; Patente de EE.UU. N° 4.945.050; Hazel et al., (1998) *Plant Cell Rep.* 17:765-772; Samoylov et al., (1998) *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 34:8-13). En los procedimientos de bombardeo con pistola de partículas, es posible utilizar purificados: 1) el DNA plasmídico completo o 2) fragmentos de DNA que contienen sólo el(los) casete(s) de expresión de DNA recombinante de interés.

Se obtiene tejido madre para experimentos de transformación por iniciación a partir de semillas de soja inmaduras. Los embriones secundarios se escinden de explantes después de 6 a 8 semanas en un medio de iniciación de cultivos. El medio de iniciación es un medio MS modificado solidificado en agar-agar (Murashige and Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15:473-497) complementado con vitaminas, 2,4-D y glucosa. Los embriones secundarios se colocan en matraces en un medio líquido de mantenimiento de cultivo y se mantienen durante 7-9 días en un agitador rotatorio a 26±2°C bajo una intensidad de luz de -80 µEm-2s-1. El medio de mantenimiento del cultivo es un medio MS modificado complementado con vitaminas, 2,4-D, sacarosa y asparagina. Antes del bombardeo, los grumos de tejido se retiran de los matraces y se trasladan para el bombardeo a una placa de Petri de 60x15 mm vacía. El tejido se seca con papel de filtro Whatman N° 2. Se usan aproximadamente 100-200 mg del tejido correspondiente a 10-20 grumos (con un tamaño de 1-5 mm cada uno) por placa de tejido bombardeado.

Después del bombardeo, el tejido de cada placa bombardeada se divide y se coloca en dos matraces de medio líquido de mantenimiento de cultivo por placa de tejido bombardeado. Siete días después del bombardeo, el medio líquido de cada matraz se reemplaza por un medio de mantenimiento de cultivo de nueva aportación complementado con 100 ng/mL de agente selectivo (medio de selección). Para la selección de las células de semillas de soja transformadas el agente selectivo usado puede ser un compuesto de sulfonilurea (SU) con el nombre químico, 2-cloro-N-((4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il)aminocarbonil)bencenosulfonamida (nombres comunes: DPX-W4189 y clorsulfurón). El clorsulfurón es el ingrediente activo del herbicida de sulfonilurea de DuPont, GLEAN®. El medio de selección que contiene la SU se reemplaza cada semana durante 6-8 semanas. Después del período de selección de 6-8 semanas, se observan islas de tejido transformado verde, creciendo a partir de agrupaciones embriogénicas necróticas no transformadas. Estos supuestos episodios transgénicos se aíslan y se mantienen en medios con SU a 100 ng/mL durante otras 2-6 semanas cambiando el medio cada 1-2 semanas para generar nuevos cultivos embriogénicos transformados en suspensión clonalmente propagados. Los embriones pasan un total de alrededor de 8-12 semanas en contacto con la SU. Los cultivos en suspensión se subcultivan y se mantienen como agrupaciones de embriones inmaduros y también se regeneran en plantas enteras por maduración y germinación de embriones somáticos individuales.

Ejemplo 2

Análisis de ácidos grasos de semillas de soja.

Con el fin de determinar la composición alterada de ácidos grasos como resultado de la supresión de la desaturasa ácidos grasos, las cantidades relativas de los ácidos grasos, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico, se pueden determinar cómo sigue. Se preparan por transesterificación los ésteres metílicos de los ácidos grasos a partir de embriones individuales, de semillas de soja, somáticos maduros o de virutas de semillas de soja. Un embrión o una viruta de una semilla, se coloca en un vial que contiene 50 µL de hidróxido de trimetilsulfonio y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Después de 30 minutos se añaden 0,5 mL de hexano, la muestra se mezcla y se deja sedimentar durante 15 a 30 minutos para permitir que los ácidos grasos se repartan en la fase de hexano. Los ésteres metílicos de ácidos grasos (5 µL de la capa de hexano) se inyectan, separan y cuantifican usando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 equipado con una columna capilar de sílice fundida Omegawax 320 (Supelco Inc., N° de Catálogo 24152). La temperatura del horno se programa para mantenerla a 220°C durante 2,7 minutos, se aumenta hasta 240°C a 20°C por minuto, y luego se mantiene durante 2,3 minutos adicionales. Se suministra gas portador con un generador de hidrógeno Whatman. Los tiempos de retención se compararon con los de los ésteres metílicos de los patrones comercialmente disponibles (Nu-chek Prep, Inc. N° de catálogo U-99-A).

Ejemplo 3

Producción de semillas de soja con altos niveles de ácido oleico y/o altos niveles de ácido esteárico y/o bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados por supresión de desaturasas de ácidos grasos

Se prepararon fragmentos de DNA recombinantes y se utilizaron en la transformación de semillas de soja por la supresión simultánea de las desaturasas de ácidos grasos FAD2-1 y FAD2-2 y la desaturasa de ácidos grasos FAD3. Una descripción de la construcción de los fragmentos de DNA recombinantes se expone a continuación.

A. Fragmento de DNA recombinante PHP21676A

El fragmento de DNA recombinante PHP21676A contiene un casete de silenciamiento de la expresión de genes diseñado para silenciar la expresión de los genes de FAD2-1 y de FAD2-2 y el gen de FAD3, unidos en una configuración de cabeza a cabeza al fragmento de DNA recombinante del marcador seleccionable ALS del Ejemplo 1D siguiente. La secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA recombinante PHP21676A se muestra en la SEQ ID NO: 1. El fragmento de DNA recombinante PHP21676A contiene en la orientación 5' a 3':

a) la cadena complementaria del fragmento de DNA recombinante del marcador seleccionable ALS del Ejemplo 1 D siguiente,

b) aproximadamente 2088 nucleótidos del promotor Kti3,

c) una secuencia sintética de 74 nucleótidos,

d) un fragmento polinucleotídico de aproximadamente 1500 nucleótidos (nt) que comprende aproximadamente 470 nucleótidos del gen de FAD2-1 de semilla soja, 420 nucleótidos del gen FAD2-1 de semilla de soja y 643 nucleótidos del gen de FAD3 de semilla de soja insertado en un único sitio de endonucleasa de restricción Not I,

e) una repetición invertida de la secuencia sintética de 74 nucleótidos de c), y

f) aproximadamente 202 nucleótidos del terminador de la transcripción Kti3.

La secuencia del fragmento polinucleotídico de aproximadamente 1500 nucleótidos del apartado d) anterior se muestra en la SEQ ID NO: 2. El fragmento polinucleotídico de aproximadamente 1500 nt que comprende

aproximadamente 470 nucleótidos del gen de FAD2-2 de semilla de soja, aproximadamente 420 nucleótidos del gen de FAD2-1 de semilla de soja, aproximadamente 643 nucleótidos del gen de FAD3 de semilla de soja se construyó por amplificación por PCR de la manera siguiente.

5 Un fragmento de DNA de aproximadamente 0,9 kb, que comprende una porción del gen de FAD2-2 de semilla de soja y una porción del gen de FAD2-1 de semilla de soja, se obtuvo por amplificación por PCR usando los cebadores BM35 (SEQ ID NO: 3) y BM39 (SEQ ID NO: 4) y usando como molde, un fragmento de DNA recombinante KSFAD2-híbrido, descrito en el ejemplo 3 B siguiente.

10 Un fragmento de DNA de aproximadamente 0,65 kb, que comprende una porción de un gen de FAD3, se obtuvo por amplificación por PCR usando los cebadores BM40 (SEQ ID NO: 5) y BM41 (SEQ ID NO: 6) y usando como molde el plásmido pXF1. El plásmido pXF1 comprende un polinucleótido que codifica una delta-15-desaturasa (FAD3) de semilla de soja descrito en la Patente de EE.UU. N° 5.952.544 concedida el 14 de septiembre de 1999. El plásmido pXF1 se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD el 3 de diciembre de 1991 de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest, y tiene el número de registro ATCC 68874.

15 El fragmento de aproximadamente 0,9 kb, que comprende una porción del gen de FAD2-2 de semilla de soja y una porción del gen de FAD2-1 de semilla de soja, y el fragmento de aproximadamente 0,65 kb, que comprende una porción de un gen de FAD3, se mezclaron y se utilizaron como molde para una amplificación por PCR con BM35 y BM41 como cebadores para producir un fragmento de aproximadamente 1533 pb que se clonó en el plásmido pCR2.1 disponible comercialmente usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen).

20 Después de la digestión con NotI el fragmento de aproximadamente 1500 pb que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 se ligó en el sitio NotI del plásmido pKS210 (Ejemplo 1C siguiente).

B. Fragmento de DNA recombinante KSFAD2-híbrido

25 El fragmento de DNA recombinante KSFAD2-híbrido contiene un fragmento polinucleotídico de aproximadamente 890 pb que comprende aproximadamente 470 nucleótidos del gen de FAD2-2 de semilla de soja y 420 nucleótidos del gen de FAD2-1 de semilla de soja. La secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA recombinante KSFAD2-híbrido se muestra en la SEQ ID NO: 7. El fragmento de DNA recombinante KSFAD2-híbrido se construyó de la manera siguiente.

Un fragmento de DNA de aproximadamente 0,47 kb que comprendía una porción del gen de FAD2-2 de semilla de soja se obtuvo por amplificación por PCR usando los cebadores KS1 (SEQ ID NO: 8) y KS2 (SEQ ID NO: 9) y utilizando como molde DNA genómico purificado a partir de hojas de *Glycine max* cv. Jack.

30 Un fragmento de DNA de aproximadamente 0,42 kb que comprendía una porción del gen de FAD2-1 de semilla de soja se obtuvo por amplificación por PCR usando los cebadores KS3 (SEQ ID NO: 10) y KS4 (SEQ ID NO: 11) y utilizando como molde DNA genómico purificado a partir de hojas de *Glycine max* cv. Jack.

35 El fragmento de 0,47 kb que comprendía una porción del gen de FAD2-2 de semilla de soja y el fragmento de 0,42 kb que comprendía una porción del gen de FAD2-1 de semilla de soja se purificaron en gel usando el kit *GeneClean* (Qbiogene, Irvine, CA), se mezclaron, y se utilizaron como molde para la amplificación por PCR con KS1 y KS4 como cebadores obteniéndose un fragmento de aproximadamente 890 pb que se clonó en el plásmido pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI) comercialmente disponible para crear un plásmido que comprendía el fragmento de DNA recombinante KSFAD2-híbrido.

C. Preparación del plásmido pKS210 y el plásmido PHP17731

40 El plásmido pKS210 se deriva del vector de clonación pSP72 (Promega) disponible comercialmente. La región codificadora de beta-lactamasa ha sido reemplazada por un gen de higromicina-fosfotransferasa para su uso como un marcador seleccionable en *E. coli*. Además, se ha añadido un casete de silenciamiento de expresión génica unido en una configuración de cabeza a cabeza al fragmento de DNA recombinante del marcador seleccionable ALS del Ejemplo 1B. El casete de silenciamiento de la expresión génica en el plásmido pKS210 comprende el promotor Kti3, una secuencia sintética de 74 nucleótidos, un único sitio de endonucleasa de restricción NotI, una repetición invertida de la secuencia sintética de 74 nucleótidos, y la región terminadora Kti3. El gen que codifica Kti3 ha sido descrito (Jofuku and Goldberg (1989) *Plant Cell* 1:1079-1093). Las secuencias sintéticas de 74 nucleótidos de los apartados c) y e) (antes citados) promueven la formación de una estructura de tramo lineal. Se ha demostrado que la inserción de un fragmento de nucleótidos a partir de un gen deseado en el sitio único NotI da como resultado la supresión del gen deseado como se describe en la publicación PCT WO 02/00904, publicada el 3 de enero de 2002. La secuencia de nucleótidos de este casete de silenciamiento de la expresión génica específico de semillas a partir de pKS133 se muestra en la SEQ ID NO: 12. Un mapa del plásmido pKS210 se muestra en la Figura 1 y su secuencia de nucleótidos se describe en la SEQ ID NO: 13.

55 Se preparó el plásmido recombinante PHP17731, que contenía secuencias de genes para el silenciamiento simultáneo de uno de los genes de la delta-9-desaturasa de semilla de soja y del gen de la delta-12-desaturasa FAD2-1 de semilla de. El promotor KTi de semilla de soja, las regiones terminadoras junto con una secuencia

sintética de repetición invertida se tomaron del plásmido KS133 (documento WO 2002/016565A2, A3). Un fragmento del gen de FAD2-1 se amplificó por PCR utilizando DNA genómico de semilla de soja y la secuencia SEQ ID NO 5 de la patente de EE.UU. 6.372.965 B1 como molde para producir el fragmento desde 5423 hasta 6033 pares de bases de la SEQ ID NO: 14 (PHP17731). Adyacente a dicho fragmento se colocó una porción de la secuencia codificadora de la copia 3 de la delta-9-desaturasa de semilla de soja (secuencia 1 del documento WO 2002/016565A2, A3), que ahora comprende las bases 6054 hasta 411 de PHP17731. El fragmento PHP17731A (SEQ ID NO: 15) se retiró del vector de clonación PHP17731 por digestión con la endonucleasa de restricción *AscI* y se purificó como se describe en el apartado E a continuación. Un mapa del plásmido PHP17731 se muestra en la Figura 2.

D. Fragmento de DNA recombinante del marcador seleccionable ALS

Para la transformación de la semilla de soja se usó un fragmento de DNA recombinante que comprende un promotor constitutivo que dirige la expresión de un gen mutante de la acetolactato-sintasa (abreviadamente ALS por la expresión inglesa *AcetoLactate Synthase*) de semilla de soja seguido por el terminador de la transcripción en 3' de ALS de semilla de soja como un marcador seleccionable. El promotor constitutivo utilizado es un fragmento de DNA de 1,3 kb que actúa como el promotor para un gen de la S-adenosilmetionina-sintasa (SAMS) de semilla de soja y está descrito en la publicación PCT N° WO 00/37662 publicada el 29 de junio de 2000. La secuencia de nucleótidos de este fragmento de DNA recombinante utilizado como marcador seleccionable se muestra en la SEQ ID NO: 16. El gen mutante ALS de semilla soja codifica una enzima que es resistente a los inhibidores de ALS, tales como los herbicidas de sulfonilurea. La secuencia de aminoácidos deducida del ALS de soja mutante presente en el fragmento de DNA recombinante utilizado como marcador seleccionable se muestra en la SEQ ID NO: 17.

Los genes ALS de plantas mutantes que codifican enzimas resistentes a herbicidas de sulfonilurea están descritos en la Patente de EE.UU. N° 5.013.659. Uno de tales mutantes es el gen SURB-Hra del tabaco, que codifica una ALS resistente a herbicidas con dos sustituciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Esta ALS del tabaco resistente a herbicidas contiene alanina en lugar de prolina en la posición 191 en la "subsecuencia B" conservada (SEQ ID NO: 18) y leucina en lugar de triptófano en la posición 568 en la "subsecuencia F" conservada (SEQ ID NO: 19) (Patente de EE.UU. N° 5.013.659; Lee et al., (1988) EMBO J 7:1241-1248).

El fragmento de DNA recombinante del marcador seleccionable ALS se construyó usando un polinucleótido para un ALS de semilla de soja en el que se introdujeron por mutagénesis dirigida al sitio dos mutaciones similares a Hra. Por lo tanto, este fragmento de DNA recombinante se traducirá en una ALS de semilla de soja que tiene alanina en lugar de prolina en la posición 183 y leucina en lugar de triptófano en la posición 560.

Además, durante la construcción del casete de expresión del promotor SAMS-ALS mutante, la región codificadora del gen de ALS de semilla de soja se extendió en el extremo 5' con cinco codones adicionales, lo que da como resultado cinco aminoácidos (M-P-H-N-T; SEQ ID NO: 20), añadidos al extremo amino-terminal de la proteína ALS. Estos aminoácidos adicionales son adyacentes al péptido de tránsito, y presumiblemente eliminados con él, durante el envío de la proteína ALS mutante de semilla soja al plástido. Un fragmento de DNA que comprende un polinucleótido que codifica la ALS de semilla soja se digirió con *KpnI*, se hicieron sus extremos romos con DNA-polimerasa de T4, se digirió con *Sall* y se insertó en un plásmido que contenía el promotor SAMS que había sido digerido previamente con *NcoI* y se hicieron sus extremos romos rellenando con DNA-polimerasa de Klenow.

Se preparó un segundo plásmido marcador seleccionable y el fragmento subsiguiente sustituyendo el promotor SAMS descrito anteriormente por un promotor de planta alternativo expresado constitutivamente. El promotor sintético SCP1 (Patente de EE.UU. N° 6.072.050) se colocó delante de la secuencia codificadora de ALS mutante de semilla soja para formar el plásmido PHP17064 (SEQ ID NO 21 y la Figura 3). Para su uso en el fragmento de transformación PHP17064A de semilla de soja (SEQ ID NO: 22) se escindió de su vector de clonación usando la endonucleasa de restricción *XbaI* y se purificó como se describe en el apartado E siguiente.

E. Reparación de los fragmentos de DNA recombinante PHP21676A, PHP17731A y PHP17064A para la transformación de semillas de soja.

Para el uso en experimentos de transformación de plantas, el fragmento de DNA recombinante PHP21676A de 7993 pb se retiró de su plásmido de clonación utilizando la endonucleasa de restricción *AscI*. Cada uno de los fragmentos de DNA recombinante PHP21676A, PHP17731A y PHP17064A se separó del DNA plasmídico restante por electroforesis en gel de agarosa. Se llevó a cabo la precipitación del fragmento de DNA recombinante sobre partículas de oro y transformación de las semillas de soja como se describe en el Ejemplo 1. Por cada ocho transformaciones de bombardeo, se prepararon 30 µL de solución con 3 mg de 0,6 µm de partículas de oro y 1 a 90 picogramos (pg) de fragmento de DNA por par de bases del fragmento de DNA.

Alternativamente, se añadieron las mezclas de fragmentos PHP17064A y PHP17731A, ya sea en partes iguales o dos partes de PHP17731A por cada parte PHP17064A a partículas de oro en el mismo peso por par de bases como se describió anteriormente y se utiliza en la transformación para silenciar los genes de delta-9-desaturasa y delta-12-desaturasa.

Ejemplo 4

Análisis de ácidos grasos de semillas de soja transformadas con los fragmentos de DNA recombinante PHP21676A y con PHP17064A y PHP17731A combinados.

En un experimento de transformación de semillas de soja que utiliza el fragmento de DNA recombinante PHP21676A cómo se describe anteriormente, se obtuvieron 67 cultivos en suspensión embriogénicos transformados independientemente que eran resistentes a herbicidas de sulfonilurea. Un aumento en ácido oleico como un porcentaje de los cinco ácidos grasos principales, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico, es indicativo de la supresión de los genes de FAD2. Trece de los 67 cultivos en suspensión embriogénicos resistentes a herbicidas (19%) produjeron embriones somáticos con ácido oleico mayor del 25%, en comparación con ácido oleico de aproximadamente 8% para los embriones no transformados.

Se regeneraron plantas y se produjeron semillas T1 a partir de 9 de los 13 episodios. Las semillas se analizaron para determinar la supresión de desaturasas de ácidos grasos midiendo la composición de ácidos grasos del aceite de semilla como se ha descrito en el Ejemplo 2. Plantas derivadas de 5 episodios de transformación produjeron semillas que presentaban el fenotipo de alto contenido en ácido oleico y bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados.

En un experimento de transformación de semillas de soja, que utiliza la mezcla de los fragmentos de DNA recombinantes PHP17064A y PHP17731A, se obtuvieron cultivos en suspensión embriogénicos transformados que eran resistentes a herbicidas de sulfonilurea, se cribó el número de copias de los fragmentos transgénicos presentes por análisis de Southern y luego por el perfil de ácidos grasos del embrión somático. Un aumento en el nivel de ácido esteárico y de ácido oleico se tomó como indicativo del silenciamiento de las delta-9-desaturasa y delta-12-desaturasa expresadas en las semillas. Se regeneraron treinta y tres líneas candidatas transformadas hasta plantas de soja maduras y las semillas de los transformantes iniciales se analizaron para determinar el perfil de ácidos grasos. A partir de estas líneas se realizaron más selecciones de semillas obtenidas de plantas autofecundadas en dos generaciones adicionales. Se eligió una línea candidata en la que la suma de ácido linoleico y ácido linolénico fue menor de 14% de los ácidos grasos totales y en la que el contenido en ácido esteárico fue mayor de 16% de los ácidos grasos totales.

Ejemplo 5

Material genético utilizado para producir el rasgo alto contenido en ácido oleico (versión 1)

Se prepararon semillas de soja con alto contenido en ácido oleico por manipulación recombinante de la actividad de la oleoil-12-desaturasa.

Se colocó el gen GmFAD2-1 bajo el control de un promotor fuerte, específico de semillas derivado de la α' -subunidad del gen de β -conglucina de semilla de soja (*Glycine max*). Este promotor permite un alto nivel de expresión, específico de semillas del gen del rasgo. Dicho gen abarca 606 pb aguas arriba del codón de iniciación de la subunidad α' de la proteína de almacenamiento β -conglucina de *Glycine max*. La secuencia del promotor de β -conglucina representa un alelo del gen de la β -conglucina publicado (Doyle et al., (1986) *J. Biol. Chem.* 261:9228-9238) que tiene diferencias en 27 posiciones de nucleótidos. Se ha demostrado que mantiene patrones de expresión específicos de semillas en plantas transgénicas (Barker et al., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:458-462 y Beachy et al., (1985) *EMBO J.* 4:3047-3053). El marco de lectura se terminó con un fragmento 3' del gen de faseolina de judía verde (*Phaseolus vulgaris*). Este es un tramo de 1174 pb de las secuencias en 3' del codón de parada del gen de faseolina de *Phaseolus vulgaris* (originado a partir del clon descrito por Doyle et al., 1986).

El marco de lectura abierto (ORF) del gen GmFAD2-1 estaba en una orientación sentido con respecto al promotor de modo que produce un silenciamiento génico del cDNA del gen GmFAD2-1 sentido y del gen del GmFAD2-1 endógeno. Este fenómeno, conocido como "supresión sentido" es un método eficaz para desconectar deliberadamente genes en plantas y está descrito en la patente de EE.UU. N° 5.034.323.

Para el mantenimiento y la replicación del plásmido en *E. coli* la unidad transcripcional GmFAD2-1 descrita anteriormente se clonó en el plásmido pGEM-9Z(-) (Promega Biotech, Madison WI, USA).

Para la identificación de plantas de soja transformadas se utilizó el gen de β -glucuronidasa (GUS) de *E. coli*. El casete utilizado consistió en tres módulos; el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, el gen de la β -glucuronidasa (GUS) de *E. coli* y un fragmento de DNA de 0,77 kb que contiene el terminador del gen de la nopalina-sintasa (NOS) del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. El promotor 35S es una región promotora de 1,4 kb de CaMV para la expresión génica constitutiva en la mayoría de los tejidos vegetales (Odell et al., (1985) *Nature* 303:810-812), el gen GUS es un fragmento de 1,85 kb que codifica la enzima β -glucuronidasa (Jefferson et al., (1986) *PNAS USA* 83:8447-8451) y el terminador NOS es una porción del extremo 3' de la región codificadora de nopalina-sintasa (Fraley et al., (1983) *PNAS USA* 80:4803-4807). El casete de GUS se clonó en la construcción GmFAD2-1/pGEM-9Z(-) y se denominó pBS43.

El plásmido pBS43 fue transformado en meristemos de la línea de soja de élite A2396, por el método de bombardeo de partículas como se describe en el Ejemplo 1. Se regeneraron plantas fértiles usando métodos bien conocidos en la técnica.

- 5 De la población inicial de plantas transformadas, se seleccionó una planta que estuviera expresando actividad de GUS y que también fuera positiva para el gen de GmFAD2-1 (Episodio 260-05) cuando se evaluaba por PCR. Se tomaron virutas pequeñas de un número de semillas R1 de la planta 260-05 y se cribaron para obtener la composición de ácidos grasos. A continuación, la semilla en virutas se sembró y germinó. El DNA genómico se extrajo de las hojas de las plantas resultantes y se cortó con la enzima de restricción *Bam* HI. Las transferencias se sondaron con una sonda de faseolina.
- 10 A partir del patrón de hibridación de DNA estaba claro que en el episodio de transformación original la construcción GmFAD2-1 se había llegado a integrar en dos *locus* diferentes en el genoma de la semilla de soja. En un *locus* (*Locus* A) la construcción GmFAD2-1 estaba causando un silenciamiento del gen de GmFAD2-1 endógeno, dando como resultado contenidos de ácido oleico, como se muestra en la Tabla 3. Para comparación, variedades de semilla de soja de élite tienen un contenido en ácido oleico de aproximadamente 20%. En el *locus* A había dos copias de pBS43. En la transferencia de hibridación de DNA esto se observó como dos bandas co-segregantes. En el otro *locus* de integración (*Locus* B) el gen de GmFAD2-1 estaba sobre-expresándose, disminuyendo por tanto el contenido en ácido oleico hasta aproximadamente 4 %.

- 20 Las líneas segregantes de cuarta generación (plantas R4), generadas a partir del transformante original, se dejaron crecer hasta la madurez. Las semillas de R4, que contenían sólo el Locus A de silenciamiento (por ejemplo, G94-1) no contenían ningún mRNA de GmFAD2-1 detectable (cuando se midieron por transferencia de Northern) en muestras recuperadas 20 días después de la floración. El mRNA del gen GmFAD2-2, aunque algo reducido en comparación con los controles, no estaba suprimido. Por lo tanto, la construcción sentido de GmFAD2-1 tuvo el efecto deseado de prevenir la expresión del gen de GmFAD2-1 y por lo tanto aumentar el contenido en ácido oleico de la semilla. Todas las plantas homocigóticas para el locus de silenciamiento de GmFAD2-1 tenían un perfil de transferencia de Southern idéntico en un número de generaciones. Esto indica que la inserción era estable y en la misma posición en el genoma durante al menos cuatro generaciones.

Ejemplo 6

Análisis de ácidos grasos con el rasgo alto contenido en ácido oleico (versión 1)

- 30 Un resumen de los contenidos de ácido oleico encontrados en las diferentes generaciones de plantas y semillas de soja recombinantes se presenta en la Tabla 7. Se determinó la composición de ácidos grasos como se describe en el Ejemplo 2

Tabla 3

Identificación de la planta	Generación plantada ^a	Semilla analizada ^a	Ácido oleico en masa (%)
G253	R0:1	R1:2	84.1%
G276	R0:1	R1:2	84.2%
G296	R0:1	R1:2	84.1%
G313	R0:1	R1:2	83.8%
G328	R0:1	R1:2	84.0%
G168-187	R1:2	R2:3	84.4%
G168-171	R1:2	R2:3	85.2%
G168-59-4	R2:3	R3:4	84.0%
G168-72-1	R2:3	R3:4	84.1%
G168-72-2	R2:3	R3:4	84.5%
G168-72-3	R2:3	R3:4	84.3%
G168-72-4	R2:3	R3:4	83.3%

^aR0:1 indica la semilla y la planta cultivada a partir de la semilla después de la autofecundación de la primera generación transformante. R1:2 indica la semilla y la planta cultivada a partir de la semilla después de la autofecundación de la segunda generación transformante. R2:3 indica la semilla y la planta cultivada a partir de la semilla después de la autofecundación de la tercera generación transformante. R3:4 indica la semilla y la planta cultivada a partir de la semilla después de la autofecundación de la cuarta generación transformante.

Ejemplo 7

Material genético utilizado para producir el rasgo alto contenido en ácido oleico (versión 2).

Se produjo un episodio de semilla soja (*Glycine max*) por co-bombardero de partículas como se ha descrito en el Ejemplo 1 con los fragmentos PHP19340A (Figura 4; SEQ ID NO: 23) y PHP17752A (Figura 5; SEQ ID NO: 24). Estos fragmentos se obtuvieron por digestión con *Asc I* de un plásmido fuente. El fragmento PHP19340A se obtuvo a partir del plásmido PHP19340 (Figura 6; SEQ ID NO: 25) y el fragmento PHP17752A se obtuvo a partir del plásmido PHP17752 (Figura 7; SEQ ID NO: 26). El fragmento PHP19340A contiene un casete con un fragmento de 597 pb del gen de omega-6-desaturasa 1 microsómica de semilla de soja (*Gm-fad2-1*) (Heppard et al., 1996, *Plant Physiol.* 110:311-319).

La presencia del fragmento *Gm-fad2-1* en el casete de expresión actúa para suprimir la expresión de las omega-6-desaturasas endógenas, dando como resultado un aumento del nivel de ácido oleico y una disminución de los niveles de ácidos palmítico, linoleico y linolénico. Aguas arriba del fragmento *Gm-fad2-1* está la región promotora del gen inhibidor de tripsina de Kunitz 3 (KTI3) (Jofuku and Goldberg, 1989, *Plant Cell* 1:1079-1093; Jofuku et al., 1989, *Plant Cell* 1: 427-435) que regula la expresión del transcrito. El promotor KTI3 es altamente activo en embriones de soja y 1000 veces menos activo en tejido de las hojas (Jofuku and Goldberg, 1989, *Plant Cell* 1:1079-1093). La región no traducida en 3' del gen KTI3 (terminador KTI3) (Jofuku and Goldberg, 1989, *Plant Cell* 1:1079-1093) termina la expresión de este casete.

El fragmento PHP17752A contiene un casete con una versión modificada del gen de la acetolactato-sintasa (*gm-hra*) de semilla de soja, que codifica la proteína GM-HRA con dos residuos de aminoácidos modificados de la enzima endógena y cinco aminoácidos adicionales en la región N-terminal de la proteína derivada de la traducción de la región no traducida en 5' del gen de la acetolactato-sintasa de semilla de soja (Falco and Li, 2003, solicitud de patente de EE.UU.: 2003/0226166). El gen de *gm-hra* codifica una forma de acetolactato-sintasa, que es tolerante a la clase de herbicidas de sulfonilureas. La proteína GM-HRA se compone de 656 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 71 kDa.

La expresión del gen *gm-hra* es controlada por la región promotora en 5' del gen de la S-adenosil-L-metionina-sintetasa (SAMS) de semilla de soja (Falco and Li, 2003, solicitud de patente de EE.UU. 2003/0226166). Esta región en 5' consiste en un promotor constitutivo y un intrón que interrumpe la región no traducida en 5' de SAMS (Falco and Li, 2003). El terminador para el gen *gm-hra* es el terminador endógeno de la acetolactato-sintasa de semilla de soja (terminador ALS) (Falco and Li, 2003, solicitud de patente de EE.UU.: 2003/0226166).

Ejemplo 8

Transformación y selección para el episodio de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico (versión 2).

Para la transformación de tejido de semillas de soja, una porción lineal de DNA, que contiene la secuencia del gen *gm-fad2-1* y los componentes reguladores necesarios para su expresión, se escindió a partir del plásmido PHP19340 por el uso de la enzima de restricción *Asc I* y se purificó usando electroforesis en gel de agarosa. Una porción lineal de DNA, que contenía las secuencias del gene *gm-hra* y los componentes reguladores necesarios para su expresión, se escindió del plásmido PHP17752 por el uso de la enzima de restricción *Asc I* y se purificó usando electroforesis en gel de agarosa. La porción lineal de DNA que contenía el gen *gm-fad2-1* se designa inserto PHP19340A y tiene un tamaño de 2924 pb. La porción lineal de DNA que contiene el gen *gm-hra* se designa inserto PHP17752A y tiene un tamaño de 4511 pb. El único DNA introducido en el episodio de transformación DP-305423-1 fue el DNA de los insertos descritos anteriormente.

Las plantas transgénicas del episodio DP-305423-1 se obtuvieron por bombardeo con microproyectiles como se describe en el Ejemplo 1. Se tomaron muestras de tejido embrionario para análisis molecular que confirmara la presencia de los transgenes *gm-fad2-1* y *gm-hra* por análisis de Southern. Las plantas se regeneraron a partir de tejido derivado de cada episodio único y se transfirieron a un invernadero para la producción de semillas.

Ejemplo 9

Análisis de Southern de plantas que contienen la versión 2 del episodio con alto contenido en ácido oleico.

Materiales y métodos: Se extrajo DNA genómico de tejido de hoja de soja congelado de plantas individuales de las generaciones T4 y T5 de DP-305423-1 y de control (variedad: Jack) utilizando un método estándar del tampón de extracción con urea. El DNA genómico se cuantificó en un espectrofluorímetro usando el reactivo Pico Green® (Molecular Probes, Invitrogen). Aproximadamente 4 µg de DNA por muestra se digirió con *Hind III* o *Nco I*. Para las muestras de control positivas, se añadieron antes de la digestión aproximadamente 3 pg (2 equivalentes de copia genómica) del plásmido PHP19340 o PHP17752 al DNA genómico de soja de control. Las muestras de control negativas consistieron en DNA genómico de soja no modificada (variedad: Jack). Los fragmentos de DNA se separaron por tamaños usando electroforesis en gel de agarosa.

Después de la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de DNA separados se despurinizaron, desnaturalizaron, neutralizaron *in situ*, y transfirieron a una membrana de nylon en un tampón 20 x SSC utilizando el método descrito para el sistema de transferencia descendente rápida Turboblotter™ (Schleicher & Schuell). Después de la transferencia a la membrana, el DNA se unió a la membrana por reticulación por UV.

- 5 Las sondas de DNA para *gm-fad2-1* y *gm-hra* se marcaron con digoxigenina (DIG) por PCR usando el kit de síntesis de zonas PCR DIG (Roche).

Las sondas marcadas se hibridaron al DNA diana en las membranas de nylon para la detección de los fragmentos específicos utilizando solución *DIG Easy Hyb* (Roche) esencialmente como describe el fabricante. Los lavados pos-hibridación se llevaron a cabo a alta rigurosidad. Las sondas marcadas con DIG hibridadas a los fragmentos unidos se detectaron usando el sistema quimioluminiscente de detección de ácidos nucleicos *CDP-Star* (Roche). Las transferencias se expusieron a una película de rayos X a temperatura ambiente durante uno o más momentos para detectar los fragmentos hibridantes. Se determinó la composición de ácidos grasos del episodio, tal como se describe en el Ejemplo 2. Los niveles de ácido oleico determinados en 29 episodios diferentes (generación T1) variaron entre 61,5 - 84,6%. El nivel de ácido oleico de un episodio (generación T4-T5) varió entre 72 - 82%.

15 Ejemplo 10

Preparación de aislados a pequeña escala de proteínas de soja

La preparación de aislados de proteínas de soja se realizó como se describe a continuación.

a) Producción de copos amarillos:

Se preparan copos de soja con toda la grasa de la siguiente manera. Un volumen de semillas de soja se coloca en un recipiente cerrado, con una pequeña cantidad de agua para evitar el secado de las semillas durante el posterior calentamiento en horno de microondas. Las semillas de soja se calientan en un horno de microondas hasta que la temperatura alcanza 65,5°C (150°F) y después se mantienen durante 1 minuto. Las semillas se enfrían rápidamente hasta la temperatura ambiente en un refrigerador de lecho fluido durante aproximadamente 1 minuto. Las semillas de soja se alimentan luego a través de un dispositivo agrietador para producir grietas de ½ y ¼. Las cáscaras se retiran con un aspirador y las "carnes" resultantes se transportan para producir copos. Las carnes se colocan en un recipiente sellado con una pequeña cantidad de agua y se calientan en un horno de microondas hasta que la temperatura alcanza 65,5°C (150°F) y después se mantienen durante 1 minuto. Las carnes calientes se alimentan luego a un dispositivo de formación de copos para producir copos de soja que luego se enfrían rápidamente hasta la temperatura ambiente en un refrigerador de lecho fluido durante aproximadamente 1 minuto. Se producen copos con un alto índice de dispersabilidad de proteínas (abreviadamente en lo sucesivo PDI por la expresión inglesa *Protein Dispersability Index*) con carácter suficiente para la eliminación del aceite por extracción con disolventes. Se producen copos con un PDI inferior aumentando la cantidad de agua, la temperatura y el tiempo de exposición durante la producción.

b) Producción de copos blancos:

Se pueden producir copos blancos poniendo en contacto copos amarillos con hexano para retirar el aceite. Además de con hexano, la copos se extraen únicamente, o en combinación con otros sistemas disolventes, que tengan algún grado de solubilidad en aceite, tal como etanol, mezclas de etanol y agua, mezclas de hexano y etanol, mezclas supercríticas CO₂, etanol y agua etc. Los copos amarillos se cargan en un extractor por lotes o en modo semicontinuo en una relación disolvente:copos, temperatura y tiempo de extracción, suficientes para retirar el aceite. En un extractor por lotes, se añade hexano calentado hasta 60°C en una relación disolvente:copos 3:1 y se hace circular a través de un lecho de copos durante 45 minutos. La mezcla disolvente utilizada se retira y se repite el procedimiento de extracción con disolventes descrito anteriormente. A las copos se les da un aclarado final 1:1 con disolvente de nueva aportación. El extractor semicontinuo utiliza aproximadamente la misma relación disolvente:copos, pero el disolvente de nueva aportación se regenera continuamente por utilización de un filtro sólido/líquido en el recipiente seguido por la vaporización del disolvente de los aceites y reciclaje del condensado de nuevo al extractor. Este extractor semicontinuo se utiliza para generar cualquier número de reciclajes de disolvente. En cualquiera de los aparatos, los copos blancos cargados de hexano resultantes se dejan secar al aire en una campana de humos durante una noche. Si se desea, un tratamiento comercial con vapor de agua durante la retirada del disolvente se simula añadiendo agua a las copos (típicamente 5-10% basado en copos secos), y colocando las copos humedecidos en un recipiente sellado y calentando durante 6 minutos a 100°C en un horno de microondas. Las copos calientes se colocan luego en un horno a vacío y se enfrían rápidamente hasta aproximadamente 50°C para producir copos con alto valor del PDI. Aumentando la cantidad de agua, el tiempo o la temperatura durante esta etapa se producen copos de bajo valor del PDI. Las copos se muelen hasta obtener una harina fina de un tamaño de partículas adecuado para la extracción eficaz de las proteínas o esta etapa se puede omitir por completo.

55 c) Producción de cuajada húmeda:

Se extrae con agua (puede ser calentada, típicamente a 33°C) una cantidad de harina fina de soja en una relación de agua a harina fina al menos suficiente para obtener una suspensión movable (típicamente 6:1) en un recipiente

capaz de impartir un buen contacto ente el agua y los copos y/o más capacidad de molienda de harina fina (típicamente en un molino coloidal). Si se desea, el pH de extracción se puede aumentar con una base (típicamente $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hasta un pH de aproximadamente de 9,7) o se puede disminuir con un ácido hasta un pH de aproximadamente 2,0. En este momento se pueden añadir, para ayudar a la extracción, agentes antiespumantes en una cantidad suficiente para evitar la formación de espuma (por lo general menos de 1% respecto a los copos) y sulfito (Na_2SO_3 , típicamente menos de 1% respecto a los copos). El extracto se mezcla (típicamente en un molino coloidal) durante aproximadamente 10-15 minutos. La suspensión se alimenta a una centrífuga (ya sea en forma de lotes o semi-continua) a un número de revoluciones por minuto y un tiempo suficiente para separar los sólidos (típicamente por encima de log 4,0 Gs a 33°C). El líquido se decanta y los sólidos se vuelven a extraer en una relación de agua a sólidos al menos suficiente para obtener una suspensión movable (típicamente 4 a 1). La suspensión (típicamente a 33°C) se mezcla (típicamente en un molino coloidal) y se separa en una centrífuga, tal como se describe anteriormente. Si se desea, en este momento el pH del segundo extracto también se puede aumentar o disminuir. Después de la centrifugación, el líquido se decanta y los copos agotados se desechan. El primer y segundo extractos líquidos se combinan y se transportan. Si se desea, se pueden hacer extracciones adicionales. Para precipitar las proteínas, el pH se ajusta a un valor suficiente para separar las proteínas de interés (típicamente a 4,5) con un ácido (típicamente HCl 1M) y se introducen en una centrífuga semi-continua o de lotes en las condiciones descritas anteriormente. El líquido se decanta y se desecha y los sólidos se vuelven a poner en suspensión con agua de nueva aportación (típicamente en un homogeneizador). Si se desea, se puede calentar el agua de la nueva suspensión (la temperatura típica del agua de lavado es aproximadamente 50-60°C). Si se desea, se puede repetir el lavado descrito anteriormente.

d) Producción de proteínas de soja aisladas:

La cuajada húmeda se vuelve a poner en suspensión hasta un contenido de sólidos adecuado para pasteurización de la suspensión de proteínas. Típicamente, el contenido de sólidos será de aproximadamente 10-20%. La suspensión se mezcla (típicamente en un molino coloidal u homogeneizador) y se ajusta el pH con una base (típicamente NaOH) hasta aproximadamente 6,8-7,2. La suspensión se pasteuriza continuamente con inyección de vapor de agua a una temperatura y un tiempo suficiente para reducir los recuentos microbianos y la actividad del inhibidor de tripsina a niveles seguros para la ingestión humana. Las condiciones típicas pueden ser aproximadamente 120-160°C durante 4-60 segundos. La suspensión pasteurizada se enfría (típicamente se enfría bruscamente hasta 50-60°C por uso de un vacío de 100-150 mm). La suspensión se alimenta a un secador por pulverización en las condiciones necesarias para lograr un producto seco de menos de aproximadamente 5% de humedad. Las condiciones típicas incluyen una temperatura de entrada de aproximadamente 250-300°C y una temperatura de salida de aproximadamente 90-100°C.

Las condiciones establecidas en estos ejemplos comprenden los parámetros de proceso que se utilizan para producir los aislados de proteínas de tipo SUPRO® 760, SUPRO® 670 y SUPRO® 500E en la plataforma de producción a pequeña escala.

Ejemplo 11

Producción a gran escala de copos desgrasados

El material de copos de soja se puede formar a partir de semillas de soja de acuerdo con el siguiente procedimiento. Las semillas de sojas se desproveen de materiales extraños haciendo pasar dichas semillas de soja a través de un separador magnético para eliminar hierro, acero y otros objetos magnéticamente susceptibles, seguido por agitación de las semillas de soja en tamices de mallas cada vez más pequeñas para eliminar los residuos del suelo, vainas, tallos, semillas de malas hierbas, semillas de tamaño inferior y otra basura. Las semillas de soja desprovistas de materiales extraños se fragmentan luego haciendo pasar las semillas de soja a través de rodillos de fragmentación. Los rodillos de fragmentación son cilindros ondulados de corte en espiral que separan las cáscaras a medida que las semillas de soja pasan a través de los rodillos y fragmentan el material de semillas de soja en varios trozos. Preferiblemente, las semillas de soja fragmentadas están acondicionadas de 10% a 11% de humedad de 63 a 74°C para mejorar la retención de la calidad de almacenamiento del material de semillas de soja. Las semillas de soja fragmentadas se descascarillan luego, preferiblemente por aspiración. Los hipocótilos de soja, que son mucho más pequeños que los cotiledones de las semillas de soja, pueden ser retirados por agitación de las semillas de soja descascarilladas en un tamiz de tamaño de malla suficientemente pequeño para eliminar los hipocótilos y retener los cotiledones de las semillas. Los hipocótilos no necesitan ser retirados puesto que comprenden sólo aproximadamente 2%, en peso de las semillas de soja, mientras que los cotiledones comprenden aproximadamente 90% en peso de las semillas de soja, sin embargo, se prefiere retirar los hipocótilos puesto que están asociados con el sabor a habas de las semillas de soja. Las semillas de soja descascarilladas, con o sin hipocótilos, se transforman luego en copos haciendo pasar dichas semillas de soja a través de rodillos de formación de copos. Los rodillos de formación de copos son rodillos cilíndricos lisos posicionados para formar copos de semillas de soja a medida que las semillas pasan a través de los rodillos que tienen un distancia entre rodillos de aproximadamente 254 micrómetros (0,01 pulgadas) hasta aproximadamente 381 micrómetros (0,015 pulgadas).

Luego se desgrasan los copos. Los copos se desgrasan extrayéndolos con un disolvente adecuado para eliminar el aceite de los copos. Preferiblemente, los copos se extraen con n-hexano o n-heptano en una extracción en

contracorriente. Los copos desgrasados deben contener menos de 1,5% de grasa o contenido de aceite, y preferiblemente menos de 0,75%. A los copos desgrasados extraídos con disolventes se les eliminan los cualquier disolvente residual usando métodos convencionales de eliminación de disolventes, incluyendo eliminación de disolventes en un separador instantáneo de disolvente-desodorizador, un separador de disolvente por vapor de agua-desodorizado a vacío o eliminación de disolventes por aspiración (succión) en corriente descendente.

Preferiblemente, los copos desgrasados se trituran para formar una harina fina de soja o una sémola de soja para mejorar el rendimiento de extracción de proteínas de los copos. Los copos se trituran moliéndolos hasta el tamaño de partícula deseado utilizando equipos de molienda y trituración convencionales, tal como un molino de martillos o un molino de chorro de aire. La harina fina de soja tiene un tamaño de partículas en el que al menos 97% en peso, de la harina fina de soja tiene un tamaño de partícula de 150 micrómetros o menos (es capaz de pasar a través de un tamiz de malla estándar N° 100 de EE.UU.). La sémola de soja triturada más gruesa que la harina fina de soja, tiene un tamaño de partícula mayor que harina fina de soja, pero menor que los copos de soja. Preferiblemente, la sémola de soja tiene un tamaño de partículas de 150 micrómetros a aproximadamente 1000 micrómetros (es capaz de pasar a través de una tamiz de malla estándar N° 10 - N° 80 de EE.UU.).

Ejemplo 12

Preparación a gran escala de aislados de proteínas de soja

Para producir el material de cuajada de proteínas de soja, la harina fina de soja desgrasada de alto contenido en ácido oleico (abreviadamente HO por la expresión inglesa *High Oleic*) se extrae con agua o una solución acuosa que tenga un pH de 6,5 a 10 para extraer las proteínas de la harina fina de los materiales insolubles, tal como fibra. La harina fina de soja se extrae preferiblemente con una solución acuosa de hidróxido de sodio que tiene un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 10, aunque también son eficaces otros agentes de extracción alcalinos acuosos, tal como hidróxido de amonio. Preferiblemente la relación en peso entre el agente de extracción y el material de harina fina de soja es desde aproximadamente 8:1 a aproximadamente 16:1.

Después de la extracción, el extracto se separa de los materiales insolubles. Preferiblemente, la separación se efectúa por filtración o por centrifugación y separación del extracto de los materiales insolubles. El pH del extracto separado se ajusta entonces hasta aproximadamente el punto isoeléctrico de las proteínas de soja para precipitar una cuajada de proteínas de soja de modo que las proteínas de soja se puedan separar de los productos de soja solubles incluyendo oligosacáridos inductores de flatulencia y otros carbohidratos solubles en agua. El pH del extracto separado se ajusta con un ácido adecuado hasta el punto isoeléctrico de las proteínas de soja, preferiblemente hasta un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 5, más preferiblemente desde aproximadamente 4,4 hasta aproximadamente 4,6. Los ácidos comestibles adecuados para ajustar el pH del extracto a aproximadamente el punto isoeléctrico de las proteínas de soja incluyen ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido acético. El material proteínico se precipita preferiblemente con ácido clorhídrico o ácido fosfórico. El material proteínico precipitado (cuajada) se separa del extracto (suero), preferiblemente por centrifugación o filtración para producir el material de cuajada de proteínas de soja. El material de cuajada de proteínas de soja separado se lava preferentemente con agua para eliminar productos solubles residuales, preferiblemente en una relación en peso de agua a material de proteínas de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1. Las condiciones establecidas en los Ejemplos 11 y 12 describen esencialmente los parámetros del procedimiento que se utilizan para producir aislador de proteínas de los tipos SUPRO® 760, SUPRO® 1610, SUPRO® 651, SUPRO® 500E y SUPRO® 670 en la plataforma de producción a gran escala. Una descripción detallada de la producción de SUPRO® 760 se describe en los Ejemplos 13 y 14.

La producción de SUPRO® 670 incluye una etapa de hidrólisis que no se aplicó en la producción de los otros aislados y se describe en los Ejemplos 16-18.

Ejemplo 13

Procedimiento para producir proteínas de tipo Solae SUPRO® 760 a partir de harinas finas de alto contenido en ácido oleico (HO) desgrasadas

Para producir el material de proteínas de tipo SUPRO® 760, el material de cuajada de proteínas de soja producido como se describe en el Ejemplo 12 se neutraliza primeramente a un pH de 6,8 a 7,2 con una solución alcalina acuosa o una solución alcalino-térrica acuosa, preferiblemente una solución de hidróxido de sodio o una solución de hidróxido de potasio. A continuación se calienta el material de cuajada de proteínas de soja neutralizado. Preferiblemente, la cuajada de soja neutralizada se calienta a una temperatura de aproximadamente 75°C a aproximadamente 160°C durante un periodo de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 2 horas, donde la cuajada se calienta durante un periodo de tiempo más largo a temperaturas más bajas y un periodo de tiempo más corto a temperaturas más altas. Más preferiblemente, el material de cuajada de proteínas de soja se trata a una temperatura elevada y bajo una presión positiva mayor que la presión atmosférica.

El método preferido de calentar el material de cuajada de proteínas de soja es tratar la cuajada de soja a una temperatura elevada por encima de la temperatura ambiente inyectando vapor de agua a presión en la cuajada, en lo sucesivo denominado "cocción con chorro de vapor de agua". La siguiente descripción es un método preferido de

cocción con chorro de vapor de agua del material de cuajada de proteína de soja, sin embargo, la invención no se limita al método descrito e incluye cualesquiera modificaciones obvias que pueda realizar un experto en la técnica.

El material de cuajada de proteínas de soja se introduce en un depósito de alimentación al dispositivo de cocción con chorro de vapor de agua donde la cuajada de soja se mantiene en suspensión con un mezclador que agita la cuajada de soja. La cuajada se dirige desde el depósito de alimentación hasta una bomba que impulsa la cuajada a través de un reactor tubular. El vapor de agua se inyecta en la cuajada bajo presión a medida que la cuajada entra en el reactor tubular, calentando instantáneamente la cuajada a la temperatura deseada. La temperatura se controla ajustando la presión del vapor de agua inyectado, y preferiblemente es desde aproximadamente 75°C hasta aproximadamente 160°C, más preferiblemente desde aproximadamente 100°C hasta aproximadamente 155°C. La cuajada se trata a la temperatura elevada durante el tiempo de tratamiento que se controla por el caudal de la suspensión a través del reactor tubular. Preferiblemente, el caudal es aproximadamente 8,39 kg/minuto (18,5 libras/minuto), y el tiempo de cocción es aproximadamente 9 segundos a aproximadamente 150°C.

Para producir el material proteínico de la presente invención la cuajada neutralizada y calentada se enfría a continuación y se seca. La cuajada puede ser enfriada y secada de cualquier manera convencional conocida en la técnica. En una realización preferida de la presente invención, la cuajada se enfría por vaporización brusca. La cuajada calentada se vaporiza bruscamente por introducción de la cuajada caliente en una cámara de vacío que tiene una temperatura interna de 20°C a 85°C, en la cual la presión de la cuajada cae instantáneamente hasta una presión desde aproximadamente 25 mm hasta aproximadamente 100 mm de Hg, y más preferiblemente a una presión desde aproximadamente 25 mm de Hg hasta aproximadamente 30 mm de Hg. Más preferiblemente, la cuajada caliente se descarga del reactor tubular de la cocción con chorro de vapor de agua en la cámara de vacío, dando como resultado una gran presión instantánea y una caída de temperatura que vaporiza una parte sustancial del agua de la cuajada, enfriando instantáneamente la cuajada hasta cierta temperatura. Preferiblemente, la cámara de vacío tiene una temperatura elevada de hasta aproximadamente 85°C para evitar la gelificación del material de cuajada de proteínas de soja después de la introducción de la cuajada en la cámara de vacío. El tratamiento térmico bajo presión seguido de la rápida caída de presión y vaporización del agua también causa la vaporización de cantidades sustanciales de los componentes volátiles del material de soja, mejorando por tanto el sabor del material de soja.

El material proteínico vaporizado bruscamente se puede secar a continuación, preferiblemente por secado por pulverización. Preferiblemente, el secador por pulverización es un secador de flujo de corrientes del mismo sentido donde aire de entrada caliente y el material proteínico estructural, atomizado al ser inyectado en el secador bajo presión por un atomizador, pasan a través del secador en un flujo de corrientes del mismo sentido.

En una realización preferida, el material proteínico se inyecta en el secador por un atomizador de boquilla. Aunque se prefiere un atomizador de boquilla, se pueden utilizar otros atomizadores de pulverización en seco, tal como un atomizador rotatorio. La cuajada se inyecta en el secador bajo suficiente presión para atomizar la suspensión. Preferiblemente, la suspensión se atomiza a una presión manométrica de alrededor de 20,68 MPa (3000 psig) a aproximadamente 37,92 MPa (5500 psig), y más preferiblemente de aproximadamente 24,13 a 34,47 MPa (3500 a 5000 psig). El aire caliente se inyecta en el secador a través de una entrada de aire caliente situada de modo que el aire caliente que entra en el secador fluya en el mismo sentido que la cuajada de soja atomizada pulverizada desde el atomizador. El aire caliente tiene una temperatura de aproximadamente 285°C a aproximadamente 315°C, y preferiblemente tiene una temperatura de aproximadamente 290°C a aproximadamente 300°C.

El material de proteínas de soja seca se recoge del secador por pulverización. Se pueden usar medios y métodos convencionales para recoger el material de soja, incluyendo ciclones, filtros de bolsa, precipitadores electrostáticos, y recogida por gravedad.

Ejemplo 14

Producción de aislado de proteínas de soja con alto contenido en ácido oleico del tipo SUPRO® 760

El aislado de proteínas de soja con alto contenido en ácido oleico del tipo SUPRO® 760 se produjo a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico de acuerdo con el siguiente procedimiento. 45,36 kg (100 libras) de copos de soja desgrasada con alto contenido en ácido oleico se colocaron en un depósito de extracción y se extrajeron con 453,6 kg (1000 libras) de agua calentada hasta 32°C. Esto proporcionó una relación en peso de agua a copos de 10:1. Los copos se separaron del extracto y se volvieron a extraer con 272,16 kg (600 libras) de agua calentada hasta 32°C a la que se había añadido suficiente hidróxido de calcio para ajustar el pH a 9,7. Esta segunda etapa de extracción proporcionó una relación en peso de agua a copos de 6:1. Las copos se separaron por centrifugación, y se reunieron el primer y segundo extractos y se ajustó la mezcla a un pH de 4,5 con ácido clorhídrico para precipitar una cuajada de proteína. La cuajada precipitada con ácido se separó del extracto por centrifugación, dejando un suero acuoso (desechado), y luego se lavó con agua en una cantidad en peso siete veces mayor que la del material de copos de partida para proporcionar un aislado de proteínas isoelectrónico.

Para producir el material proteínico con alto contenido en ácido oleico del tipo SUPRO® 760, se añadió agua al material de proteínas de soja isoelectrónico y se ajustó el pH entre 6,9 y 7,3 con una solución acuosa de hidróxido de

sodio para producir una suspensión de proteínas de soja neutralizada y luego se calentó por inyección de vapor de agua a presión en la suspensión, en lo sucesivo denominada "cocción con chorro de vapor de agua". La suspensión de proteínas de soja neutra se introdujo en un depósito de alimentación al dispositivo de cocción con chorro de vapor de agua en donde se mantuvo en suspensión con un mezclador que agitaba la suspensión. La suspensión se dirigió desde el depósito de alimentación hasta una bomba que impulsó la suspensión a través de un reactor tubular. El vapor de agua se inyectó en la suspensión bajo presión a medida que la suspensión entraba en el reactor tubular, calentando instantáneamente la suspensión hasta la temperatura deseada. La temperatura se controló ajustando la presión del vapor de agua inyectado. El tratamiento térmico fue aproximadamente 9 segundos a aproximadamente 150°C. Después, la suspensión neutra calentada se enfrió por vaporización brusca, que vaporizó una parte sustancial del agua de la suspensión de proteínas neutra y caliente, enfriando instantáneamente el material proteínico neutro.

A continuación la suspensión de proteínas neutra enfriada se homogeneizó y transfirió a un secador por pulverización en el que la mayor parte de la humedad se evaporó por adición de calor, obteniéndose el aislado final de proteínas de soja del tipo SUPRO® 760.

Ejemplo 15

Procedimiento de producción de proteínas del tipo Solae SUPRO® 760 a partir de harinas finas desgrasadas con alto contenido en ácido oleico

Para obtener el producto proteínico del tipo SUPRO® 760 de la presente invención, se extrajeron 27,22 kg (60 libras) de harina fina de soja con alto contenido en ácido oleico con 272,16 kg (600 libras) de agua a 32°C en una relación de agua a harina fina 10:1 en un mezclador que agita la harina fina de soja para un buen contacto de agua-copos. En ese momento se añadió un agente antiespumante en una cantidad suficiente para evitar la formación de espuma y 54,48 g de sulfito (Na_2SO_3). El pH de la suspensión era 6,6. La suspensión se mezcló durante 10 minutos. Para separar los sólidos del líquido la suspensión se alimentó a una centrífuga de lotes a un caudal de 5,53 kg/min (12,2 libras/min) con 8,1% de sólidos. El líquido se decantó y los sólidos se devolvieron al recipiente de mezclamiento, y se volvió a extraer con una relación de agua a copos 5:1 a 32°C. El pH de la suspensión se aumentó con NaOH hasta 9,7 y la suspensión se mezcló durante 10 minutos y se separó en una centrífuga de lotes a un caudal de 5,53 kg/min (12,2 libras/min) con 3,9% de sólidos de alimentación. Después de la centrifugación, se decantó el líquido y se desecharon los copos agotados. El primer y segundo extractos líquidos se reunieron y se transportaron. Para precipitar las proteínas, el pH se ajustó hasta 4,5 con HCl y se mantuvo durante 10 minutos. Para separar el suero líquido de la cuajada el material se alimentó a una centrífuga de lotes a un caudal de 11,34 kg/min (25 libras/min) con 6,0% de sólidos y a 55°C. El líquido se decantó y se desechó y los sólidos se volvieron a poner en suspensión con agua de nueva aportación en una relación de agua a copos 7:1 y se pasó por un molino Dispax para asegurar un lavado eficaz. La suspensión molida se alimentó a una centrífuga de lotes a 11,34 kg/min (25 libras/min) a 59°C para separar el líquido de lavado de la cuajada. La cuajada húmeda se volvió a poner en suspensión con agua a una concentración de 11,3% de sólidos adecuada para la pasteurización de la suspensión de proteínas. El pH de la suspensión se aumentó con NaOH hasta 7,1 y la suspensión se homogeneizó a una presión manométrica 3,79 MPa (550 psig). La suspensión se introdujo en un depósito de alimentación de un dispositivo de cocción con chorro de vapor de agua donde la cuajada de soja se mantuvo en suspensión con un mezclador que la agitó. La suspensión de cuajada se dirigió desde el depósito de alimentación hasta una bomba que impulsó la cuajada a través de un reactor tubular de 2,39 mm (0,94 pulgadas) de diámetro y 83,872 cm (33 pulgadas) de largo. El vapor de agua se inyectó en la cuajada bajo presión a medida que la cuajada entraba en el reactor tubular, calentando instantáneamente la cuajada hasta la temperatura deseada. La temperatura se controló ajustando la presión del vapor de agua inyectado y era 149°C. La cuajada se trató a la temperatura elevada durante 9 segundos. A continuación, la cuajada calentada se enfrió y se secó. La cuajada se enfrió por vaporización brusca. La cuajada calentada se vaporizó bruscamente introduciéndola en una cámara de vacío que tenía una temperatura interna de 63°C que descendió instantáneamente la presión hasta 26 mm de Hg. La gran caída instantánea de presión y caída de temperatura vaporizó una parte sustancial del agua de la cuajada, enfriando instantáneamente la cuajada hasta 68°C.

El material proteínico vaporizado bruscamente se secó por pulverización usando un secador de flujo con corriente del mismo sentido, donde el aire caliente de entrada y el material proteínico se atomizó al ser inyectado en el secador bajo presión a través de un atomizador y se pasó a través del secador en un flujo con corriente del mismo sentido.

La suspensión de cuajada se alimentó a un homogeneizador y se homogeneizó a una presión manométrica de 10,34 MPa (1500 psig) a 57°C. La suspensión homogeneizada se inyectó en el secador a través de un atomizador de boquilla a una presión manométrica de atomización de 27,58 MPa (4000 psig). Se inyectó aire caliente en el secador a través de una entrada de aire caliente situada de modo que el aire caliente que entraba en el secador fluía en el mismo sentido de la corriente que la cuajada de soja atomizada pulverizada desde el atomizador. El aire caliente tenía una temperatura de 265°C. La temperatura de salida del secador fue 89°C.

Las proteínas de soja aisladas secas con alto contenido en ácido oleico del tipo SUPRO®760 se recogieron por recolección por gravedad desde la salida del secador por pulverización.

Ejemplo 16

Procedimiento para la producción de proteínas del tipo Solae SUPRO® 670 a partir de harinas finas desgrasadas con alto contenido en ácido oleico que incluye una etapa de hidrólisis enzimática

Se forma el material proteínico del tipo SUPRO® 670 a partir del material de cuajada de proteínas de soja de la misma manera que el material proteínico SUPRO® 670 descrito en el Ejemplo 15, sin embargo, se incluye una etapa de hidrólisis enzimática de proteínas para hidrolizarlas. El material de cuajada de proteínas de soja se diluye primeramente hasta aproximadamente 12-15% de sólidos y se neutraliza hasta pH de 7,5 a 8,1 con una solución alcalina acuosa o una solución alcalino-térrea acuosa, preferiblemente una solución de hidróxido de sodio o una solución de hidróxido de potasio. La cuajada de proteínas de soja neutralizada se calienta y se enfría, preferiblemente por cocción con chorro de vapor de agua y enfriamiento brusco, de la misma manera que se ha descrito anteriormente respecto a la preparación del material proteínico SUPRO® 760. Preferiblemente, la cuajada se enfría después del calentamiento de 55°C a 60°C

Después del enfriamiento brusco, se añade a la solución una enzima (bromelaina) que tiene una actividad de aproximadamente 2400 UT/g en una proporción de aproximadamente 0,02% basado en los sólidos de la cuajada. Se deja que la solución tratada con la enzima reaccione durante aproximadamente 15 minutos a 65 minutos, preferiblemente 20-45 minutos bajo mezclado continuo. La hidrólisis se termina calentando el material de cuajada de proteínas de soja hidrolizadas hasta una temperatura eficaz para inactivar la enzima. Más preferiblemente, el material de cuajada de proteínas de soja hidrolizadas se cuece con chorro de vapor de agua para inactivar la enzima, y se enfría bruscamente y luego se seca como se ha descrito anteriormente con respecto a la producción del material proteínico seco SUPRO® 760. El material hidrolizado seco es el material proteínico seco SUPRO® 670.

Ejemplo 17

Producción del aislado de proteínas de soja con alto contenido en ácido oleico del tipo SUPRO® 670

El aislado de proteínas de soja con alto contenido en ácido oleico del tipo SUPRO® 670 se preparó esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 16, pero con los siguientes detalles experimentales. Se extrajo harina fina de soja con alto contenido en ácido oleico 27,22 kg (60 libras) con 272,2 kg (600 libras) de agua a 41°C en una relación de agua a harina fina 10:1 en un mezclador que agita la harina fina de soja para un buen contacto agua-copos. En este momento se añadió agente antiespumante en una cantidad suficiente para evitar la formación de espuma y 54,48 g de sulfito (Na_2SO_3). El pH de la suspensión era 6,5. La suspensión se mezcló durante 10 minutos. La suspensión se alimentó a una centrifuga de lotes a un caudal de 4,54 kg/min (10,0 libras/min) con 8,2% de sólidos para separar los sólidos del líquido. El líquido se decantó y los sólidos se devolvieron al recipiente de mezclado, y se volvió a extraer en una relación de agua a copos 5:1 a 33°C. El pH de la suspensión se aumentó con NaOH hasta 9,7 y la suspensión se mezcló durante 10 minutos y se separó en una centrifuga de lotes a 5,44 kg/min (12,0 libras/min) con 3,8% de sólidos de alimentación. Después de la centrifugación el líquido se decantó y se desecharon los copos agotados. Los primero y segundo extractos líquidos se reunieron y se transportaron. Para precipitar las proteínas, el pH se ajustó hasta 4,5 con HCl, y se mantuvo durante 10 minutos. El material se alimentó a una centrifuga de lotes a un caudal de 10,89 kg/min (24 libras/min), con 6,0% de sólidos y a 57°C para separar el suero líquido de la cuajada. El líquido se decantó y se desechó y los sólidos se volvieron a poner en suspensión con agua de nueva aportación en una relación de agua a copos 7:1 y se pasó a través de un triturador Dispax para asegurar un lavado eficaz. La suspensión molida se alimentó a una centrifuga de lotes a un caudal de 6,35 kg/min (14 libras/min) a 56°C para separar el líquido de lavado de la cuajada. La cuajada húmeda se volvió a poner en suspensión con agua hasta 11,3% de sólidos adecuado para la pasteurización de la suspensión de proteínas. El pH de la suspensión se aumentó con NaOH a hasta 7,7 y la suspensión se homogeneizó a una presión manométrica de 3,79 MPa (550 psig). La suspensión se introdujo en un depósito de alimentación de un dispositivo de cocción con chorro de vapor de agua donde la cuajada de soja se mantuvo en suspensión con un mezclador que la agitaba. La suspensión de cuajada se dirigió desde el depósito de alimentación hasta una bomba que la impulsó a través de un reactor tubular de 2,39 cm (0,94 pulgadas) de diámetro y 83,82 cm (33 pulgadas) de largo. El vapor de agua se inyectó en la cuajada bajo presión a medida que la cuajada entraba en el reactor tubular, calentándola instantáneamente hasta la temperatura deseada. La temperatura se controló ajustando la presión del vapor de agua inyectado y era 129°C. La cuajada se trató a la temperatura elevada durante 9 segundos. A continuación, la cuajada calentada se enfrió y secó. La cuajada se enfrió por vaporización brusca. La cuajada calentada se vaporizó bruscamente introduciéndola caliente en una cámara de vacío que tenía una temperatura interna de 63°C que hizo descender instantáneamente la presión hasta 23 mm de Hg. La gran caída instantánea de presión y temperatura vaporizó una parte sustancial del agua de la cuajada, enfriándola instantáneamente hasta 70°C.

Después del enfriamiento brusco, se añadió a la solución una enzima (bromelaina), que tenía una actividad de aproximadamente 2400 UT/g, con 0,03% basado en los sólidos de cuajada. La solución tratada con la enzima se dejó reaccionar durante 35 minutos bajo mezclado continuo. La hidrólisis se terminó calentando el material de cuajada de proteínas de soja hidrolizado hasta una temperatura eficaz para inactivar la enzima. El material de cuajada de proteínas de soja hidrolizado se coció con chorro de vapor de agua a 142°C durante 9 segundos para inactivar la enzima, y se enfrió bruscamente. La cuajada calentada se vaporizó bruscamente introduciéndola en una

cámara de vacío que tenía una temperatura interna de 61°C que hizo descender instantáneamente la presión hasta 25 mm de Hg. La gran caída instantánea de presión y de temperatura vaporizó una parte sustancial del agua de la cuajada, enfriándola instantáneamente la cuajada a 61°C.

- 5 El material proteínico vaporizado bruscamente se homogeneizó y se secó por pulverización usando un secador de flujo de corrientes del mismo sentido, donde el aire de entrada caliente y la proteína material fueron atomizados al ser inyectados en el secador bajo presión a través de un atomizador y se pasó a través del secador en un flujo de corriente del mismo sentido.

- 10 La suspensión de cuajada se alimentó a un homogeneizador y se homogeneizó a una presión manométrica de 13,79 MPa (2000 psig) a 54°C. La suspensión homogeneizada se inyectó en el secador a través de un atomizador de boquilla a una presión manométrica de atomización de 27,58 MPa (4000 psig). Se inyectó aire caliente en el secador a través de una entrada de aire caliente situada de modo que el aire caliente que entraba en el secador fluía en el mismo sentido que la cuajada de soja atomizada pulverizada desde el atomizador. El aire caliente tenía una temperatura de 307°C. La temperatura de salida del secador fue 93°C.

- 15 Las proteínas de soja aisladas con alto contenido en ácido oleico hidrolizadas y secadas de tipo SUPRO®670 se recogieron por recolección por gravedad desde la salida del secador por pulverización.

Ejemplo 18

Producción de aislado de proteínas de soja con alto contenido en ácido oleico del tipo SUPRO® 670

- 20 Se produjo aislado de proteínas de soja con alto contenido en ácido oleico del tipo SUPRO® 670 a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se colocaron 45,36 kg (100 libras) de copos de soja desgrasada con alto contenido en ácido oleico en un depósito de extracción y se extrajeron con 453,6 kg (1000 libras) de agua calentada a 32°C. Esto proporcionó una relación en peso de agua a copos de 10:1. Las copos se separaron del extracto y se volvieron a extraer con 272,16 kg (600 libras) de agua calentada a 32°C a los que se había añadido suficiente hidróxido de calcio para ajustar el pH a 9,7. Esta segunda etapa de extracción proporcionó una relación en peso de agua a copos de 6:1. Las copos se separaron por centrifugación, y el primer y segundo extractos se reunieron y se ajustó la mezcla resultante a un pH de 4,5 con ácido clorhídrico para precipitar una cuajada de proteínas. La cuajada precipitada con ácido se separó del extracto por centrifugación, dejando un suero acuoso (desechado), y luego se lavó con agua con una cantidad en peso siete veces mayor que la del material de copos de partida para proporcionar un aislado de proteínas isoelectrónico.

- 30 Para producir el material proteínico con alto contenido en ácido oleico de tipo SUPRO® 670 se añadió agua al material de proteínas de soja isoelectrónico y el pH se ajustó entre 7,3 y 7,7 con una solución acuosa de hidróxido de sodio para producir una suspensión de proteínas de soja neutralizada y luego se calentó por inyección en la suspensión de vapor de agua a presión, en lo sucesivo "cocción con chorro de vapor de agua". La suspensión de proteínas de soja neutra se introdujo en un depósito de alimentación del dispositivo de cocción con chorro de vapor de agua en el que se mantuvo en suspensión con un mezclador que agitaba la suspensión. La suspensión se dirigió desde el depósito de alimentación hasta una bomba que impulsó la suspensión a través de un reactor tubular. El vapor de agua se inyectó en la suspensión bajo presión a medida que la suspensión entraba en el reactor tubular, calentando instantáneamente la suspensión hasta la temperatura deseada. La temperatura se controló ajustando la presión del vapor de agua inyectado. El tratamiento térmico fue aproximadamente 9 segundos a aproximadamente 130°C. Después, la suspensión neutra calentada se enfrió por vaporización brusca, que vaporizó una parte sustancial del agua de la suspensión de proteínas neutra caliente, enfriando instantáneamente el material proteínico neutro hasta aproximadamente 61°C. A la suspensión de proteínas enfriada se añadió la enzima bromelaina, y se dejó reaccionar durante un tiempo suficiente para que la enzima hidrolizara las proteínas hasta un valor de TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzeno-sulfónico) de alrededor de 50. La suspensión tratada con la enzima se trató luego térmicamente por cocción con chorro de vapor de agua para inactivar la enzima bromelaina. La suspensión tratada con la enzima se coció en el dispositivo de cocción con chorro de vapor aproximadamente 9 segundos a aproximadamente 152°C. Después, la suspensión neutra calentada se enfrió por vaporización brusca, que vaporizó una parte sustancial del agua de la suspensión proteínica neutra caliente, enfriando instantáneamente el material proteínico neutro hasta aproximadamente 82°C.

- 50 La suspensión proteínica neutra enfriada se homogeneizó y se transfirió a un secador por pulverización en el que la mayor parte de la humedad se evaporó por adición de calor para obtener el aislado final de proteínas de soja del tipo SUPRO® 670.

Ejemplo 19

Mediciones de resistencia de gel de aislados de proteínas de soja con alto contenido en ácido oleico (Plataforma de producción a pequeña escala)

- 55 Se analizó el efecto de aislados de proteínas con alto contenido en ácido oleico (preparados esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 10) sobre la resistencia de gel de geles refrigerados y pasteurizados en comparación con aislados de semillas de soja comerciales con bajo contenido en ácido linolénico (bajo lin). La composición de ácidos

grasos de semillas de soja con bajo contenido en ácido linolénico usadas en esta invención se ha descrito en la Tabla 2 de la patente de EE.UU. N° 5.981.781 concedida el 9 de noviembre de 1999. Los niveles de ácido oleico en las líneas de bajo contenido en ácido linolénico son similares a los niveles encontrados en semillas de soja comerciales, mientras que los niveles de ácido linolénico son aproximadamente 3 veces menores.

- 5 Se utilizaron muestras con bajos niveles de ácido linolénico para la comparación muestras con alto contenido en ácido oleico, además de aislados de semillas de soja comerciales. Los geles se prepararon mezclando 75 mL de H₂O doblemente destilada (dd) y 15 g de aislado de proteínas en un mezclador Waring con un ajuste de mezclamiento N° 2 durante 30 segundos (hidratación inicial). El mezclador se paró y cualquier proteína seca residual se separó por raspado de la superficie del recipiente de mezclamiento.
- 10 En algunos casos, los geles se prepararon añadiendo 0,84 g de NaCl en este momento y el mezclamiento se reanudó durante un total de 3 minutos con raspado adicional cada 30 segundos. Después de la preparación, los geles se envasaron en viales de vidrio de 5 mL usando un dispensador de minipistola de cartucho desechable. Se tuvo cuidado de eliminar las burbujas de aire residuales. Los viales se sellaron con tabique y tapa fuertemente engarzados. Los viales sellados se colocaron inmediatamente bien en el frigorífico y se conservaron durante 16-24
- 15 horas (gel refrigerado) o bien se incubaron en un baño a 80°C durante 30 minutos, se enfriaron durante 30 minutos en un baño de agua a 25°C antes de la refrigeración durante 16-24 horas (gel pasteurizado). La resistencia de gel se midió ya sea en un analizador de textura (TAXT.2i, Stable Micro Systems, UK) o ya sea en un reómetro AR-1000 (TA Instruments). Cuando la resistencia de gel se midió en el analizador de textura, los geles se retiraron del frigorífico y se calentaron a 25°C. Los viales de muestra destapados se centraron en la plataforma de carga y se usó para la
- 20 medición una sonda con punzón cilíndrico de acero inoxidable de 3 mm de diámetro. Los geles fueron penetrados dos veces en el centro del vial hasta una profundidad de 10 mm y se registraron los datos usando el programa informático del fabricante del instrumento. Se integró y registró el área debajo de la parte positiva de la curva (área marcada). La preparación del gel y las mediciones se repitieron un segundo día y se obtuvieron los valores medios de los datos y se registraron.
- 25 Los resultados se muestran en la Tabla 4. La resistencia media de gel y la desviación típica de los aislados de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico en comparación con los aislados de semillas de soja sin alto contenido de ácido oleico fue 168±45 g*s y 346±59 g*s, respectivamente. La reducción de la resistencia de gel de los aislados de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico en comparación con los aislados sin alto contenido en ácido oleico aislados varió entre 25%-70% (calculado a partir de los valores medios).

30

Tabla 4

Resistencia de gel de aislados con alto contenido en ácido oleico en comparación con aislados de semillas de soja de control			
Identificación de los productos	Rasgo ¹	Tipo de proteína comercial ²	Textura del gel 1:5 con NaCl al 2%. Área past, g*s
PPI002385	Alto contenido en ácido oleico v.1	SUPRO® 500E	127
PPI002391	Producto comercial	SUPRO® 500E	460
PPI002419	Alto contenido en ácido oleico v.1	SUPRO® 500E	140
PPI002581	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	173
PPI002582	Producto comercial	SUPRO® 760	338
PPI002583	Alto contenido en ácido oleico v.1	SUPRO® 760	106
PPI002584	Bajo contenido en ácido linolénico	SUPRO® 760	318
PPI002588	Bajo contenido en ácido linolénico	SUPRO® 760	315
PPI002589	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	248
PPI002590	Producto comercial	Supra® 760	350
PPI002599	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	194

Resistencia de gel de aislados con alto contenido en ácido oleico en comparación con aislados de semillas de soja de control			
PPI002600	Alto contenido en ácido oleico v.2 / Alto contenido en ácido esteárico	SUPRO® 760	146
PPI002601	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	162
PPI002602	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	195
PPI006508	Producto comercial	SUPRO® 760	294

Se prepararon aislados de proteínas de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico, de alto contenido en ácido oleico v.1 (versión 1) y alto contenido en ácido oleico v. 2 (versión 2) como se ha descrito en los Ejemplos 3, 5 y 8. Se utilizaron como controles aislados de semillas de soja comerciales y de bajo contenido en ácido linolénico (véase la Tabla 8) y se denominan para los fines de esta invención líneas "comerciales". Los valores numéricos resultantes para la resistencia de gel se redondean hacia arriba o hacia abajo después de la coma decimal. ²El nombre comercial se refiere a los parámetros de proceso específicos por los que se obtuvieron los aislados.

Ejemplo 20

Determinación del color Hunter de productos (proteínas) de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico (Plataforma de producción a pequeña escala)

- 5 Las mediciones de color se realizaron en suspensiones aisladas de proteínas al 5% (preparadas esencialmente como se ha descrito en Ejemplo 10) en un instrumento Hunter Colorflex 45/0 LAV con un ajuste del instrumento de D65/10. En las mediciones de pequeños volúmenes se usó un anillo personalizado proporcionado por el fabricante para reducir la cantidad de muestra necesaria para el análisis colocada dentro de la copa para muestras. Bien 14 mL (para el anillo de 10 mm) o bien 8 mL (para el anillo de 5 mm) de la suspensión de aislado al 5% se dispuso por una pipeta en el centro del anillo alcanzando un nivel de fluido justo por encima de la parte superior del anillo. La
- 10 copa para muestras se colocó en el instrumento y elevó con el disco negro o blanco cuando lo solicitó el programa informático proporcionado por el fabricante del instrumento. Los datos de valor L y la diferencia de blancos, se calcularon por el programa informático y se registraron. Los valores de las escalas L, a, y b obtenidos para las muestras se describen como color de la muestra. El índice de blancura se calcula a partir de los valores de las escalas L y b utilizando la siguiente fórmula:

$$15 \quad \text{Índice de blancura} = L - 3b$$

- El valor L de color, la diferencia de color de blancos y el índice de blancura de muestras de semillas de soja de alto contenido en ácido oleico, de bajo contenido en ácido linolénico y comerciales se recogen en la Tabla 5. Los valores se midieron en suspensiones de proteínas al 5%. Las muestras con alto contenido en ácido oleico tienen mayores valores de L, una diferencia menor del valor de blancos y mayores índices de blancura. El índice de blancura medio
- 20 y la desviación típica de las muestras de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico fue $45 \pm 4,4$ y el de las muestras de semillas de soja sin alto contenido en ácido oleico fue $37 \pm 4,9$. Se observó un aumento (calculado a partir de los valores medios) del índice de blancura en las muestras de alto contenido en ácido oleico en comparación con las muestras sin alto contenido en ácido oleico.

Tabla 5

Identificación de los productos	Rasgo ¹	Tipo de proteína comercial ²	Valor L	Diferencia de color de blancos	índice de blancura (definido por Solae como L-3b)
PPI002385	Alto contenido en ácido oleico	SUPRO® 500E	74	27	51
PPI002391	Producto comercial	SUPRO® 500E	56	45	28
PPI002419	Alto contenido en ácido oleico	SUPRO® 500E	72	29	47
PPI002581	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	71	30	44

Identificación de los productos	Rasgo ¹	Tipo de proteína comercial ²	Valor L	Diferencia de color de blancos	índice de blancura (definido por Solae como L-3b)
PPI002582	Producto comercial	SUPRO® 760	64	38	33
PPI002583	Alto contenido en ácido oleico v.1	SUPRO® 760	68	34	36
PPI002584	Bajo contenido en ácido linolénico	SUPRO® 760	65	36	38
PPI002588	Bajo contenido en ácido linolénico	SUPRO® 760	65	36	41
PPI002589	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	67	34	42
PPI002590	Producto comercial	SUPRO® S760	65	35	43
PPI002599	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® S760	70	31	45
PPI002600	Alto contenido en ácido oleico v.2 / Alto contenido en ácido esteárico	SUPRO®760	73	29	44
PPI002601	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	73	28	50
PPI002602	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	71	30	45
PPI006492	Producto comercial	SUPRO® 760	62	39	36
PPI006493	Bajo contenido en ácido linolénico	SUPRO® 760	62	39	36
PPI006495	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	70	31	46
PPI006508	Producto comercial	SUPRO® 760	67	34	41

Ejemplo 21

Mediciones de viscosidad de la alimentación al pasteurizador (Plataforma de producción a pequeña escala)

Se recogió una pequeña muestra de alimentación al pasteurizador durante la preparación de aislados de proteínas (preparados esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 10) después del ajuste de la concentración de sólidos y el pH. Para preparar una muestra para mediciones de viscosidad, la muestra se cargó en la plataforma de un reómetro AR-1000 (TA Instruments) con una pipeta desechable y la cabeza se bajó a 1500 mm.

Se limpió la muestra en exceso alrededor del borde de la geometría y la tapa se colocó sobre la geometría en la preparación para la medición. La viscosidad se midió 60 minutos después de la preparación de la alimentación al

pasteurizador usando una geometría de placa plana de 40 mm con un ajuste de la separación de 1000 µm. La viscosidad (medida en centipoises) se registró y analizó usando el programa informático *Rheology Advantage Data Analysis* suministrado por el fabricante del instrumento.

5 Las muestras con alto contenido en ácido oleico tienen una menor viscosidad de la alimentación al pasteurizador en comparación con las muestras de bajo contenido en ácido linolénico o comerciales (Tabla 6)

10 La viscosidad media y la desviación típica de las muestras de semillas de soja de alto contenido en ácido oleico en comparación con aislados de semillas de soja sin alto contenido en ácido oleico fueron $110 \pm 57,8$ cp y 449 ± 125 cp, respectivamente, con un % de reducción (calculado a partir de los valores medios) de la viscosidad que variaba desde alrededor de 9% hasta 52% para las muestras de alto contenido en ácido oleico en comparación con las muestras sin alto contenido en ácido en oleico

Tabla 6

Mediciones de viscosidad de los aislados de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico			
Identificación de producto	Rasgo ¹	Tipo de proteína comercial ²	Viscosidad de la alimentación al pasteurizador - AR1000 - Viscosidad a 30/s
PPI002385	Alto contenido en ácido oleico	SUPRO® 500E	135
PPI002391	Producto comercial	SUPRO® 500E	566
PPI002419	Alto contenido en ácido oleico	SUPRO® 500E	24
PPI002588	Bajo contenido en ácido linolénico	SUPRO® 760	465
PPI002589	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	155
PPI002590	Producto comercial	SUPRO® 760	317
PPI002601	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	79
PPI002602	Alto contenido en ácido oleico v.2	SUPRO® 760	158

Ejemplo 22

Mejora de la eficacia del secado usando semillas de soja con alto contenido en ácido oleico

15 Se alimentaron productos proteínicos con alto contenido en ácido oleico a un pasteurizador o un secador con mayores cantidades de sólidos de alimentación (por encima del 14%) en comparación con los productos comerciales de proteínas de soja (Tabla 7 y Tabla 8 en el Ejemplo 23). Esto se puede explicar por la viscosidad reducida de los productos de proteínas de soja de alto contenido en ácido oleico. Cuando los productos proteínicos se alimentan a un pasteurizador o un secador con mayores cantidades de sólidos de alimentación, tiene que separarse menos agua en cada kilogramo alimentado al secador dando como resultado menores costes energéticos y se pueden secar más

20 sólidos por hora, dando como resultado una mejor utilización del capital, así como mayores cantidades de producción.

Tabla 7

Contenido en sólidos medido de la suspensión alimentada al secador por pulverización para semillas con alto contenido en oleico frente a semillas comerciales			
Copos desgrasados	Tipo comercial	Concentración de la suspensión medida por CEM	Contenido en sólidos de la alimentación al secador medido por CEM
Producto comercial	Tipo SUPRO® 760	13,43	11,99
Producto comercial	Tipo SUPRO® 760	13,28	11,84
Producto comercial	Tipo SUPRO® 670	12,22	9,69
Producto comercial	Tipo SUPRO® 670	12,01	10,38
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 760	13,49	11,77
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 760	14,01	12,28
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 760	16,56	14,62
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 760	17,12	14,89
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 760	19,40	15,54
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 760	18,89	16,09
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 670	13,41	10,27
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 670	13,55	11,38
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 670	17,02	14,18
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 670	17,02	15,31
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 670	18,34	15,19
Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 670	17,51	16,18

Ejemplo 23

Medición de la resistencia de gel de productos de proteínas de soja con alto contenido en ácido oleico

5 Los productos de proteínas de soja con alto contenido en ácido oleico tienen una resistencia de gel comparable a la resistencia de gel de los productos de proteínas de soja comerciales cuando son alimentados con no menos de 14% de sólidos en la alimentación a un secador.

10 La resistencia de gel se midió en el reómetro AR-1000, una muestra del gel se colocó en la plataforma del reómetro utilizando una espátula de metal y el cabezal se bajó a 1500 µm. El exceso de gel se recortó desde el borde de la geometría y la tapa se colocó en la parte superior. Se utilizó una geometría de 40 mm con líneas cruzadas a una separación de 1400 µm para la medición en un modo oscilatorio controlado por el programa informático del instrumento. Se registró el valor G' (elasticidad del gel marcado, expresada en Pascales [Pa]), de 2 duplicados por muestra (Tabla 8).

Tabla 8

Concentración medida de sólidos en la suspensión y % de proteínas en el producto final de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico en comparación con semillas de soja comerciales						
Nº de la muestra	Fuente de copos desgrasados	Tipo de proteínas comerciales	Concentración de la suspensión medida por horno (%)	% de proteínas en el producto por Com. Leco (tal cual) N*6,25	Valores medios de la elasticidad del gel refrigerado	Valores medios de la elasticidad del gel pasteurizado
a2122	Producto comercial	Tipo SUPRO® 500E	13,1	91,67	1129	3204
b2123	Producto comercial	Tipo SUPRO® 500E	13,2	91,88	698	3340
c2121	Producto comercial	Tipo SUPRO® 500E	13,6	91,07	972	2897
d2131	Producto comercial	Tipo SUPRO® 500E	13,7	92,21	700	3075
e2124	Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 500E	12,6	91,98	26	591
f2137	Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 500E	15,8	92,78	68	697
g2136	Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 500E	16,1	92,71	64	649
h2128	Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 500E	19	92	172	1698
i2135	Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 500E	20,5	92,32	288	2243
i2134	Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 500E	20,9	93,24	269	1982
k2133	Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 500E	24,7	91,87	664	2077
l2138	Alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 500E	24,8	91,08	637	1836

Ejemplo 24

Análisis de ácidos grasos residuales por metanólisis ácida

5

Se pesaron muestras por triplicado (aproximadamente 100 mg), con una precisión de 0,1 mg, en tubos con tapón de rosca (revestidos de PTFE) de 13x100 mm. Después de la adición del patrón interno triacilglicerol C17:0 (10 µL, solución madre al 5% en peso:volumen en tolueno), se añadió a cada tubo 1 mL de solución de metanólisis de nueva aportación (ácido sulfúrico al 5% en metanol anhidro). Los tubos se taparon, se mezclaron con vórtice y se calentaron a 80°C durante 30 minutos, con mezclamiento vorticial cada 10 minutos. Las muestras se enfriaron hasta

la temperatura ambiente y se añadió a cada tubo 1 mL de solución salina (cloruro de sodio al 25% en agua), seguido por 1 mL de heptano. Después de mezclamiento vorticial, se separaron las fases por centrifugación (3000 x g durante 10 minutos) y las fases orgánicas superiores, se transfirieron a viales de muestra para CG. El análisis de los ácidos grasos se realizó en un cromatógrafo Agilent 6890 con detector FID. El cromatógrafo de gases (CG) estaba equipado con una columna OmegaWax-320 de 30 m 0.32 mm x 0,25 µm (Supelco, Bellefonte, PA). El gas portador fue hidrógeno (velocidad lineal 28 cm/s) y se usó el siguiente perfil de temperaturas: 220°C durante 2,6 minutos, ascenso desde 10°C hasta 240°C, mantenida durante 1,4 minutos. Se integraron las áreas de los picos de los ácidos grasos individuales, se cuantificaron los ácidos grasos individuales con relación al patrón interno C17 y se estimaron las composiciones de ácidos grasos basándose en estos valores. Se hizo supuso que la respuesta del detector a cada ácido graso era la misma (Morrison et al., (1980) *Methods for the quantitative analysis of lipids in cereal grains and similar tissues. Journal of Science Food and Agriculture* 31:329-340).

Usando la técnica descrita anteriormente, se determinó el perfil de ácidos grasos de los ácidos grasos residuales asociados con harinas finas de copos blancos de soja extraídos con hexano y aislados de proteínas de soja fabricados a partir de ellas para semillas de soja comerciales y dos variedades de semillas de soja genéticamente alteradas, semillas de soja con alto contenido en ácido oleico y semillas de soja con bajo contenido en ácido linolénico. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Aunque se reconoce que en el aceite de semilla de soja están presentes otros ácidos grasos y lípido residual en los productos de soja, sólo están presentes a nivel de trazas (<3% del total). Por motivos de comparación en esta patente hemos restringido nuestro análisis a los ácidos grasos más abundantes, es decir, los ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3).

Los ácidos grasos residuales asociados con la harina de copos blancos desgrasados con hexano y aislados de proteínas de soja están principalmente en forma de fosfolípidos, y por lo tanto proceden de los lípidos de la membrana, mientras que el aceite de soja extraído con hexano se compone principalmente de triglicéridos de almacenamiento. Antes de este trabajo, no se sabía con exactitud como el perfil de ácidos grasos residuales estaba relacionado con el perfil de ácidos grasos de aceite de soja extraído con hexano. A partir de los datos mostrados en la Tabla 9 se puede observar que el nivel de ácido palmítico aumenta en los ácidos grasos residuales presentes en la harina fina de copos blancos de soja y en el aislado de proteínas de soja en comparación con el aceite de soja extraído con hexano en las tres variedades de soja genéticamente diferentes analizadas. En contraste, el nivel de ácido oleico disminuye significativamente en los ácidos grasos residuales en comparación con el aceite de soja extraído con hexano en las semillas de soja comercial y con bajo contenido en ácido linolénico, pero sólo marginalmente en las semillas de soja con alto contenido en ácido oleico. Los ácidos grasos poliinsaturados, linoleico y linolénico, se encuentran en niveles similares en los ácidos grasos residuales y en el aceite de soja extraído con hexano de las tres variedades de semillas de soja genéticamente diferentes.

El contenido residual de ácidos grasos en harina fina de copos blancos de soja y en aislados de proteínas de soja procedente de semillas de soja con bajo contenido en ácido linolénico es inferior en el ácido linolénico oxidativamente inestable que en los productos de proteínas de soja comerciales, lo que indica que los productos de proteína de soja obtenidos a partir de semillas de soja con bajo contenido en ácido linolénico son probablemente menos propensos a generar compuestos de mal sabor. Similarmente, el contenido residual de ácidos grasos en harina fina de copos blancos de soja y aislados de proteínas de soja procedentes de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico es más inferior en ambos ácidos grasos poliinsaturados, linoleico y linolénico, que en los productos de proteínas de soja comerciales, lo que indica que los productos de proteínas de soja obtenidos a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico son menos propensos a generar compuestos de mal sabor.

Tabla 9

Perfiles de ácidos grasos de aceites de soja, de ácidos grasos residuales en harinas finas producidas a partir de copos blancos de soja desgrasados con hexano y de aislados de proteínas de soja						
Identificación de la muestra	% de 16:0	% de 18:0	% de 18:1	% de 18:2	% de 18:3	% total de ácidos poliinsaturados
Aceite de soja comercial ¹	8-13	2-6	18-27	51-59	6-10	57-69
Aceite de soja con alto contenido en ácido oleico	6-7	4-5	79-86	2-4	2-5	4-9
Aceite de soja con bajo contenido en ácido linolénico ⁴	10	5	29	53	3	62

Perfiles de ácidos grasos de aceites de soja, de ácidos grasos residuales en harinas finas producidas a partir de copos blancos de soja desgrasados con hexano y de aislados de proteínas de soja						
Identificación de la muestra	% de 16:0	% de 18:0	% de 18:1	% de 18:2	% de 18:3	% total de ácidos poli-insaturados
Aceite de soja con alto contenido en ácido oleico / alto contenido en ácidos saturados ⁵	12	22	60	3	3	6
Aceite de soja con alto contenido en ácido oleico / alto contenido en ácido esteárico	6	19	62	6	6	12
Ácidos grasos residuales en WFF ² de soja comercial	17-27	5-7	11	49-58	7-9	56-67
Ácidos grasos residuales en WFF ² de soja con alto contenido en ácido oleico	9-10	3-4	78-82	2-4	3-5	5-9
Ácidos grasos residuales en WFF ² de soja con bajo contenido en ácido linolénico	24	7	10	57	3	60
Ácidos grasos residuales en SPI ³ comercial	18-24	5-7	14-15	45-55	5-7	50-62
Ácidos grasos residuales en SPI ³ con alto contenido en ácido oleico	8-10	3	80-83	2-3	3-4	5-7
Ácidos grasos residuales en SPI ³ con bajo contenido en ácido linolénico	26	6	15	52	2	54
Para esta tabla el % de ácidos grasos se refiere el ácido graso individual respecto a la suma de los cinco ácidos grasos principales indicados. Otros tipos de ácidos grasos que a veces están presentes y representan menos del 3% de los ácidos grasos totales no se consideran a efectos de comparación. ¹Los intervalos de valores para los cinco principales ácidos grasos en el aceite de soja comercial se han tomado de "The Lipid Handbook" 2nd ed., (1994) Gunstone, F. D., Harwood, J. L., Padley, F.B., Chapman & Hall. ²WFF = Harina fina de copos blancos de semillas de soja extraídos con hexano. ³SPI = Aislado de proteínas soja producido a partir de harina fina de copos blancos ⁴Tabla X de la patente de EE.UU. 5.710.369 ⁵Tabla 9 de la patente de EE.UU. 6.426.448 16:0 = ácido palmítico, 18:0 = ácido esteárico, 18:1 = ácido oleico, 18:2 = ácido linoleico, 18:3 = ácido linolénico						

Ejemplo 25

Análisis de ácidos grasos de aislados de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico y comercial

Los aislados de semillas de soja de tipo SUPRO®760 con alto contenido en ácido oleico, de tipo SUPRO®760 ver. 2 y comerciales se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 13.

- 5 Se realizó un análisis de ácidos grasos de los aislados como se describe a continuación y los resultados se muestran en la Tabla 10.

10 Las cantidades relativas de los ácidos grasos de proteínas de soja aisladas se determinaron como sigue. Las proteínas de soja aisladas se extrajeron por el método de hidrólisis ácida (AOAC 922.06). Los lípidos extraídos se saponificaron con hidróxido de sodio alcohólico. Los ácidos grasos se esterificaron con metanol, con trifluoruro de boro como catalizador, se recogieron en heptano, y se inyectaron en un cromatógrafo de gases Agilent 5890 equipado con un detector de ionización de llama y un inyector en columna en frío. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se separaron en una columna Supelco SP-2560 (100 m x 0,25 mm de DI). La temperatura del horno de la columna se fijó en 140°C durante 5 minutos, después se calentó a 4°C por minuto hasta una temperatura máxima de 240°C y se mantuvo en esa temperatura hasta el final del análisis. El porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos individuales se calculó a partir de un conjunto de patrones que contenían concentraciones conocidas de ésteres metílicos preparados de ácidos grasos seleccionados.

Tabla 10

Análisis de ácidos grasos de aislados del tipo SUPRO® 760 con alto contenido en ácido oleico y del tipo SUPRO® 760 comercial		
Análisis de ácidos grasos (AG)	Tipo SUPRO® 760 con alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 760 comercial
Grasas totales (%)	4,03	2,07
AG saturados	0,59	0,82
AG monoinsaturados	2,89	0,44
AG trans	<0,04	<0,04
Perfil de ácidos grasos (%)		
Palmítico	9,99	31,1
Estearico	3,44	7,61
Oleico	73,1	19,5
Vaccénico	1,56	2,19
Linoleico	3,17	32,0
Linolénico	3,59	2,69
Otros	5,15	4,91

Ejemplo 26

- 20 Mediciones de viscosidad de suspensiones de proteínas de soja preparadas a partir de aislados producidos usando una plataforma de producción a gran escala

Las mediciones de la viscosidad se realizaron usando un viscosímetro Brookfield, Modelo DV-II+.

Las muestras se prepararon pesando una cantidad designada de proteínas ($\pm 0,1$ g) en una copa de plástico para suspensión de proteínas al 5 y 10%.

- 25 En una probeta graduada de 250 mL, se midió una cantidad designada de agua desionizada a $26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. El agua se vertió en un frasco mezclador de vidrio de 0,473 litros (1 pinta) y se añadió cuidadosamente la muestra de proteínas. El frasco se tapó inmediatamente con el conjunto de cuchilla y la mezcla de muestra se agitó vigorosamente durante 20 segundos para dispersar las proteínas y evitar que se adhirieran a las paredes del frasco. Posteriormente la muestra se mezcló durante 1 minuto utilizando la velocidad más baja del mezclador. A continuación, se añadió la suspensión de proteínas a un vaso de 600 mL y se añadieron tres gotas de antiespumante a la suspensión y se

agitó la mezcla. El vaso se cubrió y se dejó en reposo durante 30 minutos, a continuación se agitó para disipar y eliminar cualquier espuma restante.

El viscosímetro Brookfield se ajustó (de acuerdo con las instrucciones del fabricante), y se midió la viscosidad de la muestra. Se midió la viscosidad en centipoises (cps). El número del husillo Brookfield era el 1, la velocidad de rotación era 100 rpm y la temperatura a la que se registraron los datos era 22°C.

Como puede verse en la Tabla 11, se redujo sustancialmente la viscosidad medida en cps para una dispersión al 5% y 10% de proteínas de soja procedentes de muestras de proteínas con alto contenido en ácido oleico en comparación con la muestra respectiva de la semilla de soja comercial (una reducción de 83% en suspensiones al 5% y una reducción de 87% en suspensiones al 10%)

Tabla 11

Mediciones de la viscosidad Brookfield de suspensiones de proteínas al 5% y al 10% de SUPRO® 760 alto contenido en ácido oleico y SUPRO® comercial		
Muestra	% de suspensión de proteínas	Viscosidad (cps)
SUPRO® 760 con alto contenido en ácido oleico	5	8
SUPRO® 760 comercial	5	47
SUPRO® 760 con alto contenido en ácido oleico	10	82
SUPRO® 760 comercial	10	630

Ejemplo 27

Mediciones de viscosidad de suspensiones de proteínas de soja preparadas a partir de aislados producidos usando una plataforma de producción a gran escala

Para la evaluación reológica, los aislados de proteínas fueron hidratados colocando 90 g de agua desionizada (DI) en una jarra mezcladora de plástico de 0,236 litros (8 onzas), seguido por la adición de 10 g de polvo de aislado a la superficie del agua. La mezcla se mezcló con un mezclador Oster utilizando el ajuste de "mezclamiento" durante 90 segundos. Después de este tiempo, la mezcla se decantó en una copa de plástico de 0,473 litros (16 onzas). La copa se tapó con una tapa de plástico, y la suspensión se dejó en reposo durante aproximadamente 4 horas a 22°C para permitir que una porción principal de la espuma de la parte superior del fluido se disipara antes de las mediciones reológicas.

Las mediciones reológicas se realizaron por duplicado en una combinación de reómetros Anton Paar MCR-300 y MCR-301. Cada reómetro estaba equipado con una geometría de cilindros concéntricos (Anton Paar CC27) que tenía una longitud activa de 119,2 mm, una longitud de posición de 72,5 mm, y una longitud de hueco de 40 mm. El control de temperatura se logró haciendo circular agua a 22°C desde baños a temperatura controlada hasta un calentador de muestras Peltier que controlaba la temperatura de la celda de medición. Todas las mediciones se llevaron a cabo a $25 \pm 0,05^\circ\text{C}$. Las curvas de viscosidad para cada muestra se obtuvieron por el siguiente procedimiento de 4 etapas: (1) Una muestra de 19 mL se cargó en la copa de cilindros concéntricos y se pre-cizalló durante 30 segundos a una velocidad de cizallamiento de 10 1/s para borrar el historial de carga de la muestra. (2) Inmediatamente después de la etapa de pre-cizallamiento, la muestra se dejó equilibrar a 25°C durante 10 minutos. (3) Luego la muestra se sometió a una rampa ascendente de la velocidad de cizallamiento de 1-100 1/s durante el cual se registraron 20 puntos de datos espaciados logarítmicamente en un intervalo de 30 s por punto. (4) La muestra se expuso luego inmediatamente a una rampa descendente de la velocidad de cizallamiento, que tenía las mismas características que la rampa ascendente, pero se aplicó en la dirección opuesta (100-1 1/s). Las curvas de velocidad resultantes de viscosidad frente a la velocidad de cizallamiento se ajustaron a un modelo polinómico de 2º log: viscosidad = $A (\text{velocidad de cizallamiento})^{b + c \ln(\text{velocidad de cizallamiento})}$, donde A, b, y c son constantes de ajuste. Durante estas mediciones también se registraron curvas de tensión de cizallamiento frente a velocidad de cizallamiento y se ajustaron a un modelo de la ley de potencia de Herschel-Bulkley: (tensión de cizallamiento) = $K (\text{velocidad de cizallamiento})^n$, donde K y n son los índices de consistencia y de flujo de Herschel-Bulkley, respectivamente. Durante cada medición también se registró al área de histéresis (AH) de la tensión de cizallamiento delimitada por las rampas ascendentes y descendentes de velocidad de cizallamiento,

Las características reológicas de los productos SUPRO® ISP con alto contenido en ácido oleico y comerciales resultantes de estas mediciones se comparan en la Tabla 10-A. Los valores medios de A, K, n (solamente de la rampa ascendente de la velocidad de cizallamiento) y el área de histéresis se recogen en la tabla. Los coeficientes medios de variación para cada parámetro fueron 2,3, 1,5, 0,4, y 7,4, respectivamente. Se observaron diferencias reológicas significativas entre los variantes comerciales y con alto contenido en ácido oleico de los productos SUPRO® 760, SUPRO® 1610, y SUPRO® 651 ISP. Las reducciones en los valores de A, K, y el área de histéresis

variaron entre 67-90%, 41-86% y 45-90%, respectivamente, para las muestras con alto contenido en ácido oleico frente a sus análogos comerciales. Las muestras de SUPRO® 760 y de SUPRO® 651 ISP con alto contenido en ácido oleico también mostraron mayores índices de flujo indicativos del comportamiento newtoniano frente a sus variantes comerciales. En contraste, prácticamente no se observaron diferencias reológicas entre las variantes productos con alto contenido en ácido y comerciales del producto SUPRO® 670 ISP

Tabla 12

Comparación reológica de productos del tipo SUPRO® ISP con alto contenido en ácido oleico y comerciales -
Dispersiones acuosas al 10% en peso a 25°C

Producto	A [mPa s]	K [MPa]	n	AH [Pa/s]
Tipo SUPRO® 760				
Comercial	6978,7	5032,3	0,473	175,00
Alto contenido en ácido oleico	2293,3	2278,4	0,548	96,28
Tipo SUPRO® 1610				
Comercial	7680,9	2811,7	0,564	186,20
Alto contenido en ácido oleico	1712,3	1667,4	0,492	85,48
Tipo SUPRO® 651				
Comercial	872,8	637,9	0,658	51,50
Alto contenido en ácido oleico	91,1	89,8	0,817	5,35
Tipo SUPRO® 670				
Comercial	10,8	11,3	0,946	0,05
Alto contenido en ácido oleico	12,0	12,4	0,945	0,00

Ejemplo 28

Determinación del color Hunter de productos (proteínas) de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico (Plataforma de producción a gran escala)

Las mediciones de color utilizando el colorímetro Hunter se hicieron en polvos de proteínas con alto contenido en ácido oleico y de proteínas comerciales y suspensiones acuosas al 5%. Se pueden detectar dos unidades de diferencias en el valor L y una unidad de diferencias en el índice de blancura. El índice de blancura se aumentó en 11% en el polvo con alto contenido en ácido oleico en comparación con el polvo comercial y 34% en las suspensiones con alto contenido en ácido oleico en comparación con las suspensiones comerciales. Los datos se muestran en las Tablas 13 y 14.

Se determinaron mediciones del índice de blancura de una muestra con 5% en peso de sólidos de aislados con alto contenido en ácido oleico y comerciales fabricados usando un colorímetro HunterLab Labscan XE fabricado por Hunter Associates Laboratory (HunterLab, Reston, VA). Para la medición del índice de blancura, las muestras de proteínas se dispersaron en una base con 5% en p/p: se añaden 5,25 g a 100 mL de agua desionizada. Los resultados obtenidos usando el colorímetro Hunter se indican en unidades L, a, y b. El índice de blancura se calcula a partir de los valores de la escala L y b utilizando la siguiente fórmula: Índice de Blancura = L - 3b

Tabla 13

Determinación de color Hunter de muestras de semillas de soja de alto contenido en ácido oleico y comerciales			
Muestra	Rasgo	Valor L	Índice de blancura
SUPRO® 760, polvo	Alto contenido en ácido oleico	87,9	58,0
SUPRO®760, polvo	Producto comercial	86,3	51,8
SUPRO®760, suspensión	Alto contenido en ácido oleico	69,9	47,5
SUPRO®760, suspensión	Producto comercial	68,2	31,2

Tabla 14

Determinación del color Hunter de muestras de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico y comerciales			
Muestra	Rasgo	Valor L	Índice de blancura
Tipo SUPRO® 1610, polvo	Producto comercial	82,78	40,6
Tipo SUPRO® 1610, polvo	Alto contenido en ácido oleico	84,34	44,38
Tipo SUPRO® 1610, suspensión	Producto comercial	48,01	25,81
Tipo SUPRO® 1610, suspensión	Alto contenido en ácido oleico	51,94	28,09
Tipo SUPRO® 651, polvo	Producto comercial	84,07	39,52
Tipo SUPRO® 651, polvo	Alto contenido en ácido oleico	86,62	47,41
Tipo SUPRO® 651, suspensión	Producto comercial	60,36	24,9
Tipo SUPRO® 651, suspensión	Alto contenido en ácido oleico	63,27	32,43
Tipo SUPRO® 670, polvo	Producto comercial	83,26	40,15
Tipo SUPRO® 670, polvo	Alto contenido en ácido oleico	85,5	48,48
Tipo SUPRO® 670, suspensión	Producto comercial	58,99	29,95
Tipo SUPRO® 670, suspensión	Alto contenido en ácido oleico	60,09	38,52
Tipo SUPRO® 760, polvo	Producto comercial	83,7	44,64
Tipo SUPRO® 760, polvo	Alto contenido en ácido oleico	85,7	49,2
Tipo SUPRO® 760, suspensión	Producto comercial	48,81	29,58
Tipo SUPRO® 760, suspensión	Alto contenido en ácido oleico	55,45	37,54

Ejemplo 29

Preparación de leche de soja con sabor normal

- 5 Aproximadamente de 9,07 kg (20 libras) de semillas de soja enteras y secas se humectaron en un exceso 18,14 kg o más (40 libras o más) de agua fría del grifo, y luego se dejaron decantar durante una noche. A continuación, el exceso de agua se drenó y se desechó. Los 18,14 kg (40 libras) de semillas de soja rehidratadas se molieron en un molino o triturador. Se añadió continuamente durante la molienda una cantidad suficiente de agua para mantener la suspensión en movimiento en el molino. Luego se añadió suficiente agua para llevar el peso total de la suspensión hasta aproximadamente 81,65 kg (180 libras). A continuación la suspensión se transfirió a un aparato de cocción a presión y la temperatura se elevó, por inyección de vapor de agua, hasta 116°C, y la temperatura se mantuvo constante durante aproximadamente 40 segundos. La suspensión o leche de soja se sacó del aparato de cocción a presión y se hizo pasar a través de un paño de malla gruesa. El residuo de soja (okara) se prensó en la bolsa para retirar la leche de soja atrapada y luego se desechó el okara. La leche de soja resultante se hizo pasar a través de una tela de malla fina y se recogió en un recipiente. Este procedimiento produjo aproximadamente 90,72 kg (200 libras) de leche de soja a 93,3°C. Se añadieron lecitina (93 g), aceite de maíz (533 g) y aroma de levadura (180 g) y la mezcla se agitó usando un mezclador de de cizallamiento a alta velocidad Tekmar durante 30 segundos.

Ejemplo 30

Preparación de leche de soja aromatizada

- 20 Se prepararon bebidas de leche de soja, que incluía los ingredientes que se exponen en la siguiente tabla, a partir del producto descrito anteriormente (leche de soja con sabor normal del ejemplo) y un aislado de proteína de soja (SUPRO® 760).

- 25 Se calentó 100% de agua hasta 65,6°C y se mantuvo a 65,6°C con agitación hasta que se añadieron todos los ingredientes. El producto proteínico se añadió con agitación y se mezcló hasta que se disolvió. Se mezclaron en seco sacarosa, carboximetilcelulosa y carragenina y se añadieron a la suspensión de proteínas y se mezclaron hasta que se disolvieron. Se añadieron carbonato de calcio y cloruro de sodio y se dispersaron. Luego se añadió aceite de soja seguido por agentes aromatizantes y una premezcla de vitaminas. El pH del sistema se ajustó entre 6,8 y 7,0 usando HCl o NaOH según fuera necesario. Los productos se procesaron luego en un procesador de corto tiempo a temperatura ultra alta a 143°C durante 10 segundos. A continuación, los productos se homogeneizaron en un homogeneizador de 2 etapas a una presión de 13,79 MPa y 3,45 MPa (2000 y 500 psi), se enfriaron y se introdujeron en botellas limpias y se almacenaron en un refrigerador. El índice de blancura y la viscosidad de las

muestras se muestran en la Tabla 15. El índice de blancura y la viscosidad de la leche de soja aromatizada con alto contenido en ácido oleico en comparación con leche de soja aromatizada de semillas de soja comerciales aumentó en 22% y se redujo en 40%, respectivamente

Tabla 15

Muestra	Rasgo	Índice de blancura	Viscosidad (cps)
SUPRO®760, leche de soja aromatizada	Alto contenido en ácido oleico	27,67	6,25
SUPRO®760, leche de soja aromatizada	Producto comercial	21,52	10,4

5 Ejemplo 31

Características físicas de la leche de soja normal

Se preparó leche de soja normal a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico y comerciales como se ha descrito en el Ejemplo 30. El índice de blancura y la viscosidad de las muestras se recogen en la Tabla 16. La viscosidad de la leche de soja con alto contenido en ácido oleico se redujo en 17% en comparación con la leche de soja comercial. El índice de blancura de la leche de soja con alto contenido en ácido oleico aumentó en 7,5% en comparación con la leche de soja preparadas a partir de semillas de soja comerciales.

Tabla 16

Muestra	Rasgo	Índice de blancura	Viscosidad (cps)
SUPRO® 760, leche de soja normal	Alto contenido de ácido oleico	55,27	3,45
SUPRO® 760, leche de soja normal	Producto comercial	51,14	4,15

Ejemplo 32

15 Método por cromatografía de gases (CG) / Espectrometría de masas (EM) de microextracción en fase sólida (MEFS) para el análisis de componentes volátiles de soja

Se preparan muestras para el análisis de compuestos volátiles de soja utilizando los métodos CG/EM MEFS pesando $2,5 \pm 0,005$ g de la muestra a analizar en un navecilla de pesada. A continuación, se miden $47,5 \pm 0,1$ g de agua para ósmosis inversa (por ejemplo, de Mili-Q o Labcono) en un copa de mezclador Waring de 250 mL. El mezclador se pone en marcha a la velocidad mínima y la muestra pesada se rocía sobre el agua durante aproximadamente 10 segundos. La muestra y el agua se mezclan formando una suspensión usando la velocidad mínima para mantener la formación de espuma a un mínimo. El tiempo de mezclado debe ser suficiente para conseguir una buena dispersión de la muestra y debe ser alrededor de 30 segundos y no exceder de 60 segundos. Esto debe mantenerse constante para cada matriz de la muestra. Si se desarrolla espuma, debe retirarse con una cuchara y manualmente agitar de nuevo en la mezcla de la muestra.

25 Con el fin de lograr la suspensión y hacerla lo más homogénea posible, se agita brevemente con una cuchara o pala. A continuación, 30 g de la suspensión se transfieren rápidamente desde la copa del mezclador a un vial tarado para la MEFS (frasco para suero de 50 mL: Supelco p/n 33108-u) que contiene 11,1 g de NaCl (calidad Omnipur, EMD Chemicals).

30 De la solución madre del patrón interno con 49,2 ppm de 4-heptanona, se pipetea 100 μ L en el vial para la MEFS obteniéndose por mezclado una concentración del patrón interno de 164 ppm. Se deja caer en el vial una barra de agitación de teflón de 2,54 cm (1 pulgada) de longitud y un diámetro de 1,6 mm (1/16 pulgadas) y el vial se selló con una cápsula con tabique rebordeada (Supelco) provista con un tabique de teflón natural/silicona azul (Microanalytical Supplies) para asegurar un buen sellado hermético. El frasco se colocó luego en el centro de una placa agitadora y se agitó durante 5 minutos a 300 rpm para permitir el mezclado completo y el equilibrio del espacio de cabeza.

35 La extracción de la muestra se realiza como sigue. La fibra para la MEFS se preacondiciona según recomienda el manual del fabricante (Supelco) durante 30 minutos a 250°C con flujo mínimo de gas portador, si se utiliza por primera vez. El reacondicionamiento de la fibra se realiza insertándola en el puerto de inyección trasero a 280°C entre experimentos durante un mínimo de 30 minutos. Una vez que está equilibrado el espacio de cabeza, la fibra para MEFS envainada se inserta a través del tabique. Se ha de asegurar que ni la vaina ni la fibra toquen ni se sumerjan en el líquido.

A continuación, la fibra para la MEFS tiene que extenderse fuera de su vaina, y se expone al espacio de cabeza durante 30 minutos. La altura de la fibra se debe ajustar de tal manera que el extremo esté aproximadamente % (sic)

sobre la superficie del líquido. Posteriormente, la fibra para la MEFS se retrae en su vaina y se retira del tabique. La fibra que contiene los compuestos volátiles debe ser inyectada tan pronto como sea posible para su análisis. El análisis se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N con un detector 7973 MSD y el programa informático Agilent ChemStation. La muestra se inyecta con la fibra para la MEFS envainada a través del tabique del inyector, y a continuación se desenvaina rápidamente la fibra en el cuerpo del inyector. La separación comienza cuando se inicia la cromatografía de gases. La MEFS se debe dejar sin vaina en el inyector durante 1,5 minutos, después de los cuales se retira y se reacondiciona y se vuelve a llevar a su vaina.

Los datos se analizan usando el programa informático Agilent ChemStation y las áreas de los picos se calculan por integración manual. Las áreas de los picos calculadas para cada componente volátil diana se convierten a ppm por la siguiente fórmula: *Concentración de componente volátil en la suspensión ($\mu\text{g/kg}$ de suspensión) = $164 \times \text{área del pico diana} / \text{área del pico del patrón interno}$.*

Ejemplo 33

Análisis de componentes volátiles de aislados de soja.

La preparación y análisis de las muestras se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 32, y la concentración de componentes volátiles en la suspensión¹ se muestra en la Tabla 17.

Como puede verse en la Tabla 17 (los niveles de hexanal en muestras con alto contenido en ácido oleico son sustancialmente menores en comparación con los niveles de hexanal en las muestras respectivas de semillas de soja comerciales). Se cree que los niveles inferiores de hexanal corresponden a la mejora de sabor de los productos de proteína de soja.

Tabla 17

Producto de proteínas Componentes Volátiles	Tipo SUPRO® 760 con alto contenido en ácido oleico	Tipo SUPRO® 760 comercial	Tipo SUPRO® 670 comercial	Tipo SUPRO® 670 con alto contenido en ácido oleico	Tipo Alfa™ 5800 comercial	Tipo Alfa™ 5800 con alto contenido en ácido oleico
Pental	2,7 ¹	11,8	3,9	ND	2,5	ND
Hexanal	10,6	171	35,9	3,6	19,6	1,7
2-Heptanona	1,4	26,5	12,4	1,6	8,0	0,34
Heptanal	1,1	2,60	0,57	0,25	0,30	0,45
1-Octen-3-ol	0,25	0,68	0,19	ND	0,13	ND
2-Octanona	0,11	1,5	0,54	0,12	0,27	ND
2-Pentilfurano ²	0,90	59,7	15,7	1,5	2,52	0,12
3-Octen-2 ona	ND ²	0,60	0,61	ND	ND	ND
2-Nonanona	0,93	1,2	0,96	0,96	0,15	0,11
Nonanal	2,3	2,4	0,64	0,65	0,39	0,46
Decanal	ND	0,52	ND	0,27	0,08	0,22

¹Todas las concentraciones se expresan como μg de componentes volátiles/kg de suspensión al 5% respecto al patrón interno 4-heptanona, que estaba presente a $164 \mu\text{g/kg}$ de suspensión al 5%.

²ND = no detectado

Listado de secuencias

<110> Knowlton, Susan
Blaisdell, Charles

<120> Productos de proteínas de soja que tienen características alteradas

5 <130> BB1587 PCT

<140> 61/015750

<141> 21-12-2007

<160> 26

<170> Patent In versión 3.5

10 <210> 1

<211> 7993

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> construcción recombinante

<220>

<221> característica nueva

<222> (5182)..(5182)

<223> n es a, c, g, o t

20 <400> 1

```

cgcgccaagc ttggatccgc gccaaagcttg gatcctagaa ctagaaacgt gatgccactt    60
gttattgaag tcgattacag catctattct gttttactat ttataacttt gccattttctg    120
acttttgaaa actatctctg gatttcggta tcgctttgtg aagatcgagc aaaagagacg    180
ttttgtggac gcaatgggtc aaatccgttc tacatgaaca aattgggtcac aatttccact    240
aaaagtaa ataatggcaag ttaaaaaagg aatatgcatt ttactgattg cctagggtgag    300
ctccaagaga agttgaatct acacgtctac caaccgctaa aaaaagaaaa acattgatat    360
gtaacctgat tccattagct ttgacttct tcaacagatt ctctacttag atttctaaca    420
gaaatattat tactagcaca tcattttcag tctcactaca gcaaaaaatc caacggcaca    480
atacagacaa caggagatat cagactacag agatagatag atgctactgc atgtagtaag    540
ttaaataaaa ggaaaataaa atgtcttgct accaaaacta ctacagacta tgatgctcac    600
cacaggccaa atcctgcaac taggacagca ttatcttata tatattgtac aaaacaagca    660
tcaaggaaca tttgggtctag gcaatcagta cctcgttcta ccatcaccct cagttatcac    720
atccttgaag gatccattac tgggaatcat cggcaacaca tgctcctgat ggggcacaat    780
gacatcaaga aggtaggggc caggggtgtc caacattctc tgaattgccg ctctaagctc    840
ttccttcttc gtcaactcgc ctgccggtat cccacaagca tcagcaaact tgagcatggt    900
tgggaatatc tcgctctcgc tagacggatc tccaagatag gtgtgagctc tattggactt    960
gtagaacctt tcctccaact gaaccaccat acccaaatgc tgattgttca acaacaatat   1020

```

cttaactggg agatttctcca ctcttatagt ggccaactcc tgaacattca tgatgaaact	1080
accatcccca tcaatgtcaa ccacaacagc cccaggggta gcaacagcag caccaatagc	1140
cgcaggcaat ccaaaaccca tggctccaag acccctgag gtcaaccact gcctcgggtct	1200
cttgacttg taaaactgcg cagcccacat ttgatgctgc ccaaccccag tactaacaat	1260
agcatctcca ttagtcaact catcaagaac ctcgatagca tgctgaggag aaatcgcgtc	1320
ctggaatgtc ttgtaaccca atggaaactt gtgtttctgc acattaatct cttctctcca	1380
acctccaaga tcaaacttac cctccactcc tttctcctcc aaaatcatat taattccctt	1440
caaggccaac ttcaaatccg cgcaaaccga cacgtgcgcc tgcttggtct tcccaatctc	1500
ggcagaatca atatcaatgt gaacaatctt agccctacta gcaaaagcct caagcttccc	1560
agtaacacgg tcatcaaacc ttaccccaaa ggcaagcaac aaatcactat tgtcaacagc	1620
atagttagca taaacagtac catgcatacc cagcatctga agggaatatt catcaccaat	1680
aggaaaagt ccaagacca ttaaagtgtc agcaacggga ataccagtga gttcaacaaa	1740
gcgcctcaat tcagcactgg aattcaaaact gccaccgccg acgtagagaa cgggcttttg	1800
ggcctccatg atgagtctga caatgtgttc caattgggcc tcggcggggg gcctgggcag	1860
cctggcgagg taaccgggga ggttaacggg ctcgtcccaa ttaggcacgg cgagttgctg	1920
ctgaacgtct ttgggaatgt cgatgaggac cggaccgggg cggccggagg tggcgacgaa	1980
gaaagcctcg gcgacgacgc gggggatgtc gtcgacgtcg aggatgaggt agttgtgctt	2040
cgtgatggat ctgctcacct ccacgatcgg ggtttcttgg aaggcgtcgg tgccgatcat	2100
ccggcgggcg acctggccgg tgatggcgac gactgggacg ctgtccatta aagcgtcggc	2160
gaggccgctc acgaggttgg tggcgccggg gccggagggt gcaatgcaga cgccggggag	2220
gccggaggaa cgcgcgtagc cttcggcggc gaagacgccg ccctgctcgt ggcgcgggag	2280
cacgttgctg atggcgccgg agcgcgtagc cgctggtg atctccatcg acgcaccgcc	2340
ggggtacgcy aacaccgtcg tcacgccctg cctctccagc gcctccacaa ggatgtccgc	2400
gcccttgcca ggttcgccgg aggcgaaccg tgacacgaag ggctccgtgg tcggcgcttc	2460
cttggtgaag ggcgccgccg tgggggggtt ggagatggaa catttgattt tgagagcgtg	2520
gttgggtttg gtgagggttt gatgagagag agggagggtg gatctagtaa tgcgtttggg	2580
gaagggtggg tgtgaagagg aagaagagaa tcgggtggtt ctggaagcgg tggccgccat	2640
tgtgttgtgt ggcattggtt tacttcaaaa actgcacaac aagcctagag ttagtaccta	2700
aacagtaa at ttacaacaga gagcaaagac acatgcaaaa atttcagcca taaaaaagt	2760
tataatagaa tttaaagcaa aagtttcatt ttttaaacad atatacaaac aaactggatt	2820
tgaaggaagg gattaattcc cctgctcaaa gtttgaattc ctattgtgac ctatactcga	2880
ataaaattga agcctaagga atgtatgaga aacaagaaaa caaaacaaaa ctacagacaa	2940

acaagtacaa ttacaaaatt cgctaaaatt ctgtaatcac caaaccccat ctcagtcagc	3000
acaaggccca aggtttatct tgaaataaaa aaaaagtgat tttatttctc ataagctaaa	3060
agaaagaaag gcaattatga aatgatttcg actagatctg aaagtccaac gcgtattccg	3120
cagatattaa agaaagagta gagtttcaca tggatcctag atggaccag ttgaggaaaa	3180
agcaaggcaa agcaaacag aagtgaaga tccgaaattg aaccacggaa tctaggattt	3240
ggtagagggg gaagaaaagt accttgagag gtagaagaga agagaagagc agagagatat	3300
atgaacgagt gtgtcttggt ctcaactctg aagcgatagc agtttagagg ggagcattga	3360
gttccaattt atagggaaac cgggtggcag gggtagagta atgacggaaa agccccaaag	3420
taacgagatt ggattgtggg ttagattcaa ccgtttgcat ccgcggctta gattggggaa	3480
gtcagagtga atctcaaccg ttgactgagt tgaaaattga atgtagcaac caattgagcc	3540
aaccccagcc ttgcccctt gatatttgatt tgtttgttgc atacttttta ttgtcttct	3600
ggttctgact ctctttctct cgtttcaatg ccaggttgcc tactcccaca ccactcacia	3660
gaagattcta ctgtagtat taaatatttt ttaatgtatt aaatgatgaa tgcttttgta	3720
aacagaacaa gactatgtct aataagtgtc ttgcaacatt ttttaagaaa ttaaaaaaa	3780
tatattttat atcaaaatca aatgtatgaa aaatcatgaa taatataatt ttatacattt	3840
ttttaaaaaa tcttttaatt tcttaattaa tatcttaaaa ataatgatta atatttaacc	3900
caaaataatt agtatgattg gtaaggaaga tatccatggt atgtttggat gtgagtttga	3960
tctagagcaa agcttactag agtcgaccga tccgtcgacg gcgcggatcc tcgaagagaa	4020
gggttaataa cacatttttt aacattttta acacaaattt tagttattta aaaattttat	4080
aaaaatttta aaataagaag aggaactctt taaataaatc taacttacaa aatttatgat	4140
ttttaataag ttttcaccaa taaaaaatgt cataaaaata tgttaaaaag tatattatca	4200
atattctctt tatgataaat aaaaagaaaa aaaaaataaa agttaagtga aaatgagatt	4260
gaagtgactt taggtgtgta taaatatatc aaccccgcca acaattttat taatccaaat	4320
atattgaagt atattattcc atagccttta tttattttata tttttattat ataaaagctt	4380
tatttgttct aggttgttca tgaaatattt ttttggtttt atctccgttg taagaaaatc	4440
atgtgctttg tgtcgccact cactattgca gctttttcat gcattggtca gattgacggt	4500
tgattgtatt tttgtttttt atggttttgt gttatgactt aagtcttcat ctctttatct	4560
cttcatcagg tttgatgggt acctaatatg gtccatgggt acatgcatgg ttaaattagg	4620
tggccaactt tgttgtgaac gatagaattt tttttatatt aagtaaaacta tttttatatt	4680
atgaaataat aataaaaaaa atattttatc attattaaca aaatcatatt agttaatttg	4740
ttaactctat aataaaagaa atactgtaac attcacatta catggtaaca tctttccacc	4800
ctttcatttg tttttgttt gatgactttt tttcttgttt aaattttatt cctttctttt	4860
aaatttggaat tacattatca tcatatataa actaaaatac taaaaacagg attacacaaa	4920

tgataaataa taacacaaat atttataaat ctagctgcaa tatattttaa ctagctatat	4980
cgatattgta aaataaaact agctgcattg atactgataa aaaaatatca tgtgctttct	5040
ggactgatga tgcagtatac ttttgacatt gcctttatntt tatttttcag aaaagctttc	5100
ttagttcttg gttcttcatt atttgtttcc catctccatt gtgaattgaa tcatttgctt	5160
cgtgtcacaa atacaattta gntaggtaga tgcattgggc agattcacgg tttattatgt	5220
catgacttaa gttcatggta gtacattacc tgccacgcat gcattatatt ggtagattt	5280
gataggcaaa tttgggtggt aacaatataa atataaataa tgtttttata ttacgaaata	5340
acagtgatca aaacaaacag ttttatcttt attaacaaga ttttgttttt gtttgatgac	5400
gttttttaat gtttacgctt tcccccttct tttgaattta gaacacttta tcatcataaa	5460
atcaaatact aaaaaaatta catatttcat aaataataac acaaatattt ttaaaaaatc	5520
tgaaataata atgaacaata ttacatatta tcacgaaaat tcattaataa aaatattata	5580
taaataaaat gtaatagtag ttatatgtag gaaaaaagta ctgcacgcat aatatatata	5640
aaaagattaa aatgaactat tataaataat aacactaaat taatggtgaa tcatatcaaa	5700
ataatgaaaa agtaaaaaa atttgtaatt aacttctata tgtattacac acacaaataa	5760
taaataatag taaaaaaaat tatgataaat atttaccatc tcataagata tttaaaataa	5820
tgataaaaat atagattatt ttttatgcaa ctagctagcc aaaaagagaa cacgggtata	5880
tataaaaaga gtacctttaa attctactgt acttcttcta ttcctgacgt ttttatatca	5940
agtggacata cgtgaagatt ttaattatca gtctaaatat ttcattagca cttactactt	6000
ttctgtttta ttcctatcct ataagtagtc ccgattctcc caacattgct tattcacaca	6060
actaactaag aaagtcttcc atagcccccc aagcggccgg agctgggcat ctcgctcatc	6120
gtcagagtcgg cggccggagc tgggtcatctc gctcatcgtc gagtcggcgg ccgcccgtcc	6180
tctctctttc cgtggcatgg caatctattg ggctgtccag ggttgcaccc ttactgggtg	6240
ttgggtcatt gcccatgagt gtggtcacca tgcattcagt gactaccagc tgcttgatga	6300
tattgttggc cttatcctcc actccgctct ctagtcccg tacttttcat ggaaatacag	6360
ccatcgccgt caccactcca aactgggttc tcttgagcgg gatgaagtat ttgtgcaaaa	6420
gcagaagtcc tgtatcaagt ggtactctaa ataccttaac aatcctccag gcagagtcct	6480
cactcttgct gtcaccctca cacttgggtg gcccttgtag ttggctttta atgtttctgg	6540
aaggccttat gatagatttg cttgccacta tgaccatat ggtcccatat actctgatcg	6600
tgaacgactt caaatatata tatcagatgc aggagtactt gcaggactta ctctctctac	6660
cgtgttgcaa ccctgaaagg gttgggttgg ctgctatgtg tttatggggg gcctttgtct	6720
attgtgaacg gttttcttgt gactatcaca tatttgagc acacacactt tgccttgctt	6780
cattacgatt catcagaatg ggactggctg aaggaggctt tggcaactat ggacagagat	6840

tatgggattc tgaacaaggt gtttcatcac ataactgata ctcatgtggc tcaccatctc	6900
ttctctacaa tgccacatta ccatgcaatg gaggcaacca atgcaatcaa gccaatattg	6960
gggtgagtact accaatttga tgacacacca ttttacaagg cactgtggag agaagcgaga	7020
gagtgcctct atgtggagcc agatgaagga acatccgaga agggctcctc caccgtttaa	7080
gattgcagaa atcagagctt caataccaaa acattgctgg gtcaagaatc catggagatc	7140
cctcagttat gttctcaggg atgtgcttgt aattgctgca ttggtggctg cagcaattca	7200
cttcgacaac tggcttctct ggctaattcta ttgccccatt caaggcacia tgttctgggc	7260
tctctttgtt cttggacatg attgtggcca tgggaagctt tcagatagcc ctttgcgtgaa	7320
tagcctggtg ggacacatct tgcattcctc aattcttgtg ccataccatg gatggagaat	7380
tagccacaga actcaccatc aaaaccatgg acacattgag aaggatgagt catgggttcc	7440
attaacagag aagattttaca agaattctaga cagcatgaca agactcatta gattcactgt	7500
gccatttcca ttgtttgtgt atccaattta tttgttttca agaagccccg gaaaggaagg	7560
ctctcacttc aatccctaca gcaatctgtt cccaccaggt gagagaaaag gaatagcaat	7620
atcaacactg tgttgggcta ccatgttttc tctgcttate tatctctcat tcataactag	7680
tccacttcta gtgtcaagc tctatgggag gccgcccact cgacgatgag cgagatgacc	7740
agctccggcc gccgactcga cgatgagcga gatgaccagc tccggccgag acacaagtgt	7800
gagagtacta aataaatgct ttggttgtac gaaatcatta cactaaataa aataatcaaa	7860
gcttatatat gccttccgct aaggccgaat gcaaagaaat tggttctttc tcgttatctt	7920
ttgccacttt tactagtacg tattaattac tacttaatca tctttgttta cggctcatta	7980
tatccgtcga cgg	7993

<210> 2
 <211> 1533
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> construcción recombinante
 <400> 2

cggctccttc tctttccgtg gcatggcaat ctattgggct gtccaggggt gcacccctac	60
tgggtgtttgg gtcattgccc atgagtgtgg tcaccatgca ttcagtgact accagctgct	120
tgatgatatt gttggcctta tcctccactc cgctctccta gtcccgtact tttcatggaa	180
atacagccat cgccgtcacc actccaacac tggttctctt gagcgggatg aagtatttgt	240
gccaaagcag aagtcctgta tcaagtggta ctctaaatac cttaacaatc ctccaggcag	300
agtcctcact cttgctgtca cctcacact tgggtggccc ttgtacttgg ctttaaagt	360
ttctggaagg ccttatgata gatttgcttg ccactatgac ccatatggtc ccatttactc	420
tgatcgtgaa cgacttcaaa tatatatatc agatgcagga gtacttgag gacttactct	480

ctctaccgtg ttgcaaccct gaaaggggtg gtttggtgc tatgtgttta tggggtgcct 540
 ttgctcattg tgaacgggtt tcttgtgact atcacatatt tgcagcacac acactttgcc 600
 ttgcctcatt acgattcatc agaatgggac tggctgaagg gagctttggc aactatggac 660
 agagattatg ggattctgaa caagggtgtt catcacataa ctgatactca tgtggctcac 720
 catctcttct ctacaatgcc acattacat gcaatggagg caaccaatgc aatcaagcca 780
 atattgggtg agtactacca atttgatgac acaccatttt acaaggcact gtggagagaa 840
 gcgagagagt gcctctatgt ggagccagat gaaggaacat ccgagaaggg ctctccacc 900
 gtttaagatt gcagaaatca gagcttcaat accaaaacat tgctgggtca agaatccatg 960
 gagatccctc agttatgttc tcagggatgt gcttgaatt gctgcattgg tggctgcagc 1020
 aattcacttc gacaactggc ttctctggct aatctattgc cccattcaag gcacaatgtt 1080
 ctgggctctc ttgttcttg gacatgattg tggccatgga agcttttcag atagcccttt 1140
 gctgaatagc ctggtgggac acatcttgca ttcctcaatt cttgtgccat accatggatg 1200
 gagaattagc cacagaactc accatcaaaa ccatggacac attgagaagg atgagtcattg 1260
 ggttccatta acagagaaga tttaacagaa tctagacagc atgacaagac tcattagatt 1320
 cactgtgcca ttccattgt ttgtgtatcc aatttatttg ttttcaagaa gccccggaaa 1380
 ggaaggctct cacttcaatc cctacagcaa tctgttccca cccagtgaga gaaaaggaat 1440
 agcaatatca acactgtgtt gggctaccat gttttctctg cttatctatc tctcattcat 1500
 aactagtcca cttctagtgc tcaagctcta tgg 1533

<210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> cebador

<400> 3
 gcggccgccc gtctctctc ttccgtg 28

10

<210> 4
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

15

<400> 4
 taaacggtg aggagccctt ctgcatgtt c 31

<210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

20

<220>
 <223> cebador

<400> 5
 gaacatccga gaagggtcc tccacgttt aag 33

25

<210> 6
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

	<220>		
	<223>	cebador	
	<400>	6	
		gcggccgccc atagagcttg agcactag	28
5	<210>	7	
	<211>	890	
	<212>	DNA	
	<213>	secuencia artificial	
	<220>		
10	<223>	construcción recombinante	
	<400>	7	
		cggtcctctc tctttccgtg gcatggcaat ctattgggct gtccagggtt gcatccttac	60
		tggtgtttgg gtcattgccc atgagtgtgg tcaccatgca ttcagtgact accagctgct	120
		tgatgatatt gttggcctta tcctccactc cgctctccta gtcccgtact tttcatggaa	180
		atacagccat cgccgtcacc actccaacac tggttctctt gagcgggatg aagtatttgt	240
		gccaaagcag aagtcctgta tcaagtggta ctctaaatac cttacaatc ctccaggcag	300
		agtcctcact cttgctgtca ccttcacact tggttggccc ttgtacttg ctttaaatgt	360
		ttctggaagg ccttatgata gatttgcttg ccactatgac ccatatggtc ccatttactc	420
		tgatcgtgaa cgacttcaaa tatatatatc agatgcagga gtacttgag gacttactct	480
		ctctaccgtg ttgcaaccct gaaagggttg gtttggtgc tatgtgttta tggggtgcct	540
		ttgctcattg tgaacggttt tcttgtgact atcacatatt tgcagcacac acactttgcc	600
		ttgcctcatt acgattcatc agaatgggac tggctgaagg gagctttggc aactatggac	660
		agagattatg ggattctgaa caagggtgtt catcacataa ctgatactca tgtggctcac	720
		catctcttct ctacaatgcc acattaccat gcaatggagg caaccaatgc aatcaagcca	780
		atattgggtg agtactacca atttgatgac acaccatttt acaaggcact gtggagagaa	840
		gcgagagagt gcctctatgt ggagccagat gaaggaacat ccgagaagg	890
	<210>	8	
	<211>	28	
15	<212>	DNA	
	<213>	secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	cebador	
	<400>	8	
20		gcggccgccc gtcctctc tttccgtg	28
	<210>	9	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	secuencia artificial	
	<220>		
25	<223>	cebador	
	<400>	9	
		tagagagagt aagtcctgca agtactcctg	30
	<210>	10	
30	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	secuencia artificial	

<220>
 <223> cebador

 <400> 10
 caggagtact tgcaggactt actctctcta 30

 5 <210> 11
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

 <220>
 10 <223> cebador

 <400> 11
 gcggccggcc cctctcgga tttccttc 29

 <210> 12
 <211> 2460
 15 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> construcción recombinante

 <220>
 20 <221> característica nueva
 <222> (1186)..(1186)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 12

 ccaagcttgg atcctcgaag agaagggtta ataacacatt ttttaacatt ttttaacacaa 60
 attttagtta tttaaaaatt tattaaaaaa tttaaaataa gaagagggaac tctttaaata 120
 aatctaactt acaaaattta tgatttttaa taagttttca ccaataaaaa atgtcataaa 180
 aatatgttaa aaagtatatt atcaatattc tctttatgat aaataaaaag aaaaaaaaaa 240

taaaagttaa	gtgaaaatga	gattgaagtg	acttttaggtg	tgtataaata	tatcaacccc	300
gccaacaatt	tatttaaatcc	aaatatattg	aagtatatta	ttccatagcc	tttattttatt	360
tatatattta	ttatataaaa	gctttatttg	ttctaggttg	ttcatgaaat	atTTTTTTTg	420
ttttatctcc	gttgtaagaa	aatcatgtgc	tttggtgcgc	cactcactat	tgcagctttt	480
tcatgcattg	gtcagattga	cgggtgattg	tatttttgtt	ttttatgggt	ttgtgttatg	540
acttaagtct	tcatctcttt	atctcttcat	caggtttgat	ggttacctaa	tatgggtccat	600
gggtacatgc	atgggttaa	taggtggcca	actttgttgt	gaacgataga	atTTTTTTTt	660
tattaagtaa	actatTTTTt	tattatgaaa	taataataaa	aaaaatattt	tatcattatt	720
aacaaaatca	tattagttaa	tttgtaaact	ctataataaa	agaaatactg	taacattcac	780
attacatggg	aacatctttc	caccctttca	tttgTTTTt	gttgatgac	tttttttctt	840
gtttaaattt	atttcccttc	ttttaaattt	ggaatacatt	atcatcatat	ataaaactaaa	900
atactaaaaa	caggattaca	caaatgataa	ataataacac	aaatatttat	aaatctagct	960
gcaatatatt	taaactagct	atctgatgat	tgtaaaataa	aactagctgc	attgatactg	1020
ataaaaaaat	atcatgtgct	ttctggactg	atgatgcagt	atacttttga	cattgccttt	1080
atTTTTTTTt	tcagaaaagc	tttcttaggt	ctgggttctt	cattatttgt	ttcccatctc	1140
cattgtgaat	tgaatcattt	gcttcgtgtc	acaaatacaa	tttagntagg	tacatgcatt	1200
ggtcagattc	acggtttatt	atgtcatgac	ttaagttcat	ggtagtacat	tacctgccac	1260
gcatgcatta	tattgggttag	atttgatagg	caaatttggg	tgtcaacaat	ataaatataa	1320
ataatgtttt	tatattacga	aataacagtg	atcaaaaaca	acagttttat	ctttattaac	1380
aagattttgt	ttttgtttga	tgacgttttt	taatgtttac	gctttcccc	ttcttttgaa	1440
tttagaacac	tttatcatca	taaaatcaaa	tactaaaaaa	attacatatt	tcataaataa	1500
taacacaaat	atTTTTTaaa	aatctgaaat	aataatgaac	aatattacat	attatcacga	1560
aaattcatta	ataaaaaatat	tatatataa	aaatgtaata	gtagttatat	gtaggaaaaa	1620
agtactgcac	gcataatata	tacaaaaaga	ttaaaatgaa	ctattataaa	taataacact	1680
aaattaatgg	tgaatcatat	caaaataatg	aaaaagtaaa	taaaatttgt	aattaacttc	1740
tatatgtatt	acacacacaa	ataataaata	atagtaaaaa	aaattatgat	aaatattttac	1800
catctcataa	gatattttaa	ataatgataa	aatatagat	tattttttat	gcaactagct	1860
agccaaaaag	agaacacggg	tatatataaa	aagagtacct	ttaaattcta	ctgtacttcc	1920
tttattcctg	acgtttttat	atcaagtgga	catacgtgaa	gatttttaatt	atcagtctaa	1980
atatttcatt	agcacttaat	acttttctgt	tttattccta	tcctataagt	agtcccgaatt	2040
ctcccaacat	tgcttattca	cacaactaac	taagaaagtc	ttccatagcc	ccccagcg	2100
ccggagctgg	tcatctcgct	catcgctgag	tcggcgccg	gagctgggtca	tctcgctcat	2160
cgtcgagtcg	gcggccgccc	actcgacgat	gagcgagatg	accagctccg	gccgcccact	2220
cgacgatgag	cgagatgacc	agctccggcc	gcgacacaag	tgtgagagta	ctaaataaat	2280
gctttgggtg	tacgaaatca	ttacactaaa	taaaataatc	aaagcttata	tatgccttcc	2340
gctaaggccg	aatgcaaaga	aattggttct	ttctcgttat	cttttgccac	ttttactagt	2400
acgtattaat	tactacttaa	tcatctttgt	ttacggctca	ttatatccgt	cgacggcg	2460

<210> 13
<211> 8966

<212> DNA
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción recombinante

5 <220>
 <221> característica nueva
 <222> (1177) .. (1177)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 13

gatcctcgaa gagaaggggtt aataacacat tttttaacat ttttaacaca aattttagtt	60
atttaaaaat ttattaaaaa atttaaaata agaagaggaa ctctttaaat aaatctaact	120
tacaaaattt atgattttta ataagttttc accaataaaa aatgtcataa aaatatgtta	180
aaaagtatat tatcaatatt ctctttatga taaataaaaa gaaaaaaaaa ataaaagtta	240
agtgaaaatg agattgaagt gactttaggt gtgtataaat atatcaacc cgccaacaat	300
ttatttaatc caaatatatt gaagtatatt attccatagc ctttatttat ttatatattt	360
attatataaa agctttattt gttctagggt gttcatgaaa tatttttttg gttttatctc	420
cgttgtaaga aaatcatgtg ctttggtgctg ccactcacta ttgcagcttt ttcatgcatt	480
ggtcagattg acggttgatt gtatttttgt tttttatgggt tttgtgttat gacttaagtc	540
ttcatctctt tatctcttca tcaggtttga tggttaccta atatggtcca tgggtacatg	600
catgggtaaa ttaggtggcc aactttgttg tgaacgatag aatttttttt atattaagta	660
aactattttt atattatgaa ataataataa aaaaaatatt ttatcattat taacaaaatc	720
atattagtta atttgttaac tctataataa aagaaatact gtaacattca cattacatgg	780
taacatcttt ccaccctttc atttgttttt tgtttgatga ctttttttct tgtttaaatt	840
tatttccctt cttttaaatt tggaatacat tatcatcata tataaactaa aataactaaa	900
acaggattac acaaagata aataataaca caaatattta taaatctagc tgcaatatat	960
ttaaactagc tatatcgata ttgtaaaata aaactagctg cattgatact gataaaaaaa	1020
tatcatgtgc tttctggact gatgatgcag tatacttttg acattgcctt tattttattt	1080
ttcagaaaag ctttcttagt tctgggttct tcattatttg tttcccatct ccattgtgaa	1140
10 ttgaatcatt tgcttcgtgt cacaaataca atttagntag gtacatgcat tggtcagatt	1200

cacggtttat tatgtcatga ctttaagttca tggtagtaca ttacctgcca cgcattgcatt	1260
atatttggtta gatttgatag gcaaatttg gttgtcaacaa tataaatata aataatgttt	1320
ttatattacg aaataacagt gatcaaaaaca aacagtttta tctttattaa caagattttg	1380
tttttgtttg atgacgtttt ttaatgttta cgctttcccc cttcttttga atttagaaca	1440
ctttatcatc ataaaatcaa atactaaaaa aattacatat ttcataaata ataacacaaa	1500
tatttttaaa aaatctgaaa taataatgaa caatattaca tattatcacg aaaattcatt	1560
aataaaaaata ttatataaat aaaatgtaat agtagttata tgtaggaaaa aagtactgca	1620
cgcataatat atacaaaaag attaaaatga actattataa ataataacac taaattaatg	1680
gtgaatcata tcaaaataat gaaaaagtaa ataaaatttg taattaactt ctatatgtat	1740
tacacacaca aataataaat aatagtaaaa aaaattatga taaatattta ccatctcata	1800
agatatttaa aataatgata aaaatataga ttatttttta tgcaactagc tagccaaaaa	1860
gagaacacgg gtatatataa aaagagtacc tttaaattct actgtacttc ctttattcct	1920
gacgttttta tatcaagtgg acatacgtga agattttaat taccagtcta aatatttcatt	1980
tagcacttaa tacttttctg ttttattcct atcctataag tagtcccgat tctcccaaca	2040
ttgcttattc acacaactaa ctaagaaagt cttccatagc cccccaagcg gccggagctg	2100
gtcatctcgc tcatcgtcga gtcggcggcc ggagctggtc atctcgctca tcgtcgagtc	2160
ggcggccgcc gactcgacga tgagcgagat gaccagctcc ggccgccgac tcgacgatga	2220
gcgagatgac cagctccggc cgcgacacaa gtgtgagagt actaaataaa tgctttgggt	2280
gtacgaaatc attacactaa ataaaataat caaagcttat atatgccttc cgctaaggcc	2340
gaatgcaaag aaattgggtc tttctcggtt tcttttgcca cttttactag tacgtattaa	2400
ttactactta atcatctttg ttacggctc attatatccg tcgacggcgc gccgatcat	2460
ccgatataag ttcctccttt cagcaaaaaa cccctcaaga cccgtttaga ggccccaagg	2520
ggttatgcta gttattgctc agcgggtggc gcagccaact cagcttcctt tcgggctttg	2580
ttagcagccg gatcgatcca agctgtacct cactattcct ttgccctcgg acgagtgtg	2640
gggcgtcggg ttccactatc ggcgagtact tctacacagc catcgggtcca gacggccgcg	2700
cttctgcggg cgatttggtg acgcccgaac gtcccggctc cggatcggac gattgctgcg	2760
catcgaccct gcgccaagc tgcattcatc aaattgccgt caaccaagct ctgatagagt	2820
tgggtcaagc caatgcggag catatacgcc cggagccgcg gcgacccctg aagctccgga	2880
tgccctccgt cgaagtagcg cgtctgctgc tccatacaag ccaaccacgg cctccagaag	2940
aagatgttgg cgacctcgtt ttgggaatcc ccgaacatc cctcgctcca gtcaatgacc	3000
gctgttatgc ggccattgtc cgtcaggaca ttgttgagc cgaaatccgc gtgcacgagg	3060
tgccggactt cggggcagtc ctcggcccaa agcatcagct catcgagagc ctgcgcgacg	3120
gacgcactga cgggtgctgc catcacagtt tgccagtgat acacatgggg atcagcaatc	3180

gcgcatatga aatcacgcca tgtagtgtat tgaccgattc cttgcggtcc gaatgggccc 3240
aaccgcctcg tctggctaag atcggccgca gcgatcgcat ccatagcctc cgcgaccggc 3300
tgcagaacag cgggcagttc ggtttcaggc aggtcttgca acgtgacacc ctgtgcacgg 3360
cgggagatgc aataggtcag gctctcgctg aattcccca tgtcaagcac ttccggaatc 3420
gggagcgcgg ccgatgcaaa gtgccgataa acataacgat cttttagtaa accatcggcg 3480
cagctattta cccgcaggac atatccacgc cctcctacat cgaagctgaa agcacgagat 3540
tcttcgccct ccgagagctg catcaggctg gagacgctgt cgaacttttc gatcagaaac 3600
ttctcgacag acgtcgcggt gagttcaggc ttttccatgg gtatatctcc ttcttaaagt 3660
taaacaaaat tatttctaga gggaaaccgt tgtggtctcc ctatagttag tcgtattaat 3720
ttcgcgggat cgagatctga tcaacctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg 3780
cggtttgctg attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt 3840
tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc 3900
aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 3960
aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa 4020
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgttttc 4080
ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 4140
cgcctttctc ctttcgggaa gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggatatctag 4200
ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga 4260
ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagac acgacttatc 4320
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 4380
agagttcttg aagtgggtgg ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 4440
cgctctgctg aagccagtta ctttcgaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca 4500
aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaa 4560
aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 4620
ctcacgttaa gggatttttg tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc 4680
ctttcgtctc gcgcgttttc gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccggg 4740
gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgctc 4800
agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact 4860
gagagtgcac catatggaca tattgtcgtt agaacgcggc tacaattaat acataacctt 4920
atgtatcata cacatacgat ttaggtgaca ctatagaacg gcgcgccaag cttggatccg 4980
cgccaagctt ggatcctaga actagaaacg tgatgccact tgttattgaa gtcgattaca 5040
gcatctattc tgttttacta ttataactt tgccatttct gacttttgaa aactatctct 5100

ggatttcggt atcgctttgt gaagatcgag caaaagagac gttttgtgga cgcaatggtc 5160
 caaatccgtt ctacatgaac aaattggtca caatttccac taaaagtaaa taaatggcaa 5220
 gttaaaaaag gaatatgcat ttacttgatt gcctaggtga gctccaagag aagttgaatc 5280
 tacacgtcta ccaaccgcta aaaaaagaaa aacattgata tgtaacctga ttccattagc 5340
 ttttgacttc ttcaacagat tctctactta gattttctaac agaaatatta ttactagcac 5400
 atcattttca gtctcactac agcaaaaaat ccaacggcac aatacagaca acaggagata 5460
 tcagactaca gagatagata gatgctactg catgtagtaa gttaaataaa aggaaaataa 5520
 aatgtcttgc taccaaaact actacagact atgatgctca ccacaggcca aatcctgcaa 5580
 ctaggacagc attatcttat atatatgtga caaaacaagc atcaaggaac atttggctca 5640
 ggcaatcagt acctcgttct accatcacc tcagttatca catccttgaa ggatccatta 5700
 ctgggaatca tcggcaacac atgctcctga tggggcacaa tgacatcaag aaggtagggg 5760
 ccaggggtgt ccaacattct ctgaattgcc gctctaagct cttccttctt cgtcactcgc 5820
 gctgccggtg tcccacaagc atcagcaaac ttgagcatgt ttgggaatat ctgctctcg 5880
 ctagacggat ctccaagata ggtgtgagct ctattggact tgtagaacct atcctccaac 5940
 tgaaccacca tacccaaag ctgattgttc aacaacaata tcttaactgg gagattctcc 6000
 actcttatag tggccaactc ctgaacattc atgatgaaac taccatcccc atcaatgtca 6060
 accacaacag ccccgagggt agcaacagca gcaccaatag ccgcaggcaa tccaaaacc 6120
 atggctccaa gacccctga ggtcaaccac tgcctcggtc tcttgactt gtaaaactgc 6180
 gcagcccaca tttgatgctg cccaaccca gtactaaca tagcatctcc attagtcaac 6240
 tcatcaagaa cctcgatagc atgctgcgga gaaatcgcgt cctggaatgt cttgtaacc 6300
 aatggaaact tgtgtttctg cacattaatc tcttctctcc aacctccaag atcaaaacta 6360
 ccctccactc ctttctcctc caaatcata ttaattccct tcaaggccaa cttcaaatcc 6420
 gcgcaaaccg acacgtgctc ctgcttggtc ttccaatct cggcagaatc aatatcaatg 6480
 tgaacaatct tagccctact agcaaaagcc tcaagcttcc cagtaacacg gtcataaac 6540
 cttaccccaa aggcaagcaa caaatcacta ttgtcaacag catagttagc ataaacagta 6600
 ccatgcatac ccagcatctg aagggaatat tcatcaccaa taggaaaagt tccaagacc 6660
 attaaagtgc tagcaacggg aataccagtg agttcaacaa agcgcctcaa ttcagcactg 6720
 gaattcaaac tgccaccgcc gacgtagaga acgggctttt gggcctccat gatgagtctg 6780
 acaatgtgtt ccaattgggc ctggcgggg ggcctgggca gcctggcgag gtaaccggg 6840
 aggttaacgg gctcgtccca attaggcacg gcgagttgct gctgaacgtc tttgggaatg 6900
 tcgatgagga ccggaccggg gcggccggag gtggcgacga agaaagcctc ggcgacgacg 6960
 cgggggatgt cgtcgacgtc gaggatgagg tagttgtgct tcgtgatgga tctgctcacc 7020
 tccacgatcg gggtttcttg gaaggcgtcg gtgccgatca tccggcgggc gacctggccg 7080

gtgatggcga cgactgggac gctgtccatt aaagcgtcgg cgaggccgct cacgaggttg 7140
 gtggcgccgg ggccggaggt ggcaatgcag acgccgggga ggccggagga acgcgcgtag 7200
 ccttcggcgg cgaagacgcc gccctgctcg tggcgcgga gcacgttgcg gatggcggcg 7260
 gagcgcgtga ggccttggtg gatctccatc gacgcaccgc cggggtacgc gaacaccgtc 7320
 gtcacgccct gcctctccag cgctccaca aggatgtccg cgcccttgcg aggttcgccg 7380
 gaggcgaacc gtgacacgaa gggctccgtg gtcggcgctt ccttggtgaa gggcgccgcc 7440
 gtggggggtt tggagatgga acatttgatt ttgagagcgt ggttgggtt ggtgaggtt 7500
 tgatgagaga gaggaggggt ggatctagta atgcgtttgg ggaaggtggg gtgtgaagag 7560
 gaagaagaga atcgggtggt tctggaagcg gtggccgcca ttgtgttggtg tggcatggtt 7620
 atacttcaaa aactgcacaa caagcctaga gttagtacct aaacagtaaa ttacaacag 7680
 agagcaaaga cacatgcaaa aatttcagcc ataaaaaag ttataataga atttaaagca 7740
 aaagtttcat tttttaaca tatatacaaa caaactggat ttgaaggaag ggattaattc 7800
 ccctgctcaa agtttgaatt cctattgtga cctatactcg aataaaattg aagcctaagg 7860
 aatgtatgag aaacaagaaa acaaaacaaa actacagaca aacaagtaca attacaaaat 7920
 tcgctaaaat tctgtaatca ccaaaccaca tctcagtcag cacaaggccc aagggtttatt 7980
 ttgaaataaa aaaaagtga ttttatttct cataagctaa aagaaagaaa ggcaattatg 8040
 aatgatttc gactagatct gaaagtccaa cgcgatttcc gcagatatta aagaaagagt 8100
 agagtttcac atggatccta gatggacca gttgaggaaa aagcaaggca aagcaaacca 8160
 gaagtgaag atccgaaatt gaaccacgga atctaggatt tggtagaggg agaagaaaag 8220
 taccttgaga ggtagaagag aagagaagag cagagagata tatgaacgag tgtgtcttg 8280
 tctcaactct gaagcgatac gagtttagag gggagcattg agttccaatt tatagggaaa 8340
 cggggtggca ggggtgagtt aatgacggaa aagcccctaa gtaacgagat tggattgtgg 8400
 gttagattca accgtttgca tccgcggctt agattgggga agtcagagt aatctcaacc 8460
 gttgactgag ttgaaaattg aatgtagcaa ccaattgagc caacccagc ctttgccctt 8520
 tgattttgat ttgtttgtg catacttttt atttgtcttc tggttctgac tctctttctc 8580
 tcgtttcaat gccagggtgc ctactccac accactcaca agaagattct actgttagta 8640
 ttaaataattt ttaaatgtat taaatgatga atgcttttgt aaacagaaca agactatgtc 8700
 taataagtgt cttgcaacat tttttaagaa attaaaaaaa atatatttat tatcaaaatc 8760
 aatgtatga aaaatcatga ataataaat tttatacatt tttttaaaaa atcttttaat 8820
 ttcttaatta atatcttaaa aataatgatt aatatttaac caaaataat tagtatgatt 8880
 ggtaaggaag atatccatgt tatgtttgga tgtgagtttg atctagagca aagcttacta 8940
 gagtcgaccg atccgtcgac ggcgcg 8966

<210> 14
 <211> 6611
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> construcción recombinante

<220>
 <221> característica nueva
 <222> (4436)..(4436)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 14

cgcgccctatg	cgggaccatc	gcagcggacg	agaagcggca	cgagaacgcg	tactcaagaa	60
tcgtggagaa	gcttctggaa	gtggacccca	ccggggcaat	ggtggccata	gggaacatga	120
tggagaagaa	gatcacgatg	ccggcgcacc	ttatgtacga	tggggatgac	cccaggctat	180
tcgagcacta	ctccgctgtg	gcgcagcgca	taggcgtgta	caccgccaac	gactacgcag	240
acatcttgga	tttctcgttg	acggtgaaga	ttggagaagc	ttgaaggatt	gatgcctgag	300
gggaagcggg	ccccaggatt	tccgtgtgtg	ggttgccccc	gaggattagg	aggttccaag	360
aacgcgctga	tgagcgagcg	cgtaagatga	agaagcatca	tgccgttaag	ttcagttgga	420
ttttcaataa	agaattgctt	ttgtgagcgg	ccgccgactc	gacgatgagc	gagatgacca	480
gctccggccg	ccgactcgac	gatgagcgag	atgaccagct	ccggccgcga	cacaagtgtg	540
agagtactaa	ataaatgctt	tggttgtagc	aaatcattac	actaaataaa	ataatcaaag	600
cttatatatg	ccttccgcta	aggccgaatg	caaagaaatt	ggttctttct	cgttatcttt	660
tgccactttt	actagtacgt	attaattact	acttaatcat	ctttgtttac	ggctcattat	720
atccgtcgac	ggcgcgcccc	atcatccgga	tatagttcct	cctttcagca	aaaaaccctt	780
caagaccctg	ttagaggccc	caaggggtta	tgctagttat	tgctcagcgg	tggcagcagc	840
caactcagct	tcctttcggg	ctttgttagc	agccggatcg	atccaagctg	tacctcacta	900
ttcctttgcc	ctcggacgag	tgctggggcg	tcggtttcca	ctatcggcga	gtacttctac	960
acagccatcg	gtccagacgg	ccgcgcttct	gcgggcgatt	tgtgtacgcc	cgacagtccc	1020
ggctccggat	cggacgattg	cgtcgcatcg	accctgcgcc	caagctgcat	catcgaaatt	1080
gccgtcaacc	aagctctgat	agagttggtc	aagaccaatg	cggagcatat	acgcccggag	1140
ccgcggcgat	cctgcaagct	ccggatgcct	ccgctcgaag	tagcgcgtct	gctgctccat	1200
acaagccaac	cacggcctcc	agaagaagat	gttggcgacc	tcgtattggg	aatccccgaa	1260
catcgcctcg	ctccagtcaa	tgaccgctgt	tatgcggcca	ttgtccgtca	ggacattgtt	1320
ggagccgaaa	tccgcgtgca	cgaggtgccg	gacttcgggg	cagtcctcgg	cccaaagcat	1380
cagctcatcg	agagcctgcg	cgacggacgc	actgacggtg	tcgtccatca	cagtttgcca	1440
gtgatacaca	tggggatcag	caatcgcgca	tatgaaatca	cgccatgtag	tgtattgacc	1500

gattccttgc	ggtccgaatg	ggccgaaccc	gctcgtctgg	ctaagatcgg	ccgcagcgat	1560
cgcatccata	gcctccgcga	ccggctgcag	aacagcgggc	agttcggttt	caggcaggtc	1620
ttgcaacgtg	acaccctgtg	cacggcgggg	gatgcaatag	gtcaggctct	cgctgaattc	1680
cccaatgtca	agcacttccg	gaatcgggag	cgcgccgat	gcaaagtgcc	gataaacata	1740
acgatctttg	tagaaacat	cggcgcagct	atttaccgc	aggacatatc	cacgccctcc	1800
tacatcgaag	ctgaaagcac	gagattcttc	gccctccgag	agctgcatca	ggtcggagac	1860
gctgtcgaac	ttttcgatca	gaaacttttc	gacagacgtc	gcggtgagtt	caggcttttc	1920
catgggtata	tctccttctt	aaagttaaac	aaaattatct	ctagagggaa	accgttgtgg	1980
tctccctata	gtgagtcgta	ttaatttcgc	gggatcgaga	tctgatcaac	ctgcattaat	2040
gaatcggcca	acgcgcgggg	agaggcggtt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttcctcgc	2100
tcactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	2160
cggtaatacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	2220
gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	2280
gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aacccgacag	2340
gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtagcgtct	cctgttccga	2400
ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	2460
aatgctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	2520
tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaaccgt	gcgccttatc	cggtaactat	cgctctgagt	2580
ccaacccggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	2640
gagcgaggta	tgtaggcggg	gtacagaggt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	2700
ctagaaggac	agtattttgg	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	2760
ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cgggtggtttt	tttgtttgca	2820
agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	2880
ggtctgacgc	tcagtgggaac	gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	acattaacct	2940
ataaaaatag	gcgtatcacg	aggccctttc	gtctcgcgcg	tttcggtgat	gacggtgaaa	3000
acctctgaca	catgcagctc	ccggagacgg	tcacagcttg	tctgtaaagc	gatgccggga	3060
gcagacaagc	ccgtcagggc	gcgtcagcgg	gtgttggcgg	gtgtcggggc	tggcttaact	3120
atgcggcatc	agagcagatt	gtactgagag	tgcaccatat	ggacatattg	tcgttagaac	3180
gcggctacaa	ttaatacata	accttatgta	tcatacacat	acgatttagg	tgacactata	3240
gaacggcgcg	ccaagcttgg	atcctcgaag	agaaggggta	ataacacatt	ttttaacatt	3300
tttaacacaa	attttagtta	tttaaaaatt	tattaaaaaa	tttaaaataa	gaagaggaac	3360
tctttaaata	aatctaactt	acaaaattta	tgatttttaa	taagttttca	ccaataaaaa	3420

atgtcataaa aatatgttaa aaagtatatt atcaatattc tctttatgat aaataaaaag	3480
aaaaaaaaa taaaagttaa gtgaaaatga gattgaagtg acttttaggtg tgtataaata	3540
tatcaacccc gccaacaatt tatttaatcc aaatatattg aagtatatta ttccatagcc	3600
tttattttatt tatatatatta ttatataaaa gctttatttg ttctaggttg ttcataaat	3660
atTTTTTTgg ttttatctcc gttgtaagaa aatcatgtgc tttgtgtcgc cactcactat	3720
tgcagctttt tcatgcattg gtcagattga cggttgattg ttttttggtt ttttatggtt	3780
ttgtgttatg acttaagtct tcatctcttt atctcttcat caggtttgat ggttacctaa	3840
tatggtccat gggatcatgc atggttaaata taggtggcca actttgttgt gaacgataga	3900
atTTTTTTta tattaagtaa actatTTTTa tattatgaaa taataataaa aaaaatattt	3960
tatcattatt aacaaaatca tattagttaa tttgttaact ctataataaa agaaatactg	4020
taacattcac attacatggg aacatctttc caccctttca tttgtttttt gtttgatgac	4080
tttttttctt gtttaaattt atttcccttc ttttaaattt ggaatacatt atcatcatat	4140
ataaactaaa atactaaaaa caggattaca caaatgataa ataataacac aaatatttat	4200
aaatctagct gcaatatatt taaactagct atatcgatat tgtaaaataa aactagctgc	4260
attgatactg ataaaaaaat atcatgtgct ttctggactg atgatgcagt atacttttga	4320
cattgccttt attttatttt tcagaaaagc tttcttagtt ctgggttctt cattatttgt	4380
ttcccatctc cattgtgaat tgaatcattt gcttcgtgtc acaaatacaa tttagntagg	4440
tacatgcatt ggtcagattc acggtttatt atgtcatgac ttaagttcat ggtagtacat	4500
tacctgccac gcatgcatta tattgggttag atttgatagg caaatTTTggT tgtcaacaat	4560
ataaatataa ataattgtttt tatattacga aataacagtg atcaaaaaca acagttttat	4620
ctttattaac aagattttgt ttttgtttga tgacgttttt taatgtttac gctttcccc	4680
ttcttttgaa tttagaacac tttatcatca taaaatcaaa tactaaaaaa attacatatt	4740
tcataaataa taacacaaat atttttaaaa aatctgaaat aataatgaac aatattacat	4800
attatcacga aaattcatta ataaaaatat tatataaata aaatgtaata gtagttatat	4860
gtaggaaaaa agtactgcac gcataatata tacaaaaaga ttaaaatgaa ctattataaa	4920
taataacact aaattaatgg tgaatcatat caaaataatg aaaaagtaaa taaaatttgt	4980
aattaacttc tatatgtatt acacacacaa ataataaata atagtaaaaa aaattatgat	5040
aaatatttac catctcataa gatattttaa ataataataa aaatatagat tttttttat	5100
gcaactagct agccaaaaag agaacacggg tatatataaa aagagtacct ttaaattcta	5160
ctgtacttcc tttattcctg acgtttttat atcaagtgga catacgtgaa gatTTTaatt	5220
atcagtctaa atatttcatt agcacttaat acttttctgt tttattccta tcctataagt	5280
agtcccgatt ctccaacat tgcttattca cacaactaac taagaaagtc ttccatagcc	5340
ccccaagcgg ccggagctgg tcatctcgct catcgtcgag tcggcggccg gagctggtca	5400

tctcgctcat cgtcgagtcg gcggccgctg agtgattgct cacgagtgtg gtcaccatgc 5460
cttcagcaag taccaatggg ttgatgatgt tgtggggttg acccttcact caacactttt 5520
agtcccttat ttctcatgga aaataagcca tcgccgccat cactccaaca cagggttcctt 5580
tgaccgtgat gaagtgtttg tcccaaaacc aaaatccaaa gttgcatggt tttccaagta 5640
cttaaacaac cctctaggaa gggctgtttc tcttctcgtc aacttcacaa taggggtggc 5700
tatgtattta gccttcaatg tctctggtag accctatgat agttttgcaa gccactacca 5760
cccttatgct cccatatatt ctaaccgtga gaggccttctg atctatgtct ctgatgttgc 5820
tttgttttct gtgacttact ctctctaccg tgttgcaacc ctgaaagggt tggtttggt 5880
gctatgtgtt tatgggggtgc ctttgctcat tgtgaacggg tttcttgtga ctatcacata 5940
tttgagcac acacactttg ccttgccctca ttacgattca tcagaatggg actggctgaa 6000
gggagctttg gcaactatgg acagagatta agcggccgca tgcctccaga aaagaaagaa 6060
attttcaagt ccttgagggg atgggcctcg gagtgggtcc taccgtgct gaagcccgtg 6120
gagcaatgct ggcagccaca aaacttcctc cctgaccctt cccttcgca tgaagagttc 6180
agccatcagg tgaaggagct tcgcgaacgc actaaagagt tacctgatga gtactttgtg 6240
gtgctggtgg gtgatatggt caccgaggac gcgcttccca cttaccagac catgatcaac 6300
aaccttgatg gagtgaaaga tgacagcggc acgagcccga gcccgtgggc cgtgtggacc 6360
cgggcctgga ccgccgagga aaacagacac ggggatctgc tcagaactta tttgtatctc 6420
tctgggaggg ttgacatggc taaggctcaa aagaccgtac attacctcat ttcagctggc 6480
atggaccctg ggacagacaa caaccatatt ttgggggttg tgtacacgtc attccaagag 6540
cgagcaacat ttgtggcgca cgggaacacg gctcggctcg cgaaggaggg cggggatcca 6600
gtgctggcgc g 6611

<210> 15
<211> 4097
<212> DNA
5 <213> secuencia artificial

<220>
<223> construcción recombinante

<220>
10 <221> característica nueva
<222> (1190)..(1190)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 15

cgcgccaagc ttggatcctc gaagagaagg gttaataaca ctttttttaa cttttttaac 60
acaaatttta gttattttaa aatttattaa aaaattttaa ataagaagag gaactcttta 120
aataaatcta acttacaaaa tttatgattt ttaataagtt ttcaccaata aaaaatgtca 180
taaaaatatg ttaaaaagta tattatcaat attctcttta tgataaataa aaagaaaaaa 240

aaaataaaaag ttaagtgaag atgagattga agtgacttta ggtgtgtata aatatatcaa	300
ccccgccaac aattttattta atccaaatat attgaagtat attattccat agcctttatt	360
tatttatata ttattatat aaaagcttta ttgtttctag gttgttcacg aaatattttt	420
ttggttttat ctccgttgta agaaaatcat gtgctttgtg tcgccactca ctattgcagc	480
tttttcacgc attggtcaga ttgacgggtg attgtatttt tgttttttat ggttttgtgt	540
tatgacttaa gtcttcacat ctttatctct tcatcagggt tgatggttac ctaatatggt	600
ccatgggtac atgcatgggt aaattagggt gccaaacttg ttgtgaacga tagaattttt	660
tttatattaa gtaaactatt ttatatattat gaaataataa taaaaaaaat attttatcat	720
tattaacaaa atcatattag ttaatttggt aactctataa taaaagaaat actgtaacat	780
tcacattaca tggtaacatc ttccaccct ttcatttggt tttgtttga tgactttttt	840
tcttgtttaa atttatttcc cttcttttaa atttggaata cattatcatc atatataaac	900
taaaatacta aaaacaggat tacacaaatg ataaataata acacaaatat ttataaatct	960
agctgcaata tttttaaact agctatatcg atattgtaaa ataaaactag ctgcattgat	1020
actgataaaa aaatatcatg tgctttctgg actgatgatg cagtatactt ttgacattgc	1080
ctttatttta tttttcagaa aagctttctt agttctgggt tcttcattat ttgtttccca	1140
tctccattgt gaattgaatc atttgcttcg tgtcacaaat acaatttagt taggtacatg	1200
cattggtcag attcacggtt tattatgtca tgacttaagt tcatggtagt acattacctg	1260
ccacgcacgc atttatattg ttagatttga taggcaaatt tggttgtcaa caatataaat	1320
ataaataatg tttttatatt acgaaataac agtgatcaaa acaaacagtt ttatctttat	1380
taacaagatt ttgtttttgt ttgatgacgt tttttaatgt ttacgctttc ccccttcttt	1440
tgaatttaga acactttatc atcataaaat caaatactaa aaaaattaca tatttcataa	1500
ataataacac aaatattttt aaaaaatctg aaataataat gaacaatatt acatattatc	1560
acgaaaattc atttaataaaa atattatata aataaaatgt aatagtagtt atatgtagga	1620
aaaaagtact gcacgcataa tatatacaaa aagattaaaa tgaactatta taaataataa	1680
cactaaatta atggtgaatc atatcaaaat aatgaaaaag taaataaaat ttgtaattaa	1740
cttctatatg tattacacac acaataata aataatagta aaaaaatta tgataaatat	1800
ttaccatctc ataagatatt taaaataatg ataaaaatat agattatttt ttatgcaact	1860
agctagccaa aaagagaaca cgggtatata taaaaagagt acctttaaat tctactgtac	1920
ttcctttatt cctgacgttt ttatatcaag tggacatacg tgaagatttt aattatcagt	1980
ctaaatattt cattagcact taatactttt ctgttttatt cctatcctat aagtagtccc	2040
gattctccca acattgctta ttcacacaac taactaagaa agtcttccat agcccccaa	2100
gcggccggag ctggtcatct cgctcatcgt cgagtcggcg gccggagctg gtcattctcg	2160

tcacgctcga gtcggcgcc gctgagtgat tgctcacgag tgggtcacc atgccttcag 2220
caagtaccaa tgggttgatg atgttggtggg tttagaccctt cactcaacac ttttagtccc 2280
ttattttctca tggaaaataa gccatcgccg ccatcactcc aacacagggtt cccttgaccg 2340
tgatgaagtg tttgtcccaa aacaaaaatc caaagttgca tggttttcca agtacttaaa 2400
caaccctcta ggaagggtg tttctcttct cgtcacactc acaatagggtt ggcctatgta 2460
tttagccttc aatgtctctg gtagacccta tgatagtttt gcaagccact accaccctta 2520
tgctcccata tattctaacc gtgagaggct tctgatctat gtctctgatg ttgctttgtt 2580
ttctgtgact tactctctct accgtgttgc aaccctgaaa ggggttggtt ggctgctatg 2640
tgtttatggg gtgcctttgc tcattgtgaa cggttttctt gtgactatca catatttgca 2700
gcacacacac tttgccttgc ctcattacga ttcacagaa tgggactggc tgaagggagc 2760
tttggaact atggacagag attaagcggc cgcacgctc cagaaaagaa agaaattttc 2820
aagtccttgg agggatgggc ctcggagtgg gtcctaccgc tgctgaagcc cgtggagcaa 2880
tgctggcagc cacaaaactt cctccctgac ccctccctc cgcacgaaga gttcagccat 2940
cagggtgaagg agcttcgca acgactaaa gagttacctg atgagtactt tgggtgctg 3000
gtgggtgata tggtcaccga ggacgcgctt cccacttacc agaccatgat caacaacctt 3060
gatggagtga aagatgacag cggcacgagc ccgagcccgt gggccgtgtg gacccgggccc 3120
tggaccgccg aggaaaacag acacggggat ctgctcagaa cttatttgta tctctctggg 3180
aggggttgaca tggctaaggt cgaaaagacc gtacattacc tcatttcagc tggcatggac 3240
cctgggacag acaacaacct atatttgggg tttgtgtaca cgctattcca agagcgagca 3300
acatttggtg cgacgggaa cacggctcgg ctcgcaagg agggcgggga tccagtgtg 3360
gcgcgcgcgc ctatgcggga ccatcgagc ggacgagaag cggcacgaga acgcgtactc 3420
aagaatcgtg gagaagcttc tggaaagtga cccaccggg gcaatggtg ccatagggaa 3480
catgatggag aagaagatca cgatgccggc gcaccttatg tacgatggg atgaccccag 3540
gctattcgag cactactccg ctgtggcgca gcgcacagg gtgtacacc ccaacgacta 3600
cgcagacatc ttggatttct cggtgacggg gaagattgga gaagcttgaa ggattgatgc 3660
ctgaggggaa gcgggcccc ggatttccgt gtgtgggttg ccccgagga ttaggaggtt 3720
ccaagaacgc gctgatgagc gagcgcgtaa gatgaagaag catcatgcc ttaagttcag 3780
ttggattttc aataaagaat tgcttttggt agcggccgcc gactcgacga tgagcgagat 3840
gaccagctcc ggccgccgac tcgacgatga gcgagatgac cagctccggc cgcgacacaa 3900
gtgtgagagt actaaataaa tgctttgggt gtacgaaatc attacactaa ataaaataat 3960
caaagcttat atatgccttc cgctaaggcc gaatgcaaag aaattggtt tttctcgta 4020
tcttttgcca cttttactag tacgtattaa ttactactta atcatcttg tttacggctc 4080
attatatccg tcgacgg 4097

<210> 16
<211> 3964
<212> DNA
5 <213> secuencia artificial

<220>
<223> construcción recombinante

<400> 16

ggtcgactct agtaagcttt gctctagatc aaactcacat ccaaacataa catggatatc	60
ttccttacca atcatactaa ttattttggg ttaaataatta atcattatctt ttaagatatt	120
aattaagaaa ttaaaagatt ttttaaaaaa atgtataaaa ttatattatt catgattttt	180
catacatctg attttgataa taaatatatt ttttttaatt tcttaaaaaa tgttgcaaga	240
cacttattag acatagtctt gttctgttta caaaagcatt catcatttaa tacattaaaa	300
aatatttaat actaacagta gaatcttctt gtgagtgggtg tgggagtagg caacctggca	360
ttgaaacgag agaaagagag tcagaaccag aagacaaata aaaagtatgc aacaacaaaa	420
tcaaaatcaa agggcaaagg ctgggggttg ctcaattggt tgctacattc aattttcaac	480
tcagtcaacg gttgagattc actctgactt ccccaatcta agccgcggat gcaaacgggt	540
gaatctaacc cacaatccaa tctcgttact taggggcttt tccgtcatta actcaccctt	600
gccacccggt tcccctataa attggaactc aatgctcccc tctaaactcg tatcgcttca	660
gagttgagac caagacacac tcgttcatat atctctctgc tcttctcttc tcttctacct	720
ctcaagggtac ttttcttctc cctctaccaa atcctagatt ccgtgggttca atttcggatc	780
ttgcacttct gggttgcttt gccttgcttt ttcctcaact ggggtccatct aggatccatg	840
tgaactcta ctctttcttt aatatctgcg gaatacgcgt tggactttca gatctagtcg	900
aatcattttc ataattgcct tcttttcttt tagcttatga gaaataaaat cacttttttt	960
ttatttcaaa ataaaccttg ggccctgtgc tgactgagat ggggtttggt gattacagaa	1020
ttttagcgaa ttttgtaatt gtacttgttt gtctgtagtt ttgtttgtt ttcttgtttc	1080
tcatacatc cttaggcttc aattttattc gagtataggt cacaatagga attcaaactt	1140
tgagcagggg aattaatccc ttccttcaaa tccagtttgt ttgtatatat gtttaaaaaa	1200
tgaactttt gctttaaatt ctattataac ttttttatg gctgaaattt ttgcatgtgt	1260
ctttgtctc tgttgtaaatt ttactgttta ggtactaact ctaggcttgt tgtgcagttt	1320
ttgaagtata accatgccac acaacacaat ggcggccacc gcttccagaa ccacccgatt	1380
ctcttcttcc tcttcacacc ccaccttccc caaacgcatt actagatcca ccctccctct	1440
ctctcatcaa accctcacca aaccaacca cgctctcaaa atcaaagtgt ccatctcaa	1500
acccccacg gcggcgccct tcaccaagga agcgccgacc acggagccct tcgtgtcacg	1560
gttcgcctcc ggcgaacctc gcaagggcgc ggacatcctt gtggaggcgc tggagaggca	1620

gggcgtgacg acggtgttcg cgtacccccg cggtgcgtcg atggagatcc accagggcgt 1680
 cacgcgctcc gccgccatcc gcaacgtgct cccgcgccac gagcagggcg gcgtcttcgc 1740
 cgccgaaggc tacgcgcgtt cctccggcct ccccggcgtc tgcatcgcca cctccggccc 1800
 cggcgccacc aacctcgtga gcggcctcgc cgacgcttta atggacagcg tcccagtcgt 1860
 cgccatcacc ggccaggctc cccgccggat gatcggcacc gacgccttcc aagaaacccc 1920
 gatcgtggag gtgagcagat ccatacagaa gcacaactac ctcatcctcg acgtcgacga 1980
 catccccgc gtcgtcgccg aggttttctt cgtcgccacc tccggccgcc ccggtccggt 2040
 cctcatcgac attcccaaag acgttcagca gcaactcgcc gtgcctaatt gggacgagcc 2100
 cgtaacctc cccggttacc tcgccaggct gcccgagccc cccgccgagg cccaattgga 2160
 acacattgtc agactcatca tggaggccca aaagcccgtt ctctacgtcg gcggtggcag 2220
 tttgaattcc agtgctgaat tgaggcgctt tgttgaaact actggtattc ccgttgctag 2280
 cactttaatg ggtcttgga cttttcctat tggatgaa tattcccttc agatgctggg 2340
 tatgcatggt actgtttatg ctaactatgc tgttgacaat agtgatttgt tgcttcctt 2400
 tggggaagg tttgatgacc gtgttactgg gaagcttgag gcttttgcta gtagggctaa 2460
 gattgttcac attgatattg attctgccga gattgggaag aacaagcagg cgacgtgtc 2520
 ggtttgcgcg gatttgaagt tggccttgaa ggaattaat atgattttgg aggagaaagg 2580
 agtggagggg aagtttgatc ttggagggtg gagagaagag attaattgtc agaaacacaa 2640
 gtttccattg gggtacaaga cattccagga cgcgatttct ccgcagcatg ctatcgaggt 2700
 tcttgatgag ttgactaatg gagatgctat tgttagtact ggggttgggc agcatcaa 2760
 gtgggctgcg cagttttaca agtacaagag accgaggcag tggttgacct cagggggtct 2820
 tggagccatg ggttttggat tgcctgcggc tattggtgct gctgttgcta accctggggc 2880
 tgttggtggt gacattgatg gggatggtag tttcatcatg aatgttcagg agttggccac 2940
 tataagagtg gagaatctcc cagttaagat attgttgttg aacaatcagc atttggttat 3000
 ggtggttcag ttggaggata ggttctacaa gtccaataga gctcacacct atcttgaga 3060
 tccgtctagc gagagcgaga tattcccaa catgctcaag tttgctgatg cttgtgggat 3120
 accggcagcg cgagtgcga agaaggaaga gcttagagcg gcaattcaga gaatgttgga 3180
 caccctggc ccctacctt ttgatgtcat tgtgccccat caggagcatg tgttgccgat 3240
 gattcccagt aatggatcct tcaaggatgt gataactgag ggtgatggta gaacaggta 3300
 ctgattgcct agaccaaag ttccttgatg cttgttttgt acaatatata taagataatg 3360
 ctgtcctagt tgcaggattt ggcctgtggt gagcatcata gtctgtagta gttttggtag 3420
 caagacattt tattttcctt ttatttaact tactacatgc agtagcatct atctatctct 3480
 gtagtctgat atctcctgtt gtctgtattg tgccgttgga ttttttgctg tagtgagact 3540
 gaaaatgatg tgctagtaat aatatttctg ttagaaatct aagtagagaa tctgttgaag 3600

aagtcaaaag ctaatggaat caggttacat atcaatgttt ttcttttttt agcggttggt 3660
 agacgtgtag attcaacttc tcttgagct cacctaggca atcagtaaaa tgcattttcc 3720
 ttttttaact tgccatttat ttacttttag tggaaattgt gaccaatttg ttcattgtaga 3780
 acggatttgg accattgcgt ccacaaaacg tctcttttgc tcgatcttca caaagcgata 3840
 ccgaaatcca gagatagttt tcaaaagtca gaaatggcaa agttataaat agtaaaacag 3900
 aatagatgct gtaatcgact tcaataacaa gtggcatcac gtttctagtt ctagaccggg 3960
 gtac 3964

<210> 17

<211> 656

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 17

Met Pro His Asn Thr Met Ala Ala Thr Ala Ser Arg Thr Thr Arg Phe
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser Ser His Pro Thr Phe Pro Lys Arg Ile Thr Arg Ser
 20 25 30

Thr Leu Pro Leu Ser His Gln Thr Leu Thr Lys Pro Asn His Ala Leu
 35 40 45

Lys Ile Lys Cys Ser Ile Ser Lys Pro Pro Thr Ala Ala Pro Phe Thr
 50 55 60

Lys Glu Ala Pro Thr Thr Glu Pro Phe Val Ser Arg Phe Ala Ser Gly
 65 70 75 80

Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg Gln
 85 90 95

Gly Val Thr Thr Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile
 100 105 110

His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Ala Ala Ile Arg Asn Val Leu Pro Arg
 115 120 125

His Glu Gln Gly Gly Val Phe Ala Ala Glu Gly Tyr Ala Arg Ser Ser
 130 135 140

Gly Leu Pro Gly Val Cys Ile Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr Asn
 145 150 155 160

ES 2 586 456 T3

Leu Val Ser Gly Leu Ala Asp Ala Leu Met Asp Ser Val Pro Val Val
 165 170 175
 Ala Ile Thr Gly Gln Val Ala Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala Phe
 180 185 190
 Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Ser Arg Ser Ile Thr Lys His Asn
 195 200 205
 Tyr Leu Ile Leu Asp Val Asp Asp Ile Pro Arg Val Val Ala Glu Ala
 210 215 220
 Phe Phe Val Ala Thr Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile
 225 230 235 240
 Pro Lys Asp Val Gln Gln Gln Leu Ala Val Pro Asn Trp Asp Glu Pro
 245 250 255
 Val Asn Leu Pro Gly Tyr Leu Ala Arg Leu Pro Arg Pro Pro Ala Glu
 260 265 270
 Ala Gln Leu Glu His Ile Val Arg Leu Ile Met Glu Ala Gln Lys Pro
 275 280 285
 Val Leu Tyr Val Gly Gly Gly Ser Leu Asn Ser Ser Ala Glu Leu Arg
 290 295 300
 Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Ala Ser Thr Leu Met Gly
 305 310 315 320
 Leu Gly Thr Phe Pro Ile Gly Asp Glu Tyr Ser Leu Gln Met Leu Gly
 325 330 335
 Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Asn Ser Asp Leu
 340 345 350
 Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys Leu
 355 360 365
 Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp Ser
 370 375 380
 Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Ala His Val Ser Val Cys Ala Asp
 385 390 395 400
 Leu Lys Leu Ala Leu Lys Gly Ile Asn Met Ile Leu Glu Glu Lys Gly
 405 410 415

Val Glu Gly Lys Phe Asp Leu Gly Gly Trp Arg Glu Glu Ile Asn Val
 420 425 430
 Gln Lys His Lys Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe Gln Asp Ala Ile
 435 440 445
 Ser Pro Gln His Ala Ile Glu Val Leu Asp Glu Leu Thr Asn Gly Asp
 450 455 460
 Ala Ile Val Ser Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala Gln
 465 470 475 480
 Phe Tyr Lys Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Thr Ser Gly Gly Leu
 485 490 495
 Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ile Gly Ala Ala Val Ala
 500 505 510
 Asn Pro Gly Ala Val Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe Ile
 515 520 525
 Met Asn Val Gln Glu Leu Ala Thr Ile Arg Val Glu Asn Leu Pro Val
 530 535 540
 Lys Ile Leu Leu Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln Leu
 545 550 555 560
 Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ser Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly Asp
 565 570 575
 Pro Ser Ser Glu Ser Glu Ile Phe Pro Asn Met Leu Lys Phe Ala Asp
 580 585 590
 Ala Cys Gly Ile Pro Ala Ala Arg Val Thr Lys Lys Glu Glu Leu Arg
 595 600 605
 Ala Ala Ile Gln Arg Met Leu Asp Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Asp
 610 615 620
 Val Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser Asn
 625 630 635 640
 Gly Ser Phe Lys Asp Val Ile Thr Glu Gly Asp Gly Arg Thr Arg Tyr
 645 650 655

<210> 18
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> construcción sintética
 <400> 18

Gly Gln Val Pro
 1

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <221> característica nueva
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce de forma natural
 5 <400> 19
 Gly Met Val Xaa Gln Trp Glu Asp Arg Phe
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 20
 Met Pro His Asn Thr
 1 5
 15 <210> 21
 <211> 6547
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 <220>
 20 <223> construcción recombinante
 <220>
 <221> característica nueva
 <222> (4842)..(4842)
 <223> n es a, c, g, o t
 25 <220>
 <221> característica nueva
 <222> (5088)..(5088)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 21
 gggcgaattg ggttacccgg accggaattc gggatctgag tctagaaatc cgtcaacatg 60
 30 gtggagcacg acactctcgt ctactccaag aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa 120

agggctattg agacttttca acaaagggtg atatcgggaa acctcctcgg attccattgc	180
ccagctatct gtcacttcat caaaaggaca gtagaaaagg aaggtggcac ctacaaatgc	240
catcattgcg ataaaggaaa ggctatcggt caagatgcct ctgccgacag tgggtcccaa	300
gatggacccc caccacgag gagcatcggt gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca	360
aagcaagtgg attgatgtga tgatcctatg cgtatggtat gacgtgtgtt caagatgatg	420
acttcaaacc tacctatgac gtatggtatg aacgtgtgtc gactgatgac ttagatccac	480
tcgagcgggt ataaatacgt acctacgcac cctgcgctac catccctaga gctgcagctt	540
atttttacaa caattaccaa caacaacaaa caacaaacaa cattacaatt actatttaca	600
attacagtgc acccgtaccc acacaacaca atggcggcca ccgcttccag aaccacccga	660
ttctcttctt cctcttcaca cccaccttc cccaaacgca ttactagatc caccctcctt	720
ctctctcatc aaaccctcac caaacccaac cacgtcttca aaatcaaatt ttccatctcc	780
aaacccccca cggcggcgcc cttaccaag gaagcgccga ccacggagcc cttcgtgtca	840
cggttcgcct cggcggaacc tcgcaagggt gcggacatcc ttgtggaggc gctggagagg	900
cagggcggtga cgacggtgtt cgcgtaaccc ggcggtgcgt cgatggagat ccaccaggcg	960
ctcacgcgct ccgccgccat ccgcaacgtg ctcccgcgcc acgagcaggg cggcgtcttc	1020
gccgccgaag gctacgcgcg ttcctccggc ctcccggcg tctgcattgc cacctccggc	1080
cccggcgcca ccaacctcgt gagcggcctc gccgacgctt taatggacag cgtcccagtc	1140
gtcgccatca ccggccaggt cgcccgccgg atgatcggca ccgacgcctt ccaagaaacc	1200
ccgatcgtgg aggtgagcag atccatcacg aagcacaact acctcatcct cgacgtcgac	1260
gacatcccc gcgtcgtcgc cgaggctttt ttcgtcgcca cctccggccg ccccggtccg	1320
gtcctcatcg acattcccaa agacgttcag cagcaactcg ccgtgcctaa ttgggacgag	1380
cccgtaacc tccccggtta cctcgccagg ctgccaggc ccccgccga ggcccaattg	1440
gaacacattg tcagactcat catggaggcc caaaagcccg ttctctacgt cggcgggtggc	1500
agtttgaatt ccagtgtga attgaggcgc tttgttgaac tcttggtat tcccgttgct	1560
agcactttaa tgggtcttgg aacttttcct attggtgatg aatattccct tcagatgctg	1620
ggtatgcatg gtactgttta tgctaactat gctgttgaca atagtgattt gttgcttgcc	1680
tttggggtaa ggtttgatga ccgtgttact ggggaagcttg aggcttttgc tagtagggct	1740
aagattgttc acattgatat tgattctgcc gagattggga agaacaagca ggcgcacgtg	1800
tcggtttgcg cggatttgaa gttggccttg aagggaatta atatgatttt ggaggagaa	1860
ggagtggagg gtaagtttga tcttgagggt tggagagaag agattaatgt gcagaaacac	1920
aagtttccat tgggttacaa gacattccag gacgcgattt ctccgcagca tgctatcgag	1980
gttcttgatg agttgactaa tggagatgct attgttagta ctgggggttg gcagcatcaa	2040

atgtgggctg	cgagttttta	caagtacaag	agaccgaggc	agtgggtgac	ctcagggggt	2100
cttgagacca	tgggtttttg	attgcctgcg	gctattggtg	ctgctgttgc	taaccctggg	2160
gctgtttgtg	ttgacattga	tggggatggt	agtttcatca	tgaatgttca	ggagttggcc	2220
actataagag	tggagaatct	cccagttaag	atattgttgt	tgaacaatca	gcatttgggg	2280
atggtgggtc	agttggagga	taggttctac	aagtccaata	gagctcacac	ctatcttggg	2340
gatccgtcta	gcgagagcga	gatattccca	aacatgctca	agtttgctga	tgcttgtggg	2400
ataccggcag	cgcgagtgcg	gaagaaggaa	gagcttagag	cggcaattca	gagaatgttg	2460
gacaccctg	gcccctacct	tcttgatgtc	attgtgcccc	atcaggagca	tgtgttgccg	2520
atgattccca	gtaatggatc	cttcaaggat	gtgataactg	agggatgatg	tagaacgagg	2580
tactgattgc	ctagaccaa	tggtccttga	tgcttgtttt	gtacaatata	tataagataa	2640
tgctgtccta	gttgaggat	ttggcctgtg	gtgagcatca	tagtctgtag	tagttttggt	2700
agcaagacat	tttattttcc	ttttatttaa	cttactacat	gcagtagcat	ctatctatct	2760
ctgtagtctg	atatctcctg	ttgtctgtat	tgtgccgttg	gattttttgc	tgtagtgaga	2820
ctgaaaatga	tgtgctagta	ataatatttc	tgtagaaat	ctaagtagag	aatctgttga	2880
agaagtcaaa	agctaattga	atcagggtac	atatcaatgt	ttttcttttt	ttagcggttg	2940
gtagacgtgt	agattcaact	tctcttgag	ctcacctagg	caatcagtaa	aatgcatatt	3000
ccttttttaa	cttgccattt	atttactttt	agtggaaatt	gtgaccaatt	tgttcatgta	3060
gaacggattt	ggaccattgc	gtccacaaaa	cgctcttttt	gctcgatctt	cacaaagcga	3120
taccgaaatc	cagagatagt	tttcaaaagt	cagaaatggc	aaagttataa	atagtaaaac	3180
agaatagatg	ctgtaatcga	cttcaataac	aagtggcatc	acgtttctag	ttctagaccc	3240
gggtctagag	tcgacctgca	ggcatgccc	cggatatcga	tgggccccgg	ccgaagcttc	3300
gggtccgggtc	acccagcttg	agtattctat	agtgtcacct	aaatagcttg	gcgtaatcat	3360
gggtcatagct	gtttcctgtg	tgaaattgtt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	3420
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaattgagt	gagctaactc	acattaattg	3480
cgttgcgctc	actgcccgtc	ttccagtcgg	gaaacctgtc	gtgccagctg	cattaatgaa	3540
tcggccaacg	cgcggggaga	ggcggtttgc	gtattgggcg	ctcttccgct	tcctcgctca	3600
ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggg	atcagctcac	tcaaaggcgg	3660
taatacggtt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	3720
agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgctggc	gtttttcgat	aggctccgcc	3780
cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	3840
tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	3900
tgccgccttac	cggatacctg	tccgcctttc	tcccttcggg	aagcggtggc	ctttctcata	3960
gctcacgctg	taggtatctc	agttcggtgt	aggtcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	4020

acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca 4080
 acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 4140
 cgaggatatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta 4200
 gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 4260
 gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc 4320
 agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 4380
 ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggcatggag ccacgttggtg 4440
 tctcaaatc tctgatgtta cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg aacaataaaa 4500
 ctgtctgctt acataaacag taatacaagg ggtgttatga gccatattca acgggaaacg 4560
 tcttgctcga ggccgcgatt aaattccaac atggatgctg atttatatgc ctataaatgg 4620
 gctcgcgata atgtcggcca atcaggtccg acaatctatc gattgtatgg gaagcccgat 4680
 gcgccagact tgtttctgaa acatggcaaa ggtagccttg ccaatgatgt tacagatgag 4740
 atggtcagac taaactgcct gacggaattt atgcctcttc cgaccatcaa gcattttatc 4800
 cgtactcctg atgatgcatg gttactcacc actgcgatcc cngggaaaac agcattccag 4860
 gtattagaag aatatcctga ttcaggtgaa aatattgttg atgcgctggc agtggtcctg 4920
 cgccggttgc attcgattcc tctttgtaat tgtcctttta acagcgatcg cgtatttcgt 4980
 ctcgctcagg cgcaatcacg aatgaataac ggtttggttg atgcgagtga ttttgatgac 5040
 gagcgtaatg gctggcctgt tgaacaagtc tggaaagaaa tgcataantc tttgccattc 5100
 tcaccggatt cagtcgtcac tcatggtgat ttctcacttg ataaccttat ttttgaccag 5160
 gcgaaattaa taggttgat tgatcttcga cgagtcggaa tcgcagaccg ataccaggat 5220
 cttgccatcc tatggaactg cctcggtag ttttctcctt cattacagaa acggcttttt 5280
 caaaaatatg gtattgataa tcctgatatg aataaattgc agtttcattt gatcctcgat 5340
 gagtttttct aatcagaatt ggttaattgg ttgtaacact ggcagagcat tacgctgact 5400
 tgacgggacg gcggctttgt tgaataaatc gaacttttgc tgacttgaag gatcagatca 5460
 cgcattctcc cgacaacgca gaccgttccg tggcaaagca aaagttcaaa atcaccaact 5520
 ggtccaccta caacaaagct ctcatcaacc gtggctccct cactttctgg ctggatgatg 5580
 gggcgattca ggcctggtat gagtcagcaa caccttcttc acgagccatg acattaacct 5640
 ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtctcgcgcg tttcggtagat gacggtgaaa 5700
 acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga 5760
 gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg gtgtcggggc tggcttaact 5820
 atgcccgcac agagcagatt gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca 5880
 gatgcgtaag gagaaaatac cgcattcaggc gaaattgtaa acgttaatat tttgttaaaa 5940

ttcgcgttaa atatttgta aatcagctca ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa 6000
atcccttata aatcaaaaga atagaccgag ataggggtga gtgttggtcc agtttggaac 6060
aagagtcacac tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag 6120
ggcgatggcc cactacgtga accatcaccc aaatcaagtt ttttgcggtc gaggtgccgt 6180
aaagctctaa atcgggaaccc taaagggagc ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg 6240
gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca 6300
agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc acaccgcgcg cgcttaatgc gccgctacag 6360
ggcgcgtcca ttcgccattc aggctgcgca actgttgagg agggcgatcg gtgcgggcct 6420
cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa 6480
cgccagggtt ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg taatacgact 6540
cactata 6547

<210> 22
<211> 3191
<212> DNA
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> construcción recombinante

<400> 22

ctagaaatcc gtcaacatgg tggagcacga cactctcgct tactccaaga atatcaaaga 60
tacagtctca gaagaccaa gggctattga gacttttcaa caaagggtaa tatcgggaaa 120
cctcctcgga ttccattgcc cagctatctg tcacttcac aaaaggacag tagaaaagga 180
agggtggcacc tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gctatcggtc aagatgcctc 240
tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcggtg aaaaagaaga 300
cgttccaacc acgtcttcaa agcaagtggg ttgatgtgat gatcctatgc gtatggtatg 360
acgtgtgttc aagatgatga cttcaaacct acctatgacg tatggtatga acgtgtgtcg 420
actgatgact tagatccact cgagcggcta taaatacgta cctacgcacc ctgcgctacc 480
atccctagag ctgcagctta tttttacaac aattaccaac aacaacaaac acaaacaac 540
attacaatta ctatttaca ttacagtcga cccgtaccca cacaacacaa tggcggccac 600
cgcttcaga accaccgat tctctcttc ctcttcacac cccaccttc ccaaacgcat 660
tactagatcc accctccctc tctctcatca aaccctcacc aaaccaacc acgctctcaa 720
aatcaaatgt tccatctcca aacccccac ggcggcgccc ttcaccaagg aagcgccgac 780
cacggagccc ttcgtgtcac ggttcgcctc cggcgaacct cgcaaggcg cgacatcct 840
tgtggaggcg ctggagaggc agggcggtgac gacggtgttc gcgtaccccc gcggtgcgtc 900
gatggagatc caccaggcgc tcacgcgctc cgccgccatc cgcaacgtgc tcccgcgcca 960
cgagcagggc ggcgtcttcg ccgccgaagg ctacgcgcgt tcctccggcc tccccggcgt 1020

ctgcattgcc acctccggcc ccggcgccac caacctcgtg agcggcctcg ccgacgcttt 1080
 aatggacagc gtcccagtcg tcgccatcac cggccaggtc gcccgcgga tgatcggcac 1140
 cgacgccttc caagaaaccc cgatcgtgga ggtgagcaga tccatcacga agcacaacta 1200
 cctcatcctc gacgtcgacg acatcccccg cgtcgtcgcc gaggctttct tcgtcgccac 1260
 ctccggccgc cccgggtccg tcctcatcga cattcccaaa gacgttcagc agcaactcgc 1320
 cgtgcctaata tgggacgagc ccgttaacct ccccggttac ctgccaggc tgcccaggcc 1380
 ccccgccgag gcccattgg aacacattgt cagactcatc atggaggccc aaaagcccgt 1440
 tctctacgtc ggcggtggca gtttgaattc cagtgtgaa ttgaggcgct ttgttgaact 1500
 cactggtatt cccgttgcta gcactttaat gggctttgga acttttccta ttggtgatga 1560
 atattccctt cagatgctgg gtatgcatgg tactgtttat gctaactatg ctgttgacaa 1620
 tagtgatttg ttgcttgccct ttggggtaag gtttgatgac cgtgttactg ggaagcttga 1680
 ggcttttgct agtagggcta agattgttca cattgatatt gattctgccg agattgggaa 1740
 gaacaagcag gcgcacgtgt cggtttgccg ggatttgaag ttggccttga agggaattaa 1800
 tatgattttg gaggagaaaag gagtggaggg taagtttgat cttggagggt ggagagaaga 1860
 gattaatgtg cagaaacaca agtttccatt gggttacaag acattccagg acgcgatttc 1920
 tccgcagcat gctatcgagg ttcttgatga gttgactaat ggagatgcta ttgttagtac 1980
 tgggggtggg cagcatcaaa tgtgggctgc gcagttttac aagtacaaga gaccgaggca 2040
 gtggttgacc tcaggggggtc ttggagccat gggttttgga ttgcctgcgg ctattggtgc 2100
 tgctgttgct aaccctgggg ctgttggtgt tgacattgat ggggatggta gtttcatcat 2160
 gaatgttcag gagttggcca ctataagagt ggagaatctc ccagttaaga tattgttggt 2220
 gaacaatcag ctttgggta tgggtggttca gttggaggat aggttctaca agtccaatag 2280
 agctcacacc tatcttgagg atccgtctag cgagagcgag atattcccaa acatgctcaa 2340
 gtttgctgat gcttgtggga taccggcagc gcgagtgacg aagaaggaa agcttagagc 2400
 ggcaattcag agaattgttg acacccctgg cccctacctt cttgatgtca ttgtgcccc 2460
 tcaggagcat gtgttgccga tgattcccag taatggatcc ttcaaggatg tgataactga 2520
 ggggtgatgg agaacgaggt actgattgcc tagaccaa atgttcctgat gcttgttttg 2580
 tacaatatat ataagataat gctgtcctag ttgcaggatt tggcctgtgg tgagcatcat 2640
 agtctgtagt agttttggta gcaagacatt ttattttcct tttatttaac ttactacatg 2700
 cagtagcatc tatctatctc tgtagtctga tatctcctgt tgtctgtatt gtgccgttgg 2760
 attttttgct gtagtgagac tgaaaatgat gtgctagtaa taatatttct gttagaaatc 2820
 taagtagaga atctgttgaa gaagtcaaaa gctaattgaa tcaggttaca tatcaatggt 2880
 tttctttttt tagcgggttg tagacgtgta gattcaactt ctcttgagc tcacctaggc 2940
 aatcagtaaa atgcatattc cttttttaac ttgccattta tttactttta gtggaaattg 3000
 tgaccaattt gttcatgtag aacggatttg gaccattgcg tccacaaaac gtctcttttg 3060
 ctcgatcttc acaaagcgat accgaaatcc agagatagtt ttcaaaagtc agaaatggca 3120
 aagttataaa tagtaaaaca gaatagatgc tgtaatcgac ttcaataaca agtggcatca 3180
 cgtttctagt t 3191

<210> 23
 <211> 2924

<212> DNA
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción recombinante

5 <220>
 <221> característica nueva
 <222> (1191)..(1191)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 23

cgcgccaagc ttggatcctc gaagagaagg gttaataaca cactttttta acatttttta	60
cacaaatfff agttatttta aaatttatta aaaaatttta aataagaaga ggaactcttt	120
aaataaatct aacttacaaa atttatgatt ttttaataagt ttccaccaat aaaaaatgtc	180
ataaaaaat gttaaaaagt atattatcaa tattctcttt atgataaata aaaagaaaaa	240
aaaaataaaa gttaagtga aatgagattg aagtgacttt aggtgtgtat aaatatatca	300
accccgccaa caatttattt aatccaaata tattgaagta tattattcca tagcctttat	360
ttatttatat atttattata taaaagcttt atttggtcta ggttggtcat gaaatatttt	420
tttggtttta tctccgttgt aagaaaatca tgtgctttgt gtcgccactc actattgcag	480
ctttttcatg cattgggtcag attgacggtt gattgtattt ttgtttttta tggttttgtg	540
ttatgactta agtcttcac tctttatctc ttcacaggt ttgatggtta cctaatatgg	600
tccatgggta catgcatggt taaattaggt ggccaacttt gttgtgaacg atagaatttt	660
ttttatatta agtaaaactat ttttatatta tgaaataata ataaaaaaaa tattttatca	720
ttattaacaa aatcatatta gttaatttgt taactctata ataaaagaaa tactgtaaca	780
ttcacattac atggtaacat ctttccaccc tttcatttgt tttttgttg atgacttttt	840
ttcttgttta aatttatttc ctttctttta aatttggaat acattatcat catatataaa	900
ctaaaatact aaaaacagga ttacacaaat gataaataat aacacaaata ttataaatc	960
tagctgcaat atatttaaac tagctatatc gatattgtaa aataaaacta gctgcattga	1020
tactgataaa aaaatatcat gtgctttctg gactgatgat gcagtatact tttgacattg	1080
cctttatttt atttttcaga aaagctttct tagttctggg ttcttcatta tttgtttccc	1140
atctccattg tgaattgaat catttgcttc gtgtcacaaa tacaatttag ntaggtacat	1200

10

gcattgggtca gattcacggt ttattatgtc atgacttaag ttcattggtag tacattacct 1260
gccacgcatg cattatatgt gtttagatttg ataggcaa at ttggttggtca acaatataaa 1320
tataaataat gttttttatat tacgaaataa cagtgatcaa aacaaacagt tttatcttta 1380
ttaacaagat tttgtttttg tttgatgacg ttttttaatg tttacgcttt ccccttctt 1440
ttgaatttag aacactttat catcataaaa tcaaatacta aaaaaattac atatttcata 1500
aataataaca caaatatfff taaaaaatct gaaataataa tgaacaatat tacatattat 1560
cacgaaaatt cattaataaa aatattatat aaataaaatg taatagtagt tatatgtagg 1620
aaaaaagtac tgcacgcata atatatataa aaagattaaa atgaactatt ataaataata 1680
acactaaatt aatggtgaat catatcaaaa taatgaaaaa gtaataaaaa tttgtaatta 1740
acttctatat gtattacaca cacaataaat aaataatagt aaaaaaatt atgataaata 1800
tttaccatct cataagatat ttaaaataat gataaaaaata tagattatft tttatgcaac 1860
tagctagcca aaaagagaac acgggtatat ataaaaagag tacctttaaa ttctactgta 1920
cttcctttat tcctgacgtt tttatatcaa gtggacatac gtgaagattt taattatcag 1980
tctaaatatt tcattagcac ttaatactft tctgttttat tcctatccta taagtagtcc 2040
cgattctccc aacattgctt attcacacaa ctaactaaga aagtcttcca tagcccccga 2100
agcggccgct gagtgattgc tcacgagtggt ggccaccatg ccttcagcaa gtaccaatgg 2160
gttgatgatg ttgtgggttt gacccttcac tcaacactft tagtccctta tttctcatgg 2220
aaaataagcc atcgccgcca tcaactcaac acagggtccc ttgaccgtga tgaagtgttt 2280
gtcccaaaac caaaatccaa agttgcatgg ttttccaagt acttaaaca cctcttagga 2340
agggctgttt ctcttctcgt cacactcaca atagggtggc ctatgtatft agccttcaat 2400
gtctctggta gaccctatga tagttttgca agccactacc acccttatgc tcccatatat 2460
tctaaccgtg agaggcttct gatctatgtc tctgatgttg ttttgttttc tgtgacttac 2520
tctctctacc gtgttgcaac cctgaaaggg ttggtttggc tgctatgtgt ttatgggggtg 2580
cctttgctca ttgtgaacgg ttttcttggt actatcacat atttgcagca cacacactft 2640
gccttgctc attacgattc atcagaatgg gactggctga agggagctft ggcaactatg 2700
gacagagatt aagcggccgc gacacaagtg tgagagtact aaataaatgc tttggttgta 2760
cgaaatcatt aactaaata aaataatcaa agcttatata tgccttccgc taaggccgaa 2820
tgcaagaaa ttggttctft ctggttatct tttgccactt ttactagtac gtattaatta 2880
ctacttaatc atctttgttt acggctcatt atatccgtcg acgg 2924

<210> 24
<211> 4511
<212> DNA
5 <213> secuencia artificial

<220>
<223> construcción recombinante

<400> 24

cgcgccaagc ttggatcccc cctcgaggtc gacgggatcg ataagcttct gcaggaattc	60
tgagctagcg aagttcctat tccgaagttc ctattcttca aaaagtatag gaacttcaga	120
cgtcctcgag tccgtcctgt agaaacccca acccgtagaa tcaaaaaact cgacggcctg	180
tgggcattca gtctggatcg cgaaaactgt ggaattgatc cagaattcgc tagcgaagtt	240
cctattccga agttcctatt ctctagaaag tataggaact tcagatccag aattcgggtcc	300
gggccatcgt ggcctcttgc tcttcaggat gaagagctat gtttcgcgcc aagcttggat	360
cctagaacta gaaacgtgat gccacttggt attgaagtcg attacagcat ctattctggt	420
ttactattta taactttgcc atttctgact tttgaaaact atctctggat ttcggtatcg	480
ctttgtgaag atcgagcaaa agagacgttt tgtggacgca atggtccaaa tccgttctac	540
atgaacaaat tggtcacaaat ttccactaaa agtaaataaa tggcaagtta aaaaaggaat	600
atgcatttta ctgattgcct aggtgagctc caagagaagt tgaatctaca cgtctaccaa	660
ccgctaaaaa aagaaaaaca ttgatatgta acctgattcc attagctttt gacttcttca	720
acagattctc tacttagatt tctaacagaa atattattac tagcacatca ttttcagtct	780
cactacagca aaaaaatcaa cggcacaata cagacaacag gagatatcag actacagaga	840
tagatagatg ctactgcatg tagtaagtta aataaaagga aaataaaatg tcttgctacc	900
aaaactacta cagactatga tgctcaccac aggccaaatc ctgcaactag gacagcatta	960
tcttatatat attgtacaaa acaagcatca aggaacattt ggtctaggca atcagtacct	1020
cgttctacca tcaccctcag ttatcacatc cttgaaggat ccattactgg gaatcatcgg	1080
caacacatgc tcctgatggg gcacaatgac atcaagaagg tagggggccag ggggtgtcaa	1140
cattctctga attgccgctc taagctcttc ctcttcgctc actcgcgctg ccggtatccc	1200
acaagcatca gcaaacttga gcatgtttgg gaatatctcg ctctcgctag acggatctcc	1260
aagatagggtg tgagctctat tggacttgta gaacctatcc tccaactgaa ccaccatacc	1320
caaatgctga ttgttcaaca acaatatctt aactgggaga ttctccactc ttatagtggc	1380
caactcctga acattcatga tgaaactacc atccccatca atgtcaacca caacagcccc	1440
aggggttagca acagcagcac caatagccgc aggcaatcca aaacccatgg ctccaagacc	1500
ccctgagggtc aaccactgcc tcggtctctt gtacttgtaa aactgcgcag cccacatttg	1560
atgctgcca accccagtac taacaatagc atctccatta gtcaactcat caagaacctc	1620
gatagcatgc tgcggagaaa tcgcgtcctg gaatgtcttg taaccaatg gaaacttggtg	1680
tttctgcaca ttaatctctt ctctccaacc tccaagatca aacttaccct ccactccttt	1740
ctcctccaaa atcatattaa ttcccttcaa ggccaacttc aaatccgcgc aaaccgacac	1800
gtgcgcctgc ttgttcttcc caatctcggc agaatcaata tcaatgtgaa caatcttagc	1860

cctactagca aaagcctcaa gcttcccagt aacacggtca tcaaacctta ccccaaaggc	1920
aagcaacaaa tcactattgt caacagcata gttagcataa acagtaccat gcatacccag	1980
catctgaagg gaatattcat caccaatagg aaaagttcca agaccatta aagtgttagc	2040
aacgggaata ccagtgagtt caacaaagcg cctcaattca gcactggaat tcaaactgcc	2100
accgccgacg tagagaacgg gcttttgggc ctccatgatg agtctgacaa tgtgttccaa	2160
ttgggcctcg gcggggggcc tgggcagcct ggcgaggtaa ccggggaggt taacgggctc	2220
gtcccaatta ggcacggcga gttgtgtgctg aacgtctttg ggaatgtcga tgaggaccgg	2280
accggggcg cgggaggtgg cgacgaagaa agcctcggcg acgacgcggg ggatgtcgtc	2340
gacgtcgagg atgaggtagt tgtgttctgt gatggatctg ctcacctcca cgatcggggt	2400
ttcttggaa ggcgtcgggtc cgatcatccg gcgggcgacc tggccggtga tggcgacgac	2460
tgggacgctg tccattaaag cgtcggcgag gccgctcacg aggttggtgg cgccggggcc	2520
ggaggtggca atgcagacgc cggggaggcc ggaggaacgc gcgtagcctt cggcggcgaa	2580
gacgccgccc tgctcgtggc gcgggagcac gttgcggatg gcggcggagc gcgtgagcgc	2640
ctggtggatc tccatcgacg caccgccggg gtacgcgaac accgtcgtca cgccctgcct	2700
ctccagcgcc tccacaagga tgtccgcgcc cttgcgaggt tcgccggagg cgaaccgtga	2760
cacgaagggc tccgtggtcg gcgcttcctt ggtgaagggc gccgccgtgg ggggtttgga	2820
gatggaacat ttgattttga gagcgtggtt ggggtttggtg agggtttgat gagagagagg	2880
gagggtggat ctagtaatgc gtttggggaa ggtgggggtgt gaagaggaag aagagaatcg	2940
ggtggttctg gaagcggtag cgcgcattgt gttgtgtggc atggttatac ttcaaaaact	3000
gcacaacaag cctagagtta gtacctaaac agtaaattta caacagagag caaagacaca	3060
tgcaaaaatt tcagccataa aaaaagttat aatagaattt aaagcaaaag tttcattttt	3120
taaacatata tacaacaaa ctggatttga aggaagggat taattcccct gctcaaagtt	3180
tgaattccta ttgtgacct tactcgaata aaattgaagc ctaaggaaatg tatgagaaac	3240
aagaaaacaa aacaaaacta cagacaaaca agtacaatta caaaattcgc taaaattctg	3300
taatcaccaa accccatctc agtcagcaca aggcccaagg tttattttga aataaaaaaa	3360
aagtgtttt atttctcata agctaaaaga aagaaaggca attatgaaat gatttcgact	3420
agatctgaaa gtccaacgcg tattccgcag atattaaaga aagagtagag tttcacatgg	3480
atcctagatg gaccagttg aggaaaaagc aaggcaaaagc aaaccagaag tgcaagatcc	3540
gaaattgaac cacggaatct aggatttggt agagggagaa gaaaagtacc ttgagaggtg	3600
gaagagaaga gaagagcaga gagatatatg aacgagtgtg tcttggtctc aactctgaag	3660
cgatacgagt ttagagggga gcattgagtt ccaatttata gggaaaccgg gtggcagggg	3720
tgagttaatg acggaaaagc ccctaagtaa cgagattgga ttgtgggtta gattcaaccg	3780
tttgcacccg cggcttagat tggggaagtc agagtgaatc tcaaccgttg actgagttga	3840

aaattgaatg tagcaaccaa ttgagccaac cccagccttt gccctttgat tttgatttgt 3900
 ttgttgcata ctttttattt gtcttctggt tctgactctc tttctctcgt ttcaatgcc 3960
 ggttgcctac tcccacacca ctcacaagaa gattctactg ttagtattaa atatttttta 4020
 atgtattaaa tgatgaatgc ttttgtaaac agaacaagac tatgtctaata aagtgtcttg 4080
 caacattttt taagaaatta aaaaaaatat atttattatc aaaatcaaata gtatgaaaaa 4140
 tcatgaataa tataatttta tacatttttt taaaaaatct ttttaatttct taattaatat 4200
 cttaaaaata atgattaata tttaacccaa aataattagt atgattggta aggaagatat 4260
 ccatgttatg tttggatgtg agtttgatct agagcaaagc ttactagagt cgaccgatcc 4320
 gtcgacggcg cgcgcgctc tagttgaaga cacgttcagt tcttcacgt aagaagacac 4380
 tcagtagtct tcggccagaa tggcccggac cgaagcttct gcaggaattc tgagctagcg 4440
 aagttcctat tccgaagttc ctattctcta gaaagtatag gaacttcaga tccactagga 4500
 tccgtcgacg g 4511

<210> 25

<211> 5437

<212> DNA

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción recombinante

<220>

<221> característica nueva

10 <222> (3914)..(3914)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 25

ggccgcgaca caagtgtgag agtactaaat aaatgctttg gttgtacgaa atcattacac 60
 taaataaaat aatcaaagct tatatatgcc ttccgctaag gccgaatgca aagaaattgg 120
 ttctttctcg ttatcttttg ccacttttac tagtacgtat taattactac ttaatcatct 180
 ttgtttacgg ctcatatat ccgtcgacgg cgcgcccgat catccggata tagttcctcc 240
 tttcagcaaa aaaccctca agacccttt agaggcccca aggggttatg ctagttattg 300
 ctcagcggtg gcagcagcca actcagcttc ctttcgggct ttgttagcag ccggatcgat 360
 ccaagctgta cctcactatt cctttgccct cggacgagtg ctggggcgct ggtttcact 420
 atcggcgagt acttctacac agccatcggt ccagacggcc gcgcttctgc gggcgatttg 480
 tgtacgcccg acagtcccgg ctccggatcg gacgattgag tcgcatcgac cctgcgcca 540
 agctgcatca tcgaaattgc cgtcaaccaa gctctgatag agttgggtcaa gaccaatgag 600
 gagcatatac gcccggagcc gcggcgatcc tgcaagctcc ggatgcctcc gctcgaagta 660
 gcgctctgct tgctccatac aagccaacca cggcctccag aagaagatgt tggcgacctc 720

gtattgggaa	tccccgaaca	tgcctcgt	ccagtcaatg	accgctgtta	tgcggccatt	780
gtccgtcagg	acattgttgg	agccgaaatc	cgcgtgcacg	aggtgccgga	cttcggggca	840
gtcctcggcc	caaagcatca	gctcatcgag	agcctgcgcg	acggacgcac	tgacggtgtc	900
gtccatcaca	gtttgccagt	gatacacatg	gggatcagca	atcgcgcata	tgaaatcacg	960
ccatgtagtg	tattgaccga	ttccttgcg	tccgaatggg	ccgaacccgc	tcgtctggct	1020
aagatcggcc	gcagcgatcg	catccatagc	ctccgcgacc	ggctgcagaa	cagcgggcag	1080
ttcggtttca	ggcaggctct	gcaacgtgac	accctgtgca	cggcgggaga	tgcaataggt	1140
caggctctcg	ctgaattccc	caatgtcaag	cacttccgga	atcgggagcg	cggccgatgc	1200
aaagtgccga	taaacataac	gatctttgta	gaaaccatcg	gcgcagctat	ttacccgcag	1260
gacatatcca	cgccctccta	catcgaagct	gaaagcacga	gattcttcgc	cctccgagag	1320
ctgcatcagg	tcggagacgc	tgtcgaactt	ttcgatcaga	aactttctga	cagacgtcgc	1380
ggtagtttca	ggcttttcca	tgggtatatc	tccttcttaa	agttaaacaa	aattatttct	1440
agagggaaac	cgttgtggtc	tccctatagt	gagtcgtatt	aatttcgcgg	gatcgagatc	1500
tgatcaacct	gcattaatga	atcggccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	cgtattgggc	1560
gctcttcgc	ttcctcgctc	actgactcgc	tgcgctcgg	cgttcggctg	cggcgagcgg	1620
tatcagctca	ctcaaaggcg	gtaatacgg	tatccacaga	atcaggggat	aacgcaggaa	1680
agaacatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	1740
cgtttttcca	taggtctccg	cccctgacg	agcatcaca	aaatcgacgc	tcaagtcaga	1800
ggtaggcgaaa	cccgcagga	ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	agctccctcg	1860
tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	1920
gaagcgtggc	gctttctcaa	tgctcacgct	gtaggtatct	cagttcgggtg	taggtcgttc	1980
gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	2040
gtaactatcg	tcttgagtcc	aacccggtaa	gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	2100
ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggatg	taggcggtgc	tacagagttc	ttgaagtgg	2160
ggcctaacta	cggctacact	agaaggacag	tatttggtat	ctgcgctctg	ctgaagccag	2220
ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	gctggtagcg	2280
gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	2340
ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaacga	aaactcacgt	taagggattt	2400
tggtcatgac	attaacctat	aaaaataggc	gtatcacgag	gccctttcgt	ctcgcgcgtt	2460
tcggtgatga	cggtgaaaac	ctctgacaca	tgcagctccc	ggagacggtc	acagcttgtc	2520
tgtaagcggg	tgccgggagc	agacaagccc	gtcagggcgc	gtcagcgggt	gttggcgggt	2580
gtcggggctg	gcttaactat	gcggcatcag	agcagattgt	actgagagt	caccatattg	2640
acatatgtgc	gttagaacgc	ggctacaatt	aatacataac	cttatgtatc	atacacatac	2700

gatttaggtg	acactataga	acggcgcgcc	aagcttggat	cctcgaagag	aagggttaat	2760
aacacatttt	ttaacatttt	taacacaaat	tttagttatt	taaaaattta	ttaaaaaatt	2820
taaaataaga	agaggaactc	tttaataaaa	tctaacttac	aaaatttatg	atttttaata	2880
agttttcacc	aataaaaaat	gtcataaaaa	tatgttaaaa	agtatattat	caatattctc	2940
tttatgataa	ataaaaagaa	aaaaaaaaata	aaagttaagt	gaaaatgaga	ttgaagtgac	3000
tttaggtgtg	tataaatata	tcaaccccg	caacaattta	tttaatccaa	atatattgaa	3060
gtatattatt	ccatagcctt	tatttattta	tatatttatt	atataaaagc	tttatttgtt	3120
ctaggttgtt	catgaaatat	ttttttggtt	ttatctccgt	tgtaagaaaa	tcatgtgctt	3180
tgtgtcgcca	ctcactattg	cagctttttc	atgcattggg	cagattgacg	gttgattgta	3240
tttttgtttt	ttatggtttt	gtgttatgac	ttaagtcttc	atctctttat	ctcttcatca	3300
ggtttgatgg	ttacctaata	tgggccatgg	gtacatgcat	ggttaaatta	ggaggccaac	3360
tttgttgtga	acgatagaat	tttttttata	ttaagtaaac	tattttttata	ttatgaaata	3420
ataataaaaa	aaatatttta	tcattattaa	caaaatcata	ttagttaatt	tgtaaactct	3480
ataataaaag	aaatactgta	acattcacat	tacatggtaa	catctttcca	ccctttcatt	3540
tgttttttgt	ttgatgactt	tttttcttgt	ttaaatttat	ttcccttctt	ttaaatttgg	3600
aatacattat	catcatatat	aaactaaaat	actaaaaaca	ggattacaca	aatgataaat	3660
aataacacaa	atattttata	atctagctgc	aatatattta	aactagctat	atcgatattg	3720
taaaataaaa	ctagctgcat	tgatactgat	aaaaaaatat	catgtgcttt	ctggactgat	3780
gatgcagtat	acttttgaca	ttgcctttat	tttatttttc	agaaaagctt	tcttagttct	3840
gggttcttca	ttatttgttt	cccatctcca	ttgtgaattg	aatcatttgc	ttcgtgtcac	3900
aaatacaatt	tagntaggta	catgcattgg	tcagattcac	ggtttattat	gtcatgactt	3960
aagttcatgg	tagtacatta	cctgccacgc	atgcattata	ttggttagat	ttgataggca	4020
aatttggttg	tcaacaatat	aaatataaat	aatgttttta	tattacgaaa	taacagtgat	4080
caaaacaaac	agttttatct	ttattaacaa	gattttgttt	ttgtttgatg	acgtttttta	4140
atgtttacgc	tttccccctt	cttttgaatt	tagaacactt	tatcatcata	aaatcaaata	4200
ctaaaaaaat	tacatatattc	ataaataata	acacaaatat	ttttaaaaaa	tctgaaataa	4260
taatgaacaa	tattacatat	tatcacgaaa	attcattaat	aaaaatatta	tataaataaa	4320
atgtaatagt	agt'tatatgt	aggaaaaaag	tactgcacgc	ataatatata	caaaaagatt	4380
aaaatgaact	attataaata	ataacactaa	attaatgggt	aatcatatca	aaataatgaa	4440
aaagtaaata	aaatttgtaa	ttaacttcta	tatgtattac	acacacaaat	aataaataat	4500
agtaaaaaaa	attatgataa	atatttacca	tctcataaga	tattttaaata	aatgataaaa	4560
atatagatta	tttttttatgc	aactagctag	ccaaaaagag	aacacgggta	tatataaaaa	4620

gagtaccttt aaattctact gtacttcctt tattcctgac gtttttatat caagtggaca 4680
 tacgtgaaga ttttaattat cagtctaaat atttcattag cacttaatac ttttctgttt 4740
 tattcctatc ctataagtag tcccgattct cccaacattg cttattcaca caactaacta 4800
 agaaagtctt ccatagcccc ccaagcggcc gctgagtgat tgctcacgag tgtggtcacc 4860
 atgccttcag caagtaccaa tgggttgatg atgttggtggg tttgaccctt cactcaacac 4920
 ttttagtccc ttatttctca tggaaaataa gccatcgccg ccatcactcc aacacaggtt 4980
 cccttgaccg tgatgaagtg tttgtcccaa aaccaaatac caaagttgca tggttttcca 5040
 agtacttaaa caaccctcta ggaagggtg tttctcttct cgtcacactc acaatagggt 5100
 ggcctatgta tttagccttc aatgtctctg gtgagacccta tgatagtttt gcaagccact 5160
 accaccctta tgctcccata tattctaacc gtgagaggct tctgatctat gtctctgatg 5220
 ttgctttgtt ttctgtgact tactctctct accgtgttgc aaccctgaaa gggttgggtt 5280
 ggctgctatg tgtttatggg gtgcctttgc tcattgtgaa cggttttctt gtgactatca 5340
 catatttgca gcacacacac tttgccttgc ctcattacga ttcacagaa tgggactggc 5400
 tgaagggagc tttggcaact atggacagag attaagc 5437

<210> 26

<211> 7025

<212> DNA

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción recombinante

<400> 26

gatccgtcga cggcgcgccc gatcatccgg atatagttcc tcctttcagc aaaaaacccc 60
 tcaagacccg ttttagaggcc ccaaggggtt atgctagtta ttgctcagcg gtggcagcag 120
 ccaactcagc ttcctttcgg gctttgttag cagccggatc gatccaagct gtacctcact 180
 attcctttgc cctcggacga gtgctggggc gtcggtttcc actatcggcg agtacttcta 240
 cacagccatc ggtccagacg gccgcgcttc tgcgggcgat ttgtgtacgc ccgacagtcc 300
 cggctccgga tcggacgatt gcgtcgcac gaccctgcgc ccaagctgca tcacgaaat 360
 tgccgtcaac caagctctga tagagtgtgt caagaccaat gcggagcata tacgcccgga 420
 gccgcggcga tcctgcaagc tccggatgcc tccgctcgaa gtagcgcgtc tgctgtcca 480
 tacaagccaa ccacggcctc cagaagaaga tgttggcgac ctcgtattgg gaatccccga 540
 acatgcctc gctccagtca atgaccgtg ttatgcggcc attgtccgtc aggacattgt 600
 tggagccgaa atccgcgtgc acgaggtgcc ggacttcggg gcagtcctcg gcccaaagca 660
 tcagctcatc gagagcctgc gcgacggacg cactgacggg gtcgtccatc acagtttgcc 720
 agtgatacac atgggggatca gcaatcgcgc atatgaaatc acgcatgta gtgtattgac 780

cgattccttg	cggtccgaat	gggccgaacc	cgctcgtctg	gctaagatcg	gccgcagcga	840
tcgcatccat	agcctccg	accggctgca	gaacagcggg	cagttcggtt	tcaggcaggt	900
cttgcaacgt	gacaccctgt	gcacggcg	agatgcaata	ggtcaggctc	tcgctgaatt	960
ccccaatgtc	aagcacttcc	ggaatcggga	gcgcggccga	tgcaaagtgc	cgataaacat	1020
aacgatcttt	gtagaaacca	tcggcgagc	tatttacc	caggacatat	ccacgccctc	1080
ctacatcgaa	gctgaaagca	cgagattctt	cgccctccga	gagctgcatc	aggtcggaga	1140
cgctgtcgaa	cttttcgata	agaaacttct	cgacagacgt	cgcggtgagt	tcaggctttt	1200
ccatgggtat	atctccttct	taaagttaaa	caaaattatt	tctagaggga	aaccgttgtg	1260
gtctccctat	agtgagtcgt	attaatttct	cgggatcgag	atctgatcaa	cctgcattaa	1320
tgaatcggcc	aacgcgcggg	gagaggcgg	ttgcgtattg	ggcgctcttc	cgcttcctcg	1380
ctcactgact	cgctgcgctc	ggtcgttcgg	ctgcggcgag	cggtatcagc	tcactcaaag	1440
gcggtaatat	ggttatccac	agaatcagg	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	1500
ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcgttgc	tggcgttttt	ccataggctc	1560
cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	agagggtggcg	aaacccgaca	1620
ggactataaa	gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	tcgtgcgctc	tcctgttccg	1680
accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccctt	cggaagcgt	ggcgctttct	1740
caatgctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggtcg	ttcgctccaa	gctgggctgt	1800
gtgcacgaac	ccccgttca	gcccgaaccg	tgcgcttat	ccggtacta	tcgtcttgag	1860
tccaacccgg	taagacacga	cttatcgcca	ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	1920
agagcgaggt	atgtaggcgg	tgctacagag	ttcttgaagt	ggtggcctaa	ctacggctac	1980
actagaagga	cagtatttgg	tatctgcgct	ctgctgaagc	cagttacctt	cgaaaaaaga	2040
gttggtagct	cttgatccgg	caaacaaacc	accgctggta	gcggtgggtt	ttttgtttgc	2100
aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	tctcaagaag	atcctttgat	cttttctacg	2160
gggtctgacg	ctcagtggaa	cgaaaactca	cgtaaggga	ttttggcat	gacattaacc	2220
tataaaaata	ggcgtatcac	gaggcccttt	cgctctcgcg	gtttcggtga	tgacggtgaa	2280
aacctctgac	acatgcagct	cccggagacg	gtcacagctt	gtctgtaagc	ggatgccggg	2340
agcagacaag	cccgtcagg	cgctcagcg	ggtgttggcg	ggtgtcggg	ctggcttaac	2400
tatgcgcat	cagagcagat	tgtactgaga	gtgcaccata	tggacatatt	gtcgttagaa	2460
cgcggtaca	attaatacat	aaccttatgt	atcatacaca	tacgatttag	gtgacactat	2520
agaacggcgc	gccaagcttg	gatccccctt	cgaggtcgac	ggtatcgata	agcttctgca	2580
ggaattctga	gctagcgaag	ttcctattcc	gaagttccta	ttcttcaaaa	agtataggaa	2640
cttcagacgt	cctcgagtcc	gtcctgtaga	aacccaacc	cgtgaaatca	aaaaactcga	2700
cggcctgtgg	gcattcagtc	tggatcgca	aaactgtgga	attgatccag	aattcgctag	2760

cgaagttcct attccgaagt tcctattctc tagaaagtat aggaacttca gatccagaat	2820
tcggtccggg ccatcgtggc ctcttgctct tcaggatgaa gagctatgtt tcgcgccaag	2880
cttgatcct agaactagaa acgtgatgcc acttggtatt gaagtcgatt acagcatcta	2940
ttctgtttta ctatttataa ctttgccatt tctgactttt gaaaactatc tctggatttc	3000
ggtatcgctt tgtgaagatc gagcaaaaga gacgttttgt ggacgcaatg gtccaaatcc	3060
gttctacatg aacaaattgg tcacaatttc cactaaaagt aaataaatgg caagttaaaa	3120
aaggaatatg cttttactg attgcctagg tgagctccaa gagaagttga atctacacgt	3180
ctaccaaccg ctaaaaaaag aaaaacattg atatgtaacc tgattccatt agcttttgac	3240
ttcttcaaca gattctctac ttagatttct aacagaaata ttattactag cacatcattt	3300
tcagtctcac tacagcaaaa aatccaacgg cacaatacag acaacaggag atatcagact	3360
acagagatag atagatgcta ctgcatgtag taagttaaat aaaaggaaaa taaaatgtct	3420
tgctaccaa actactacag actatgatgc tcaccacagg ccaaatctg caactaggac	3480
agcattatct tatatatatt gtacaaaaca agcatcaagg aacatttggt ctaggcaatc	3540
agtacctgt tctaccatca ccctcagtta tcacatcctt gaaggatcca ttactgggaa	3600
tcacggaac cacatgctcc tgatggggca caatgacatc aagaaggtag gggccagggg	3660
tgtccaacat tctctgaatt gccgctctaa gctcttcctt cttcgtcact cgcgctgccg	3720
gtatcccaca agcatcagca aacttgagca tgtttgggaa tatctcgctc tcgctagacg	3780
gatctccaag ataggtgtga gctctattgg acttgtagaa cctatcctcc aactgaacca	3840
ccatacccaa atgctgattg ttcaacaaca atatcttaac tgggagattc tccactctta	3900
tagtggccaa ctctgaaca ttcattgatga aactaccatc cccatcaatg tcaaccacaa	3960
cagccccagg gttagcaaca gcagcaccaa tagccgcagg caatccaaaa cccatggctc	4020
caagaccccc tgaggtaaac cactgcctcg gtctcttgta cttgtaaaac tgcgcagccc	4080
acatttgatg ctgccaacc ccagtactaa caatagcatc tccattagtc aactcatcaa	4140
gaacctcgat agcatgctgc ggagaaatcg cgctctggaa tgtcttgtaa cccaatggaa	4200
acttggtgtt ctgcacatta atctcttctc tccaacctcc aagatcaaac ttacctcca	4260
ctctttctc ctccaaaatc atattaattc ctttcaaggc caacttcaaa tccgcgcaaa	4320
ccgacacgtg cgctgcttg ttcttcccaa tctcggcaga atcaatatca atgtgaacaa	4380
tcttagccct actagcaaaa gcctcaagct tcccagtaac acggtcatca aaccttacc	4440
caaaggcaag caacaaatca ctattgtcaa cagcatagtt agcataaaca gtacatgca	4500
taccagcat ctgaagggaa tattcatcac caataggaaa agttccaaga cccattaaag	4560
tgctagcaac gggaaatacca gtgagttcaa caaagcgct caattcagca ctggaattca	4620
aactgccacc gccgacgtag agaacgggct tttgggcctc catgatgagt ctgacaatgt	4680

gttccaattg	ggcctcggcg	gggggcctgg	gcagcctggc	gaggtaaccg	gggaggttaa	4740
cgggctcgtc	ccaattaggc	acggcgagtt	gctgctgaac	gtctttggga	atgtcgatga	4800
ggaccggacc	ggggcgggcg	gaggtggcga	cgaagaaagc	ctcggcgacg	acgcggggga	4860
tgtcgtcgac	gtcgaggatg	aggtagtgtg	gcttcgtgat	ggatctgctc	acctccacga	4920
tcgggggtttc	ttggaaggcg	tcggtgccga	tcattccggcg	ggcgacctgg	ccggtgatgg	4980
cgacgactgg	gacgctgtcc	attaaagcgt	cggcgaggcc	gctcacgagg	ttggtggcgc	5040
cggggccgga	ggtggcaatg	cagacgccgg	ggaggccgga	ggaacgcgcg	tagccttcgg	5100
cggcgaagac	gccgccttgc	tcgtggcgcg	ggagcacgtt	gcggatggcg	gcggagcgcg	5160
tgagcgcttg	gtggatctcc	atcgacgcac	cgccggggta	cgcaaacacc	gtcgtcacgc	5220
cctgcctctc	cagcgcttcc	acaaggatgt	ccgcgccctt	gcgaggttcg	ccggaggcga	5280
accgtgacac	gaagggtccc	gtggtcggcg	cttccttggt	gaagggcgcc	gccgtggggg	5340
gtttggagat	ggaacatttg	attttgagag	cgtggttggg	tttggtagag	gtttgatgag	5400
agagagggag	ggtggatcta	gtaatgcgtt	tggggaaggt	ggggtgtgaa	gaggaagaag	5460
agaatcgggt	ggttctggaa	gcggtggccg	ccattgtgtt	gtgtggcatg	gttatacttc	5520
aaaaactgca	caacaagcct	agagttagta	cctaaacagt	aaattttaca	cagagagcaa	5580
agacacatgc	aaaaatttca	gccataaaaa	aagttataat	agaattttaa	gcaaaaagttt	5640
catttttttaa	acatatatac	aaacaaactg	gatttgaagg	aagggattaa	ttccccctgct	5700
caaagtttga	attcctattg	tgacctatac	tcgaataaaa	ttgaagccta	aggaatgtat	5760
gagaaacaag	aaaacaaaac	aaaactacag	acaacaagt	acaattacaa	aattcgctaa	5820
aatttctgtaa	tcaccaaacc	ccatctcagt	cagcacaagg	cccaaggttt	attttgaaat	5880
aaaaaaaaag	tgattttatt	tctcataagc	taaaagaaag	aaaggcaatt	atgaaatgat	5940
ttcgactaga	tctgaaagtc	caacgcgtat	tccgcagata	ttaaagaaag	agtagagttt	6000
cacatggatc	ctagatggac	ccagttgagg	aaaaagcaag	gcaaagcaaa	ccagaagtgc	6060
aagatccgaa	attgaaccac	ggaatctagg	atttggtaga	gggagaagaa	aagtaccttg	6120
agaggtagaa	gagaagagaa	gagcagagag	atatatgaac	gagtgtgtct	tggtctcaac	6180
tctgaagcga	tacgagttta	gaggggagca	ttgagttcca	atttataggg	aaaccgggtg	6240
gcaggggtga	gttaatgacg	gaaaagcccc	taagtaacga	gattggattg	tggttagat	6300
tcaaccgttt	gcatccgcgg	cttagattgg	ggaagtcaga	gtgaatctca	accgttgact	6360
gagttgaaaa	ttgaatgtag	caaccaattg	agccaacccc	agcctttgcc	ctttgatttt	6420
gatttgtttg	ttgcatactt	tttatttgtc	ttctggttct	gactctcttt	ctctcgtttc	6480
aatgccaggt	tgcctactcc	cacaccactc	acaagaagat	tctactgtta	gtattaaata	6540
ttttttaatg	tattaaatga	tgaatgcttt	tgtaaacaga	acaagactat	gtctaataag	6600
tgtcttgcaa	cattttttta	gaaattaaaa	aaaatatatt	tattatcaaa	atcaaatgta	6660
tgaaaaatca	tgaataatat	aattttatac	atttttttta	aaaatctttt	aatttcttaa	6720
ttaatatctt	aaaaataatg	attaatatat	aacccaaaat	aattagtatg	attggtaagg	6780
aagatatcca	tgttatgttt	ggatgtgagt	ttgatctaga	gcaaagctta	ctagagtcga	6840
ccgatccgtc	gacggcgcg	gcgcctctag	ttgaagacac	gttcattgtct	tcattcgtaag	6900
aagacactca	gtagtcttcg	gccagaatgg	cccggaccga	agcttctgca	ggaattctga	6960
gctagcgaag	ttcctattcc	gaagttccta	ttctctagaa	agtataggaa	cttcagatcc	7020
actag						7025

REIVINDICACIONES

1. Un producto de proteínas de soja obtenido a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tiene un contenido en ácido oleico de al menos 60%, en donde dicho producto tiene al menos una característica seleccionada del grupo que consiste en: blancura mejorada, resistencia reducida de gel y viscosidad reducida cuando se compara con un producto de proteínas de soja obtenido a partir de semillas de soja comerciales utilizando el mismo procedimiento que para obtener el producto de proteínas de soja a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico.
2. El producto de proteínas de soja de la reivindicación 1, en donde:
 - a) el índice de blancura está aumentado en al menos 3%; o
 - b) la resistencia de gel está reducida en al menos 25%; o
 - c) la viscosidad de un producto de proteínas de soja no hidrolizada está reducida en al menos 9%.
3. El producto de proteínas de soja de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho producto proteínico tiene al menos 40 % de proteínas (N x 6,25) sobre una base libre de humedad.
4. El producto de proteínas de soja de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho producto proteínico tiene al menos 65 % de proteínas (N x 6,25) sobre una base libre de humedad.
5. El producto de proteínas de soja de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho producto proteínico tiene al menos 90 % de proteína (N x 6,25) sobre una base libre de humedad.
6. El producto de proteínas de soja de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho producto se selecciona del grupo que consiste en un aislado de proteínas de soja, un concentrado de proteínas de soja, harina de soja, harina fina con toda la grasa, leche de soja en polvo, harina fina desgrasada, leche de soja, proteínas texturizadas, harinas finas texturizadas, concentrados texturizados y aislados texturizados.
7. Un alimento que tiene incorporado el producto de proteínas de soja de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
8. Una bebida que tiene incorporado el producto de proteínas de soja de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
9. Pienso que tiene incorporado el producto de proteínas de soja de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
10. Un método para mejorar la eficacia de secado de un producto de proteínas de soja, que comprende alimentar al menos un producto de proteínas de soja obtenido a partir semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tienen un contenido en ácido oleico de al menos 60% en sólidos de alimentación superiores, a un pasteurizador o un secador en comparación con la alimentación de al menos un producto de proteínas de soja obtenido a partir de semillas de soja comerciales.
11. Un método para mejorar la eficacia de secado de un producto de proteínas de soja, que comprende alimentar al menos un producto de proteínas de soja, obtenido a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tienen un contenido en ácido oleico de al menos 60% con no menos de 14% de sólidos de alimentación, a un pasteurizador o un secador.
12. Un método para mejorar la blancura, reducir la resistencia de gel y/o reducir la viscosidad de un producto de proteínas de soja obtenido a partir semillas de soja comerciales, que comprende preparar un producto de proteínas de soja a partir de semillas de soja con alto contenido en ácido oleico que tienen un contenido en ácido oleico de al menos 60%.
13. Un método según la reivindicación 12, en donde el producto de proteínas de soja es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.

Fig.1

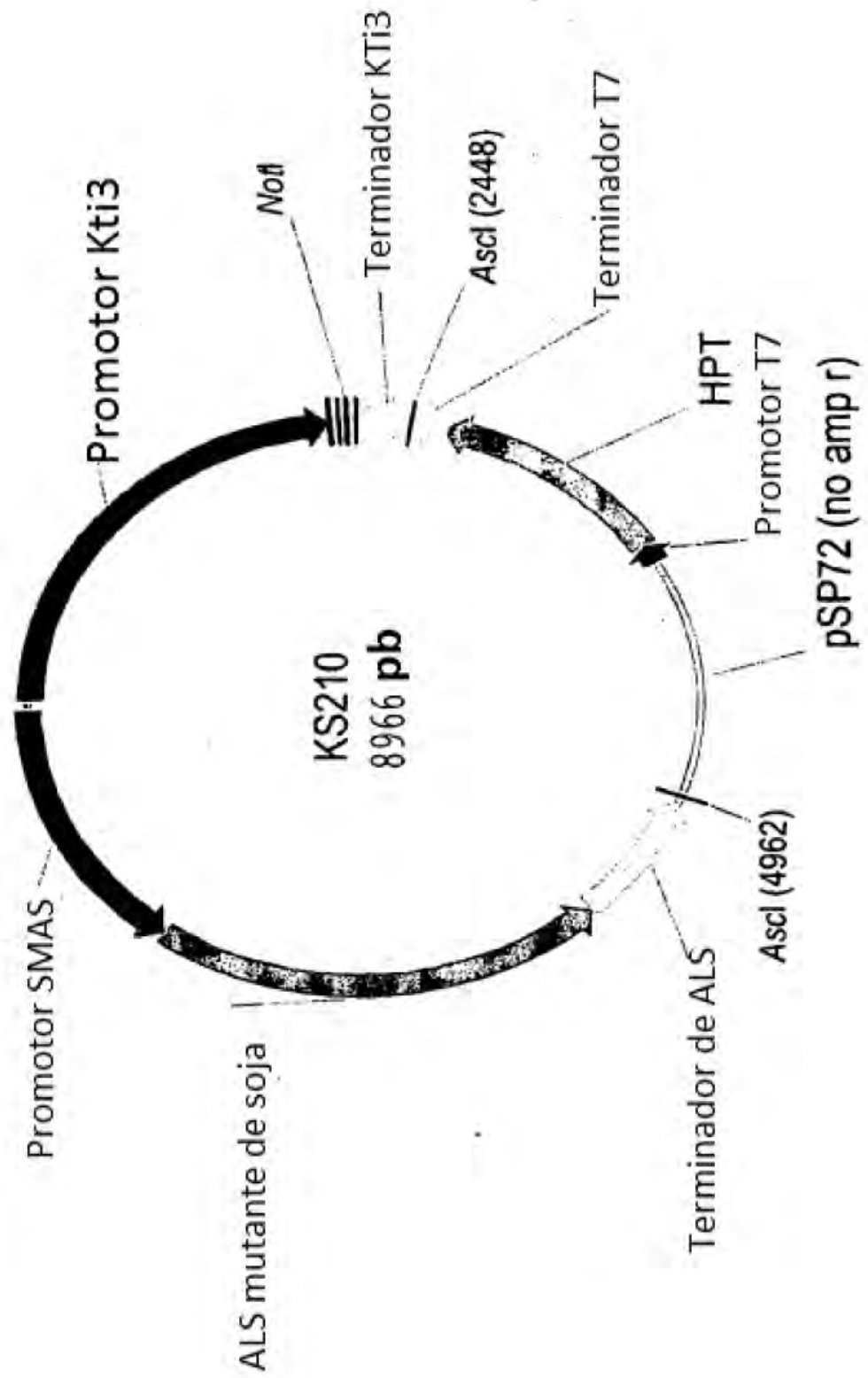


Fig.2

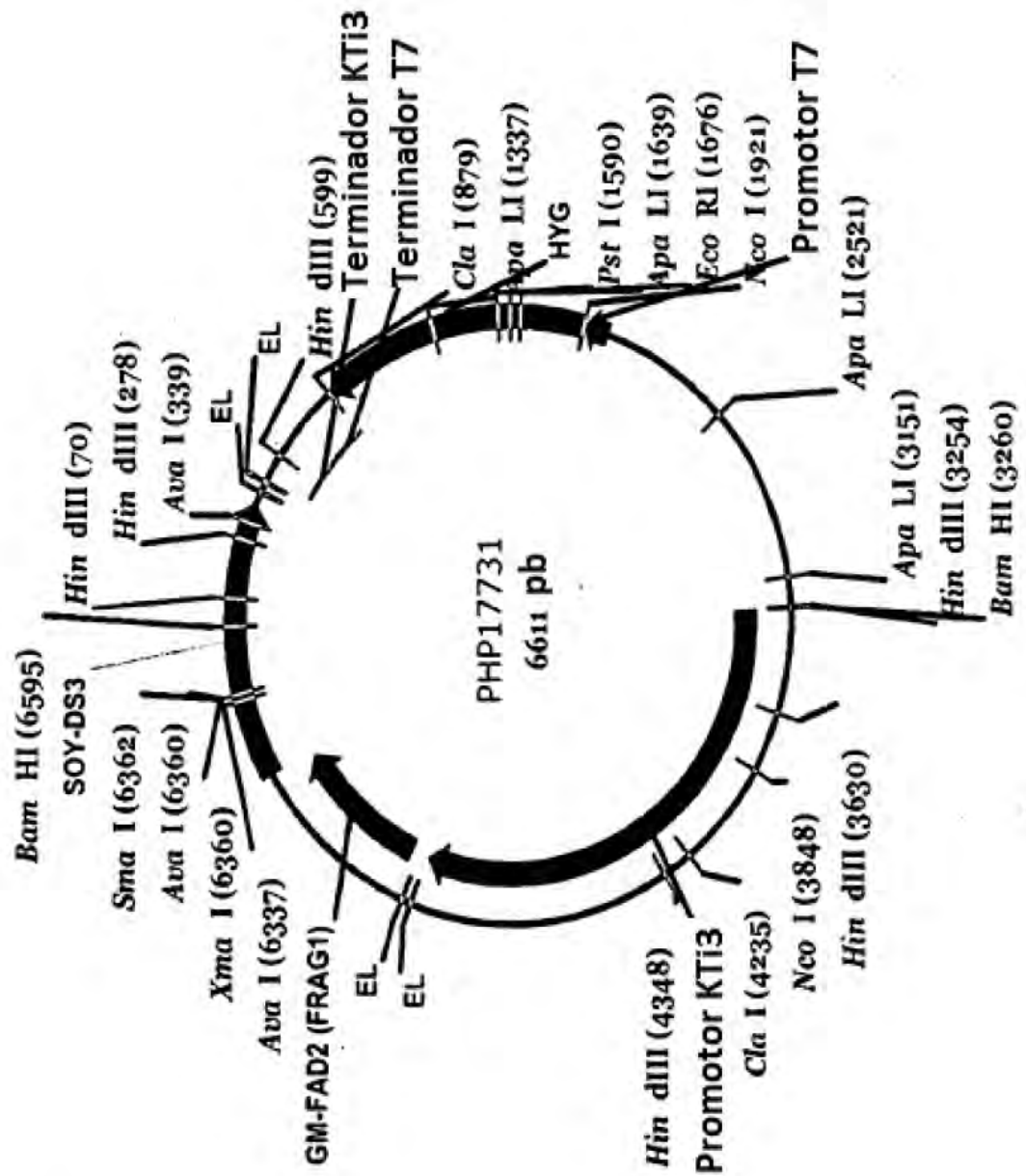


Fig.3

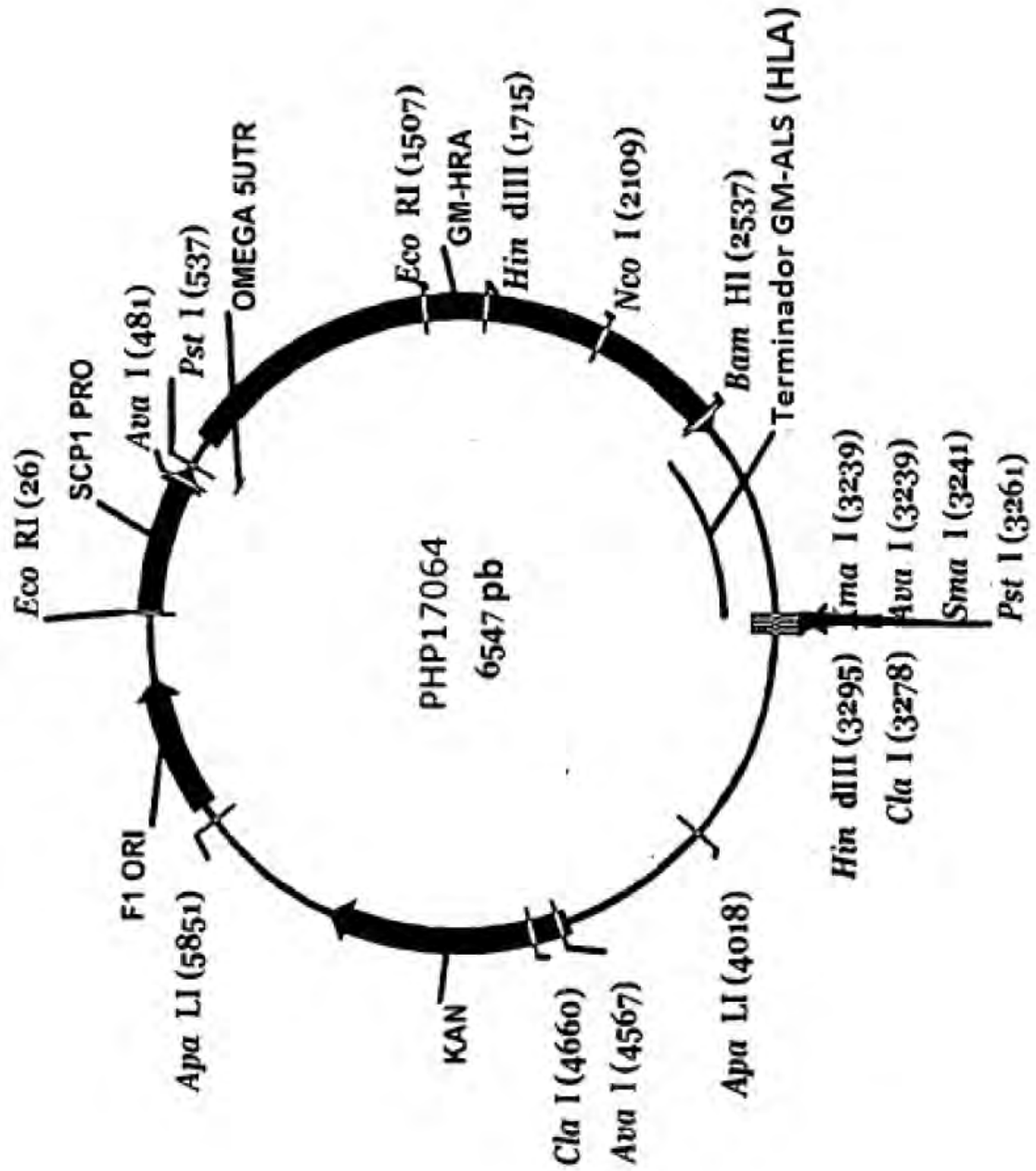


Fig.4

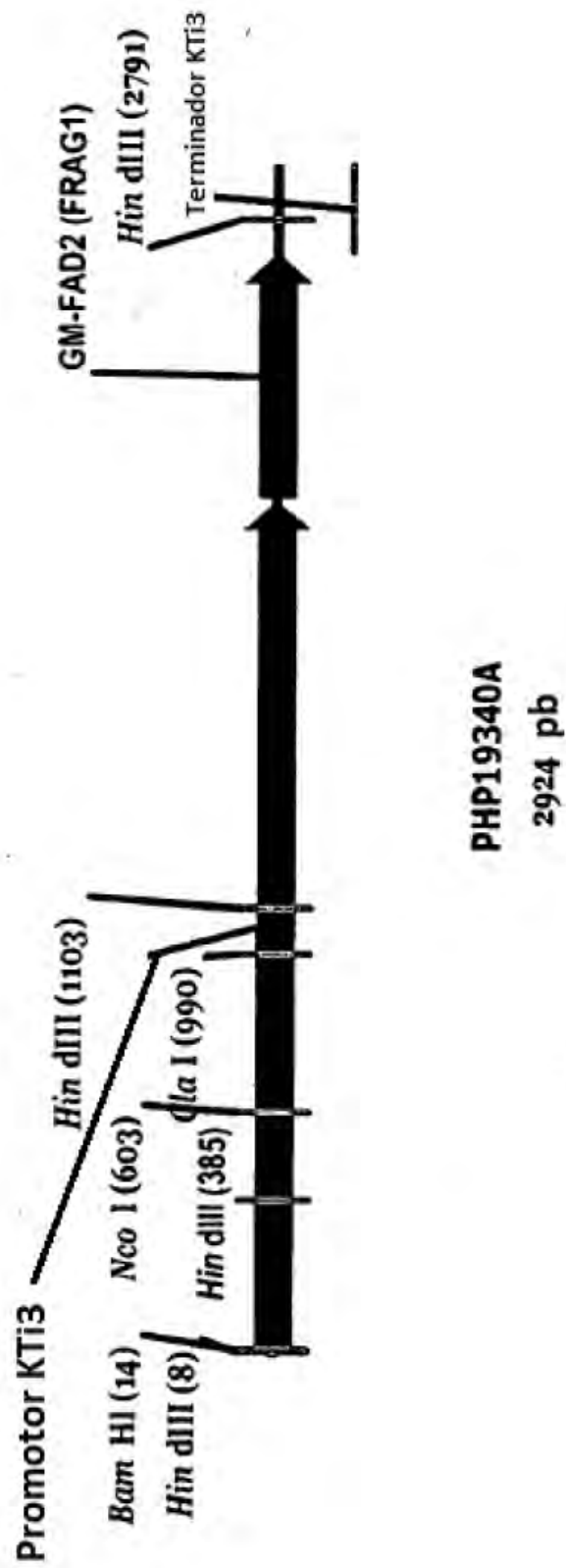


Fig.5

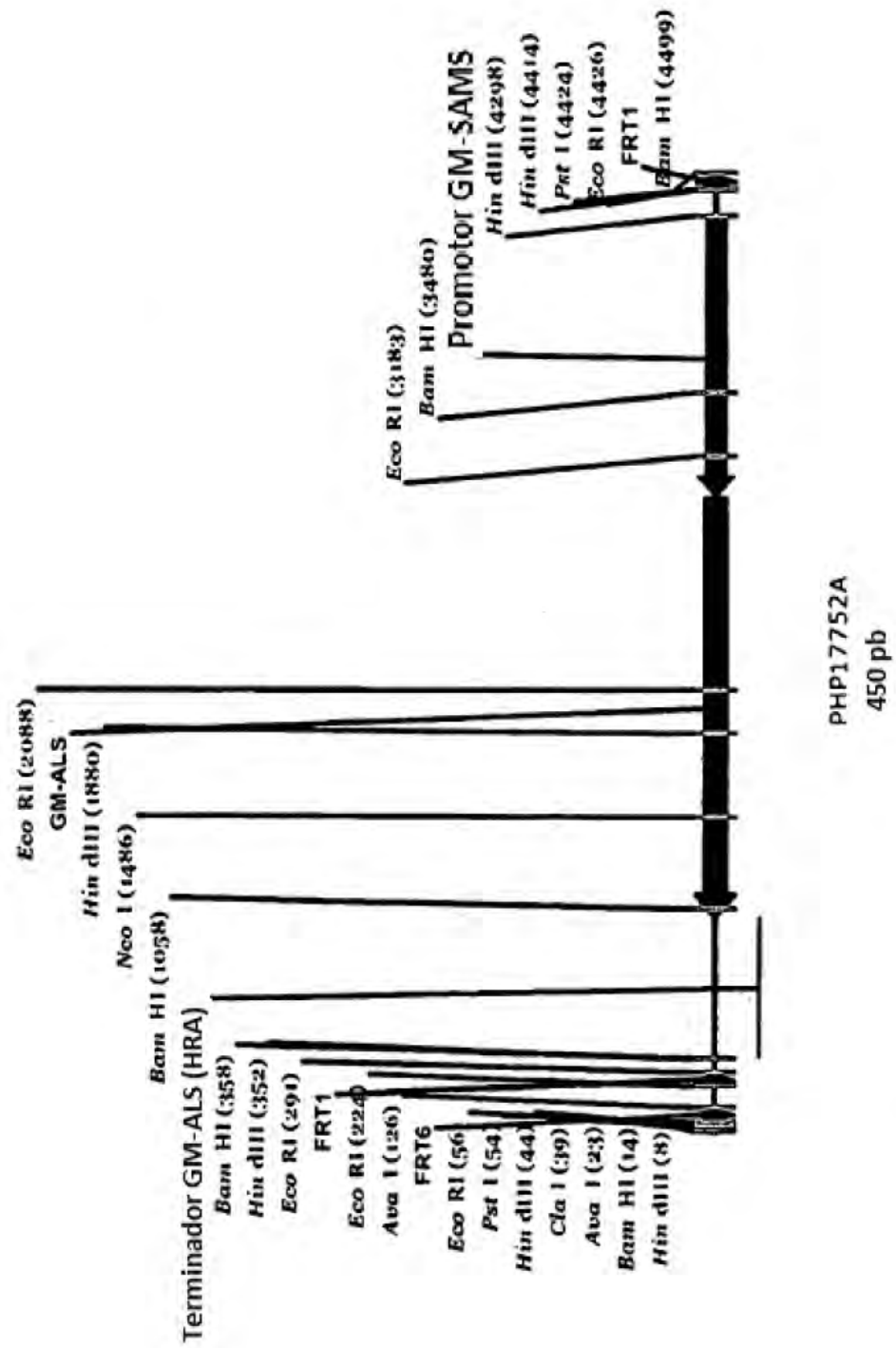


Fig.6

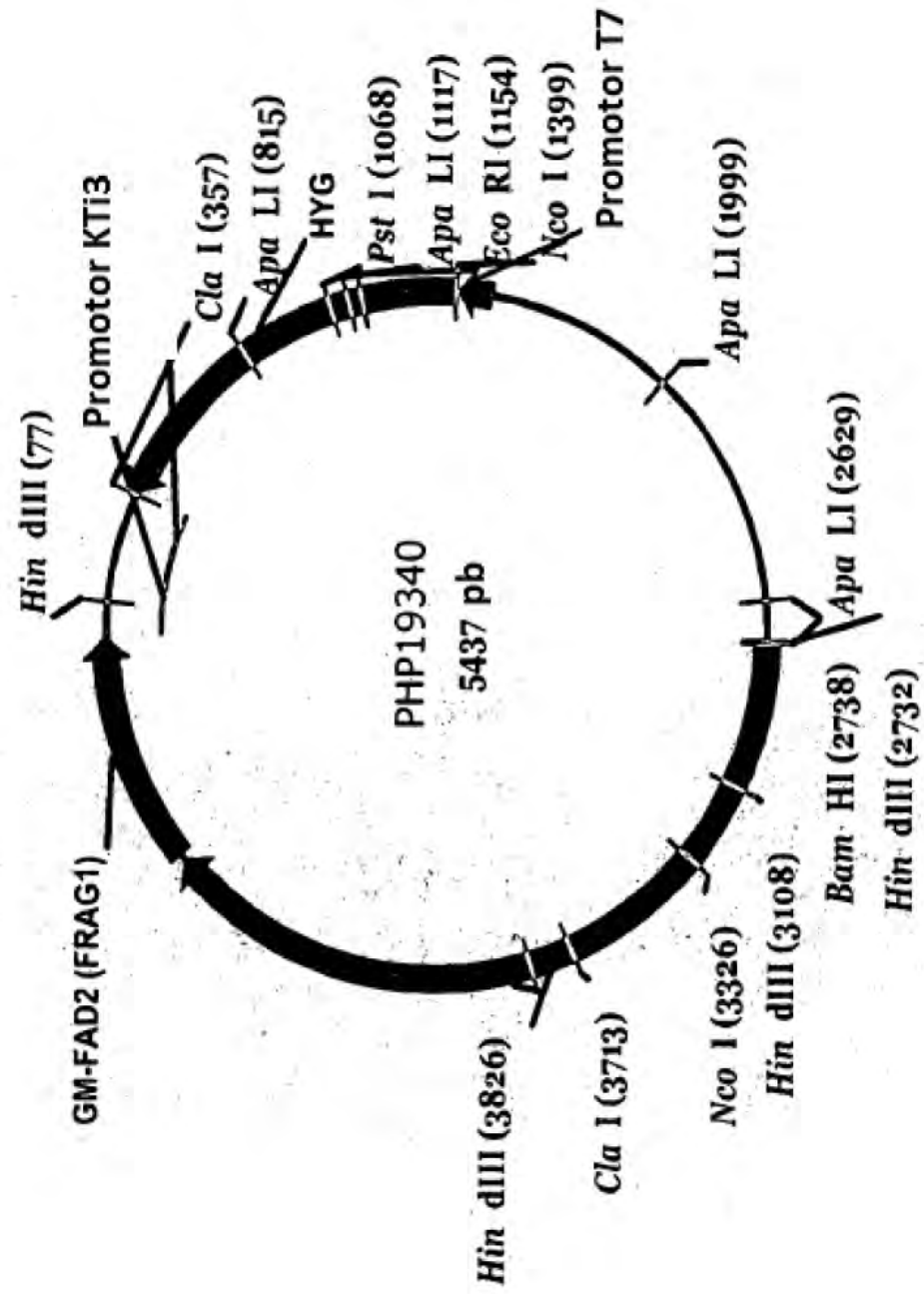


Fig.7

