

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 241**

51 Int. Cl.:

**A23D 9/00** (2006.01)

**C11B 1/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2010 PCT/EP2010/066599**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11054801**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2010 E 10773309 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2496091**

54 Título: **Aceite vegetal que comprende un ácido graso poliinsaturado que tiene al menos 20 átomos de carbono**

30 Prioridad:

**03.11.2009 US 257772 P**  
**22.11.2009 WO PCT/EP2009/065593**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.03.2020**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**VERKOEIJEN, DANIEL;**  
**ZUUR, KRISTIAN y**  
**BIJL, HENDRIK, LOUIS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 750 241 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Aceite vegetal que comprende un ácido graso poliinsaturado que tiene al menos 20 átomos de carbono

- 5 La invención se refiere a un aceite vegetal que comprende un ácido graso poliinsaturado que tiene al menos 20 átomos de carbono (LC-PUFA), como se define en las reivindicaciones, y usos del mismo.

10 Las semillas son fuentes conocidas de ácidos grasos poliinsaturados que tienen 18 átomos de carbono tales como ácido linoleico y ácido gamma linolénico. También se sabe que las plantas pueden modificarse genéticamente de modo que las semillas contengan LC-PUFA. Esto se divulga, por ejemplo, en el documento WO 2008009600.

15 Los autores de la presente invención se dieron cuenta de que la recuperación del LC-PUFA o aceite que contiene LC-PUFA de acuerdo con el documento WO 2008/009600 produce aceite de calidad insuficiente. El documento US 2008/220143 divulga una planta oleaginosa que produce semillas maduras en que el perfil de ácidos grasos totales en la semilla comprende al menos un 8,0 % de ácido araquidónico. También se divulgan semillas obtenidas de dichas plantas y el aceite obtenido de las semillas de dichas plantas. El documento US 2006/111578 divulga procesos para preparar composiciones de aceite que tienen una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados y composiciones de aceite que tienen una baja concentración de ácido alfa linolénico. Además, se refiere a procesos para preparar composiciones de aceite minimizando al mismo tiempo la oxidación y/o minimizando la isomerización de ácidos grasos cis en ácidos grasos trans. Divulga procesos para formar aceite no animal que tiene un valor de anisidina de menos de aproximadamente 3 y que comprende menos de 1 % en peso de ácido graso trans basado en el peso total de los ácidos grasos o derivados de los mismos en el aceite no animal. Wu *et al.* (2005), Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. *Nature Biotechnology*, 23(8), 1013-1017 describe un método de producción de ácidos grasos poliinsaturados muy largos (VLC-PUFAs) tales como ácido araquidónico (AA) y ácido eicosapentaenoico (EPA) en semillas transgénicas de *Brassica juncea* seeds. Kajikawa *et al.* (2014), Production of arachidonic and Eicosapentaenoic Acids in Plants Using Bryophyte Fatty Acid A6-desaturase, A6-Elongase, and A5-Desaturase Genes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(2), 435-444 describe la producción de ácido araquidónico y eicosapentaenoico en plantas transgénicas de tabaco y soja, introduciendo y coexpresando genes de *M. polymorpha* que codifican A6 desaturasa, A6 elongasa y A5 desaturasa en estas. Zambiasi *et al.* (2007), Fatty acid composition of vegetable oils and fats, B. CEPPA, *Curitiba*, v.25, n.1, pág. 111-120 describe la composición de ácidos grasos de varios aceites y grasas vegetales, determinada mediante el uso de cromatografía de gases (GC-FID). Los ácidos grasos insaturados determinados eran, palmitoleico, miristoleico, oleico, linoleico, linolénico, gadolénico, eicosadienoico, erúxico, docosadienoico, nervónico. El documento WO 2006/052662 se refiere a proporcionar composiciones de aceite que tienen una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, combinados con características de estabilidad mejorada y ácidos grasos trans reducidos. Se divulgan procesos para mantener la estabilidad en almacenamiento de un aceite. El documento WO 95/11289 se refiere a la estatzización de poliinsaturados. Estos materiales orgánicos con triple insaturación etilénica o superior se estabilizan mediante la adición de al menos un aceite esencial. Khan y Shahidi (2000), Oxidative Stability of Stripped and Nonstripped Borage and Evening Primrose Oils and Their Emulsions in Water, *JAOCS*, Vol. 77, n.º 9, 963-969 evalúa la estabilidad oxidativa de aceite de borraja y onagra separados y no separados y sus emulsiones en agua. Senanayake y Shahidi (2002), Oxidative Stability of Structured Lipids Produced from Borage (*Borago officinalis* L.) and Evening Primrose (*Oenothera biennis* L.) Oils with Docosahexaenoic Acid, *JAOCS*, Vol. 79, n.º 10 describe la síntesis de lípidos estructurados de aceite de borraja y aceite de onagra rico en ácido  $\gamma$ -linolénico y comparó la capacidad oxidativa de los productos con el aceite de borraja y aceite onagra sin modificar. Choo, Birch y Dufour (2006), Physicochemical and quality characteristics of cold pressed flaxseed oils, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2007), 202-211 se refiere al análisis de aceites de linaza prensados en frío vendidos en Nueva Zelanda. Se midieron, la composición de ácidos grasos, la composición de tocoferol, la humedad y el contenido de materia volátil, los ácidos graso libres, los pigmentos de clorofila, los ácidos fenólicos totales, los flavonoides totales, el valor ácido, la materia insaponificable, el valor de peróxido, los ácidos dienoicos conjugados, el valor de p-anisidina y la extinción específica en el espectro ultravioleta del aceite de linaza. El documento HU 9600336 divulga un proceso para producir una composición de aceite vegetal que tiene ácidos grasos esenciales y que contiene: (a) ácido oleico 18-20; (b) ácido linoleico 45-50; (c) ácido linolénico 13-25; (d) ácido gamma linolénico 5-6; (e) ácido araquidónico 1-1,5; (f) otros diversos ácidos grasos 7,5-15. El documento US 2008/0194685 se refiere plantas oleaginosas transformadas para producir ácido araquidónico, construcciones recombinantes usadas en dichas transformaciones, métodos para producir ácido araquidónico en una planta y usos de aceites y semillas obtenidas de dichas plantas transformadas en una diversidad de aplicaciones de alimentos y piensos.

60 Los autores de la invención se dieron cuenta de que la calidad del LC-PUFA y el aceite que comprende el LC-PUFA es de particular importancia, ya que los LC-PUFA son muy sensibles a la oxidación. Se encuentra que dicha sensibilidad a la oxidación aumenta además con un número creciente de dobles enlaces del LC-PUFA y/o un contenido creciente de LC-PUFA.

65 Un objeto de la invención es proporcionar un proceso para obtener un ácido graso poliinsaturado que tiene al menos 20 átomos de carbono (LC-PUFA) o un ácido que comprende un LC-PUFA a partir de semillas, en el que el LC-PUFA o el aceite que contiene el LC-PUFA tiene una calidad mejorada.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un aceite vegetal que comprende un ácido graso poliinsaturado que tiene al menos 20 átomos de carbono (LC-PUFA), en el que el aceite tiene una calidad mejorada.

5 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un aceite vegetal que comprende un ácido graso poliinsaturado que tiene al menos 20 átomos de carbono (LC-PUFA), que es un aceite que tiene

- (a) un valor de anisidina (AnV) de menos de 25,
- (b) un valor de peróxido (POV) de menos de 10;
- (c) un contenido de triglicéridos de más de un 90 %; y
- 10 (d) un índice de estabilidad de aceite (OSI) de más de 5 horas a 80 °C

en el que el LC-PUFA es ácido araquidónico (ARA) y en el que el aceite vegetal comprende ARA a una concentración de >15 % en peso con respecto a los ácidos grasos totales en el aceite.

15 Además, se describe un proceso para obtener un ácido graso poliinsaturado que tiene al menos 20 átomos de carbono (LC-PUFA) o un aceite que comprende un LC-PUFA de semillas, comprendiendo dicho proceso

(A)

- 20 (i) proporcionar semillas que comprenden un LC-PUFA y/o un aceite que comprende un LC-PUFA; y/o
- (ii) secar las semillas; y/o
- (iii) almacenar las semillas; y/o
- (iv) moler y/o desmenuzar las semillas; y/o
- (v) calentar las semillas; y/o
- 25 (vi) prensar las semillas tal como para exprimir una fracción de aceite

y

30 (B) obtener el LC-PUFA o aceite que comprende el LC-PUFA de las semillas, opcionalmente por extracción con un disolvente.

(i) Plantas y semillas que comprende un LC-PUFA y/o un aceite que comprende un LC-PUFA

35 Las semillas pueden ser cualquier semilla que contenga un LC-PUFA y pueden ser la semilla de cualquier planta adecuada. Preferiblemente, las semillas son las semillas de una planta transgénica. Las plantas adecuadas y semillas se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2005/083093, WO 2008/009600 y WO 2009/130291. Otras plantas y semillas que pueden usarse en la invención se divulgan, por ejemplo, en los documentos WO 2008/100545, WO 2008/124806, WO 2008/124048, WO 2008/128240, WO 2004/071467, WO 2005/059130. Las semillas pueden ser semillas de soja (transgénicas) o de colza (transgénicas). La planta puede ser una planta de soja (transgénica) o una planta de colza (transgénica).

45 En una realización preferida, las semillas son de una planta (transgénica) de la familia *Brassicaceae*, por ejemplo, los géneros *Brassica*, *Camelina*, *Melanosinapis*, *Sinapis*, *Arabidopsis*, por ejemplo, los géneros y especies *Brassica alba*, *Brassica carinata*, *Brassica hirta*, *Brassica napus*, *Brassicaa rapa ssp.*, *Sinapis arvensis*, *Brassica juncea*, *Brassica juncea* var. *juncea*, *Brassica juncea* var. *crispifolia*, *Brassica juncea* var. *foliosa*, *Brassica nigra*, *Brassica sinapioides*, *Camelina sativa*, *Melanosinapis communis*, *Brassica oleracea* o *Arabidopsis thaliana*.

50 Se encuentra que mantener el porcentaje de semillas dañadas bajo, mejora la calidad del LC-PUFA o aceite que contiene el LC-PUFA. El aceite (aislado) puede tener un menor AnV, POV, un mayor OSI y/o un mayor contenido de triglicéridos.

Preferiblemente, menos de un 12 % de las semillas son semillas dañadas totales, preferiblemente menos de un 8 %, preferiblemente menos de un 5 %, preferiblemente menos de un 3 % de las semillas son semillas dañadas totales.

55 Preferiblemente, menos de un 6 % de las semillas son semillas distintivamente inmaduras, preferiblemente menos un 4 %, preferiblemente menos de un 2 %, preferiblemente menos de un 1 % de las semillas son semillas distintivamente inmaduras.

60 Preferiblemente, menos de un 0,5 % de las semillas son semillas calentadas, preferiblemente menos de un 0,3 %, preferiblemente menos de un 0,1 %, preferiblemente menos de un 0,05 % de las semillas son semillas calentadas.

65 En una realización preferida, menos de un 8 % de las semillas son semillas dañadas totales, menos de un 4 % de las semillas son semillas distintivamente inmaduras y menos de un 0,3 % de las semillas son semillas calentadas. En otra realización preferida, menos de un 5 % de las semillas son semillas dañadas totales, menos de un 2 % de las semillas son semillas distintivamente inmaduras y menos de un 0,1 % de las semillas son semillas calentadas. En otra

realización preferida, menos de un 3 % de las semillas son semillas dañadas totales, menos de un 1 % de las semillas son semillas distintivamente inmaduras y menos de un 0,05 % de las semillas son semillas calentadas.

5 Como se usa en este documento, los porcentajes de semillas dañadas totales, semillas distintivamente inmaduras y semillas calentadas se determinan de acuerdo con la Guía Oficial de Clasificación de Semillas de 2001 de la Comisión Canadiense de Semillas (para canola y colza).

10 Las semillas que tienen los porcentajes preferidos de semillas dañadas totales, semillas distintivamente inmaduras y/o semillas calentadas pueden obtenerse por selección apropiada de las semillas después de la recolección.

Además, se describen semillas que comprenden un LC-PUFA, y que tienen porcentajes de semillas dañadas totales, semillas distintivamente inmaduras y/o semillas calentadas como se divulga anteriormente en este documento.

15 Las semillas comprenden al menos un 15 % en peso, preferiblemente al menos un 20 % en peso de un LC-PUFA que es un  $\omega$ -6 LC-PUFA, con respecto a los ácidos grasos totales en las semillas.

Las semillas comprenden al menos un 15 % en peso, preferiblemente al menos un 20 % en peso de ARA, con respecto a los ácidos grasos totales en las semillas.

20 Preferiblemente, las semillas comprenden al menos un 5 % en peso, preferiblemente al menos un 10 % en peso, preferiblemente al menos un 15 % en peso, preferiblemente al menos un 20 % en peso de un  $\omega$ -3 LC-PUFA, con respecto a los ácidos grasos totales en las semillas.

25 Preferiblemente, las semillas comprenden al menos un 5 % en peso, preferiblemente al menos un 10 % en peso, preferiblemente al menos un 15 % en peso, preferiblemente al menos un 20 % en peso de DHA, con respecto a los ácidos grasos totales en las semillas.

30 Preferiblemente, las semillas comprenden menos de un 2 % en peso de ácido erúxico, preferiblemente menos de un 1 % en peso, preferiblemente menos de un 0,5 % en peso basado en los ácidos grasos totales en las semillas.

#### (ii) Secado de las semillas

35 En una realización de la divulgación, el proceso comprende secar las semillas. Se encuentra que disminuir la temperatura de secado mejora la calidad del LC-PUFA o el aceite que contiene el LC-PUFA. Por ejemplo, el aceite (aislado) puede tener un menor AnV, POV, un mayor OSI y/o un mayor contenido de triglicéridos.

40 En una realización preferida, el proceso divulgado comprende secar las semillas a una temperatura por debajo de 40 °C, preferiblemente por debajo de 35 °C, más preferiblemente por debajo de 30 °C, más preferiblemente por debajo de 25 °C. Como se usa en este documento, las temperaturas de secado se refieren a la temperatura del producto en la secadora. Por ejemplo, si la secadora es una secadora de lecho fluido, la temperatura de secado se refiere a la temperatura del lecho, si se encuentra que disminuir las temperaturas hasta por debajo de los límites superiores preferidos mejora la calidad del aceite y/o el LC-PUFA.

45 El secado puede ser por cualquier método adecuado. El secado puede ser por secado natural al aire. Preferiblemente, se usa una secadora que evita o minimiza la formación de puntos calientes. En una realización preferida, el secado se logra usando una secadora de lecho fluido. En una realización preferida, se usa aire acondicionado, preferiblemente que tiene un punto de rocío de <15 °C, preferiblemente <10 °C, preferiblemente <5 °C. Esto mejora además la calidad del aceite.

50 Antes del secado, las semillas pueden tener un contenido de humedad de, por ejemplo, de un 10 a un 25 % en peso, tal como de un 15 a un 25 % en peso.

55 El proceso de acuerdo con la divulgación puede comprender el secado de las semillas, que produce un contenido de humedad de menos de un 15 % en peso, por ejemplo, menos de un 12 % en peso, por ejemplo, menos de un 10 % en peso, por ejemplo, menos de un 9,5 % en peso, por ejemplo, por encima de un 6 % en peso, por ejemplo, por encima de un 7 % en peso, por ejemplo, por encima de un 8 % en peso. El contenido de humedad puede ser, por ejemplo, entre un 6 y un 15 % en peso, por ejemplo, entre un 7 y un 12 % en peso, por ejemplo, entre un 8 y un 10 % en peso. Obtener semillas que tienen un contenido de humedad entre los intervalos mencionados anteriormente mejora la calidad del aceite y/o el LC-PUFA. Como se usa en este documento, el contenido de humedad se calcula en una base de peso húmedo, es decir, basándose en el peso total de las semillas (incluyendo materia seca, lípidos y humedad). Puede determinarse por un experto en la materia.

65 En un aspecto adicional, se describen semillas que comprenden un LC-PUFA, que tienen un contenido humedad de menos de un 15 % en peso, por ejemplo, menos de un 12 % en peso, por ejemplo, menos de un 10 % en peso, por ejemplo, menos de un 9,5 % en peso, por ejemplo por encima de un 6 % en peso, por ejemplo, por encima de un 7 % en peso, por ejemplo, por encima de un 8 % en peso. El contenido de humedad puede ser, por ejemplo, entre un 6 y

un 15 % en peso, por ejemplo, entre un 7 y un 12 % en peso, por ejemplo, entre un 8 y un 10 % en peso. Preferiblemente, las semillas tienen un porcentaje de semillas dañadas totales, semillas distintivamente inmaduras y/o semillas calentadas como se divulga anteriormente en este documento. En una realización preferida, las semillas se pueden obtener por el proceso de secado que se divulga anteriormente en este documento.

5 En una realización preferida, el proceso comprende secar semillas que tienen los valores preferidos para las semillas dañadas totales, semillas distintivamente inmaduras como se menciona anteriormente en este documento.

10 (iii) Almacenamiento de las semillas

En diversos estadios pueden almacenarse las semillas. Se encuentra que una disminución de la temperatura de almacenamiento mejora la calidad del LC-PUFA y/o aceite que contiene el LC-PUFA. Por ejemplo, el aceite (aislado) puede tener un menor AnV, POV, un mayor OSI y/o un mayor contenido de triglicéridos.

15 Preferiblemente, el proceso comprende almacenar las semillas a una temperatura por debajo de 10 °C, preferiblemente por debajo de 5 °C, preferiblemente por debajo de 0 °C, preferiblemente por debajo de menos 5 °C, preferiblemente por debajo de menos 10 °C. No hay límite inferior específico para la temperatura de almacenamiento. El proceso puede comprender el almacenamiento de las semillas a una temperatura por encima de menos 30 °C.

20 Preferiblemente, se almacenan semillas que tienen un contenido de humedad de menos de un 15 % en peso, por ejemplo, menos de un 12 % en peso, por ejemplo, menos de un 10 % en peso, por ejemplo, menos de un 9,5 % en peso, por ejemplo, por encima de un 6 % en peso, por ejemplo, por encima de un 7 % en peso, por ejemplo, por encima de un 8 % en peso. El contenido de humedad puede ser, por ejemplo, entre un 6 y un 15 % en peso, por ejemplo, entre un 7 y un 12 % en peso, por ejemplo, entre un 8 y un 10 % en peso. Obtener semillas que tengan un contenido de humedad entre los intervalos mencionados anteriormente mejora la calidad del aceite y/o el LC-PUFA. Como se usa en este documento, el contenido de humedad se calcula en una base de peso húmedo, es decir, basándose en el peso total de las semillas (incluyendo materia seca, lípidos y humedad). Puede determinarse por un experto en la materia.

30 Los contenidos de humedad preferidos pueden obtenerse secando las semillas como se describe anteriormente en este documento.

35 En un aspecto adicional, se describe un proceso para almacenar semillas que comprenden un LC-PUFA, que es un proceso que comprende almacenar las semillas a una temperatura por debajo de 10 °C, preferiblemente por debajo de 5 °C, preferiblemente por debajo de 0 °C, preferiblemente por debajo de menos 5 °C, preferiblemente por debajo de menos 10 °C. Ni hay límite inferior específico para la temperatura de almacenamiento. El proceso puede comprender el almacenamiento de las semillas a una temperatura por encima de menos 30 °C.

40 Preferiblemente, el proceso comprende almacenar semillas que tienen un contenido de humedad como divulga anteriormente en este documento.

Preferiblemente, el proceso comprende almacenar semillas que tienen un porcentaje de semillas dañadas totales, semillas distintivamente inmaduras, y/o semillas calentadas como se divulga anteriormente en este documento.

45 Preferiblemente, el proceso comprende almacenar semillas que se pueden obtener por el proceso de secado como se divulga anteriormente en este documento.

50 Las semillas pueden almacenarse durante cualquier periodo adecuado. Las semillas pueden almacenarse, por ejemplo, durante al menos 1 días, por ejemplo, al menos 1 semana, por ejemplo, al menos 2 semanas, por ejemplo, al menos 1 mes, por ejemplo, al menos 3 meses. No hay límite superior específico para el periodo de almacenamiento. Las semillas, por ejemplo, pueden almacenarse durante menos de 12 meses, por ejemplo, menos de 6 meses.

(iv) Trituración y/o desmenuzado de las semillas

55 El proceso puede comprender la trituración o desmenuzado de las semillas. Esto puede facilitar la recuperación del LC-PUFA o aceite que contiene el LC-PUFA.

(v) Calentamiento de las semillas

60 En una realización preferida de la divulgación, el proceso comprende calentar las semillas, por ejemplo, a una temperatura por encima de 60 °C.

65 El proceso de acuerdo con la divulgación puede comprender calentamiento de las semillas a una temperatura relativamente baja. El proceso, por ejemplo, puede comprender calentamiento de las semillas a una temperatura entre 50 y 90 °C, por ejemplo, entre 60 y 80 °C, preferiblemente durante un periodo entre 2 y 60 minutos, preferiblemente

entre 5 y 30 minutos. Si se selecciona una temperatura aumentada, la duración del calentamiento se disminuye preferiblemente.

5 Se encuentra que el calentamiento de las semillas de acuerdo con protocolos preferidos divulgados en este documento mejora la calidad del LC-PUFA y/o aceite que contiene el LC-PUFA. Por ejemplo, el aceite (aislado) puede tener un menor AnV, POV, un mayor OSI y/o un mayor contenido de triglicéridos.

10 En una realización preferida, el proceso puede comprender calentamiento de las semillas a una alta tasa. El proceso puede comprender, por ejemplo, calentamiento de las semillas, por lo que la temperatura pasa de 40 a 70 °C en menos de 1 minuto, preferiblemente menos de 30 segundos, preferiblemente menos de 20 segundos. El proceso puede comprender, por ejemplo, calentamiento de las semillas, por lo que la temperatura pasa de 40 a 100 °C en menos de 1 minuto, preferiblemente menos de 30 segundos, preferiblemente menos de 20 segundos.

15 El proceso de acuerdo con la divulgación puede comprender calentamiento de las semillas usando vapor supercaliente. El proceso puede comprender, por ejemplo, poner en contacto las semillas con vapor supercaliente.

20 Preferiblemente, el proceso de acuerdo con la divulgación comprende calentamiento de las semillas a una temperatura relativamente alta, por ejemplo, entre 120 y 160 °C durante un periodo relativamente corto. El proceso puede comprender, por ejemplo, mantener las semillas a una temperatura por encima de 120 °C, por ejemplo, por debajo de 160 °C, durante un periodo de menos de 8 minutos, por ejemplo, menos de 5 minutos, por ejemplo, menos de 3 minutos, por ejemplo, menos de 2 minutos. El mantenimiento de las semillas a una temperatura entre 120, por ejemplo, por debajo y 160 °C puede ser durante un periodo de al menos 5 segundos, preferiblemente al menos 10 segundos.

25 Preferiblemente, las semillas se enfrían a una tasa relativamente alta. Preferiblemente, la temperatura de las semillas se disminuye desde la temperatura máxima hasta una temperatura de 40 °C en menos de 60 minutos, preferiblemente menos de 30 minutos, preferiblemente menos de 15 minutos.

30 De acuerdo con la divulgación, los protocolos pueden usarse por separado o en combinación. Por ejemplo, el calentamiento a una tasa alta puede combinarse con mantenimiento de las semillas a una temperatura preferida durante un periodo relativamente corto y/o con una tasa de enfriamiento rápido.

35 El calentamiento no se limita a una fase específica del proceso. El calentamiento puede lograrse antes o después de cualquier molienda (por ejemplo, trituración o desmenuzado) de las semillas. La divulgación proporciona además un proceso para calentamiento de las semillas que comprenden un LC-PUFA, por el que las semillas se calientan como se divulga anteriormente en este documento.

(vi) Prensado de las semillas tal como para exprimir una fracción de aceite

40 El prensado de las semillas tal como para exprimir una fracción de aceite puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica. Puede usarse una prensa de tornillo. En una realización preferida, la invención comprende prensado de las semillas para exprimir aceite usando una prensa, por ejemplo, una prensa de tornillo, que está enfría.

(vii) Extracción de aceite de las semillas con un disolvente

45 El proceso de acuerdo con la divulgación puede comprender extracción de aceite de las semillas con un disolvente. Puede usarse cualquier disolvente adecuado, por ejemplo, un éster alquílico C<sub>1-10</sub> (por ejemplo, acetato de etilo o butilo), tolueno, un alcohol C<sub>1-3</sub> (por ejemplo, metanol, propanol), alcanos C<sub>3-6</sub> (por ejemplo, hexano) o un fluido supercrítico (por ejemplo, CO<sub>2</sub> líquido o propano supercrítico). Preferiblemente, el disolvente es un disolvente apolar, por ejemplo, un alcano C<sub>3-C<sub>8</sub></sub> (preferiblemente hexano) o un fluido supercrítico (preferiblemente CO<sub>2</sub> supercrítico o propano supercrítico). La extracción del aceite con un disolvente apolar tiene la ventaja de que se obtiene un aceite con un contenido aumentado de triglicéridos.

50 En una realización preferida de la divulgación, la relación ponderal de disolvente:semillas es de al menos 3:1, preferiblemente de al menos 5:1. Esto posibilita una extracción más completa del aceite, contribuyendo de este modo a la seguridad de la torta consumida resultante después de la extracción del aceite de las semillas.

55 En una realización preferida, el proceso de acuerdo con la divulgación comprende prensado de las semillas para exprimir el aceite, produciendo un aceite prensado y una torta oleaginosa, y obtener aceite de la torta oleaginosa por extracción con disolvente.

60

Purificación del aceite

La purificación del aceite puede comprender desgomado, refinado, blanqueado y/o desodorización. Estas son etapas conocidas y pueden realizarse por los expertos en la materia.

5 El aceite se desodoriza, y la desodorización se logra a una temperatura por debajo de 200 °C, preferiblemente por debajo de 190 °C, preferiblemente por debajo de 185 °C. Disminuir la temperatura de desodorización hasta por debajo de valores preferidos mejora la calidad del aceite.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un proceso para purificar un aceite vegetal que comprende un LC-PUFA de acuerdo con las reivindicaciones, comprendiendo dicho proceso la desodorización del aceite a una temperatura por debajo de 200 °C, preferiblemente por debajo de 190 °C, preferiblemente por debajo de 185 °C.

15 En un aspecto de la invención, el aceite de acuerdo con la invención es un aceite crudo y la invención proporciona un proceso para obtener un aceite vegetal purificado que comprende un LC-PUFA, comprendiendo dicho proceso purificar el aceite crudo, de acuerdo con las reivindicaciones.

PUFA y aceites

20 Como se usa en este documento, se usan las siguientes abreviaturas a lo largo de toda la solicitud:

PUFA se refiere a un ácido graso poliinsaturado

LC-PUFA (ácido graso poliinsaturado de cadena larga) se refiere a un PUFA que tiene al menos 20 átomos de carbono

25 HUFA (ácido graso altamente insaturado) se refiere a un PUFA que tiene al menos tres dobles enlaces

LC-HUFA (ácido graso altamente insaturado de cada larga) se refiere a un ácido graso poliinsaturado que tiene al menos 20 átomos de carbono y al menos tres dobles enlaces.

30 De acuerdo con la invención, el LC-PUFA incluye ácido araquidónico (ARA).

El aceite vegetal puede ser cualquier aceite vegetal que contenga ARA. El aceite vegetal puede obtenerse de una planta, por ejemplo, una planta transgénica o semillas de una planta (transgénica). Ejemplo de plantas se divulgan anteriormente en este documento.

35 El aceite vegetal de acuerdo con la invención tiene un valor de anisidina (AnV) de menos de 25. Preferiblemente, el aceite de acuerdo con la invención tiene un AnV, <20 % preferiblemente <15, preferiblemente <10, preferiblemente <5, preferiblemente <3, preferiblemente <2. El aceite vegetal puede tener, por ejemplo, un AnV >0,1, por ejemplo, >0,5, por ejemplo, >1. El AnV puede medirse de acuerdo con AOCS Cd-18-90.

40 El aceite vegetal de acuerdo con la invención también tiene un valor de peróxido (POV) de menos de 10. Preferiblemente, el aceite de acuerdo con la invención tiene un POV <5, preferiblemente <2, preferiblemente <1,5, preferiblemente <1, preferiblemente <0,5. El aceite vegetal puede tener, por ejemplo, un POV >0,1, por ejemplo, 0,2. El POV puede medirse de acuerdo con AOCS Cd-8-53. La unidad (para POV) es habitualmente mequiv./kg.

45 El aceite vegetal de acuerdo con la invención también tiene un contenido de triglicéridos >90 %, por ejemplo, >91 %, por ejemplo, >93 %, por ejemplo, >95 %, por ejemplo, >96 %, por ejemplo, 97 %. El aceite de acuerdo con la invención puede tener, por ejemplo, un contenido de triglicéridos <99 %, por ejemplo, <98 %. El contenido de triglicéridos puede medirse usando RMN.

50 En una realización preferida, el aceite vegetal de acuerdo con la invención tiene un contenido de diglicéridos de menos de un 8 %. Preferiblemente, el aceite de acuerdo con la invención tiene un contenido de diglicéridos <5 %, preferiblemente <3 %, preferiblemente <2 %, preferiblemente <1 %. El aceite de acuerdo con la invención puede tener, por ejemplo, un contenido de diglicéridos >0,1 %, por ejemplo, >0,2 %, por ejemplo, >0,5 %. El contenido de diglicéridos puede determinarse usando RMN.

55 En una realización preferida, el aceite vegetal de acuerdo con la invención tiene un contenido de ácidos grasos libres de menos de un 5 %. Preferiblemente, el aceite de acuerdo con la invención tiene un contenido de ácidos grasos libres <3 %, preferiblemente <2 %, preferiblemente <1 %, preferiblemente <0,5 %, preferiblemente <0,2 %, preferiblemente <0,1 %. El aceite de acuerdo con la invención puede tener, por ejemplo, un contenido de ácidos grasos libres >0,01 %, por ejemplo, 0,02 %. El contenido de ácidos grasos libres puede determinarse usando AOCS Ca 5a-40.

60 En una realización preferida, el aceite vegetal de acuerdo con la invención tiene un contenido de esteroles de menos de un 3 %. Preferiblemente, el aceite de acuerdo con la invención tiene un contenido de esteroles de preferiblemente <2 %, preferiblemente <1,5 %, preferiblemente 1 %, preferiblemente <0,8 %, preferiblemente <0,5 %. El aceite de acuerdo con la invención puede tener, por ejemplo, un contenido de esteroles >0,1 %, por ejemplo, >0,2 %. Como se usa en este

65

documento, el contenido de esteroles se refiere al contenido de esteroles total, incluyendo esteroles libres y ésteres de esteroles. El contenido de esteroles puede medirse usando RMN.

5 En una realización preferida, el aceite vegetal de acuerdo con la invención tiene un contenido de fitosterol de menos de un 3 %. Preferiblemente, el aceite de acuerdo con la invención tiene un contenido de fitosterol <2 %, preferiblemente <1,5 %, preferiblemente <1 %, preferiblemente <0,8 %, preferiblemente <0,6 %, preferiblemente <0,5 %. El aceite de acuerdo con la invención puede comprender, por ejemplo, fitosterol y puede tener, por ejemplo, un contenido de fitosterol >0,05 %, por ejemplo, >0,1 %, por ejemplo, >0,2 %. Como se usa en este documento, el contenido de fitosterol se refiere al contenido de fitosterol total, incluyendo fitosterol libre y ésteres de fitosterol. El contenido de fitosterol puede determinarse usando RMN.

15 El aceite vegetal de acuerdo con la invención también tiene un índice de estabilidad de aceite (OSI) de más de 5 horas a 80 °C. Preferiblemente, el aceite de acuerdo con la invención tiene un OSI >8 horas a 80 °C, preferiblemente >10 horas a 80 °C, preferiblemente >15 horas a 80 °C, preferiblemente >20 horas a 80 °C, por ejemplo, <50 horas a 80 °C, por ejemplo, <30 horas a 80 °C, por ejemplo, <25 horas a 80 °C. El OSI puede medirse de acuerdo con AOCS Cd 12b-92.

20 El aceite comprende ácido araquidónico (ARA) a una concentración >15 % en peso con respecto a los ácidos grasos totales en el aceite, preferiblemente >18 % en peso, preferiblemente >20 % en peso, preferiblemente >25 % en peso, preferiblemente >30 % en peso. El aceite puede comprender, por ejemplo, ácido araquidónico (ARA) a una concentración de <50 % en peso, por ejemplo, <40 % en peso, por ejemplo, <25 % en peso, por ejemplo, <22 % en peso con respecto a los ácidos grasos totales en el aceite.

25 Preferiblemente, la concentración sumada de PUFA que tienen al menos 3 dobles enlaces es de al menos un 20 % en peso con respecto a los ácidos grasos totales en el aceite, por ejemplo, al menos un 30 % en peso, por ejemplo, al menos un 35 % en peso, por ejemplo, al menos un 40 % en peso. La concentración sumada de PUFA que tienen al menos 3 dobles enlaces puede ser, por ejemplo, de menos de un 90 % en peso, por ejemplo, menos de un 80 % en peso, por ejemplo, menos de un 70 % en peso, por ejemplo, menos de un 60 % en peso.

30 En las reivindicaciones se divulgan aspectos, realizaciones y características preferidas adicionales.

La invención se divulga además con referencia a los siguientes ejemplos sin limitarse a ellos.

### Ejemplos

35 Se obtienen semillas que contienen un 19 % de ácido araquidónico (con respecto a los ácidos grasos totales) de plantas de *Brassica* transgénicas que se transforman usando los procedimientos descritos en el documento WO 2008009600.

40 Las semillas tienen las siguientes especificaciones (determinadas de acuerdo con la Guía Oficial de Clasificación de Semillas de 2001 de la Comisión Canadiense de Semillas): distintivamente inmaduras <2 %, dañadas totales <5 %.

45 Las semillas, que tienen un contenido de humedad de un 17 % en peso, se secan usando una secadora de lecho fluido. La temperatura del lecho es de 28 °C. Se usa aire acondicionado que tiene un punto de rocío de 10 °C. Las semillas secadas tienen un contenido de humedad de un 8,5 % en peso.

Antes de procesar adicionalmente las semillas secadas se almacenan a una temperatura de menos 20 °C.

50 Después del almacenamiento (3 meses), las semillas se desmenuzan usando un proceso de desmenuzado convencional.

Los copos posteriormente se calientan hasta que alcanzan una temperatura de 130 °C en 20 segundos usando vapor supercaliente. Los copos se mantienen a esta temperatura durante 1 minuto y se enfrían hasta 40 °C en 30 minutos.

55 Después del tratamiento térmico, los copos se suministran a un expulsor refrigerado para obtener un aceite prensado. La biomasa que sale del expulsor se extrae usando hexano (relación de hexano:biomasa = 5:1) en un extractor a contracorriente sumergido a una temperatura de 40 °C. El hexano se evapora, produciendo un aceite extraído con hexano. El aceite prensado y el aceite extraído con hexano se combinan produciendo un aceite crudo.

60 El aceite crudo se purifica usando desgomado (tratamiento ácido), purificación alcalina (neutralización) y blanqueado usando técnicas convencionales. Después del blanqueado el aceite se desodoriza con vapor al vacío a una temperatura de 180 °C.

Las características del aceite crudo y refinado se dan en la tabla a continuación.

65

	EJEMPLO		EXPERIMENTO DE REFERENCIA	
	Aceite crudo	Aceite refinado	Aceite crudo	Aceite refinado
Anisidina	20	9	55	27
POV	5	<1	11	<1
Contenido de triglicéridos	95 %	97 %	86 %	88 %
OSI a 80 °C	>10 h	>10 h	2 h	4 h

Experimento de referencia

Semillas como se describe en el ejemplo 1 se tratan de la siguiente manera para recuperar el aceite.

- 5 Las semillas, que tienen un contenido de humedad de un 17 % en peso se secan usando una secadora de semillas de llama abierta vertical a una temperatura de 70 °C provocando un contenido de humedad de un 8,5 % en peso. Antes del procesamiento adicional, las semillas secadas se almacenan a temperatura ambiente.
- 10 Después de almacenamiento (3 meses), las semillas se desmenuzan usando un proceso de desmenuzado convencional.
- Después de desmenuzar las semillas se vaporizan a una temperatura de 100 °C durante 30 minutos.
- 15 Después del tratamiento térmico, los copos se suministran a un expulsor para obtener un aceite prensado. La biomasa que sale del expulsor se extrae usando hexano (relación de hexano:biomasa = 5:1) en un extractor de contracorriente sumergido a una temperatura de 40 °C. El hexano se evapora, produciendo un aceite extraído con hexano. El aceite prensado y el aceite extraído con hexano se combinan produciendo un aceite crudo.
- 20 El aceite crudo se purifica usando desgomado (tratamiento ácido), purificación alcalina (neutralización) y blanqueado usando técnicas convencionales. Después del blanqueado, el aceite se desodoriza por vapor al vacío a una temperatura de 180 °C.

*RMN de <sup>1</sup>H (para determinar el contenido de triglicéridos)*

- 25 Se pesan aproximadamente 12 mg de una muestra de aceite de forma precisa en un vial de vidrio y se pesan aproximadamente 12 mg de *p*-nitrotolueno de forma precisa en la parte superior. La muestra se disuelve en CDCl<sub>3</sub> y se registra el espectro de RMN de <sup>1</sup>H en un Bruker Avance III 600, equipado con una criosonda, que funciona a una frecuencia de protones de 600 MHz y una temperatura de sonda de 26,85 °C (300 °K). El espectro para la
- 30 cuantificación se registra con un impulso de excitación de 60-90 ° usando parámetros cuantitativos convencionales con un retardo de relajación de 30 s.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un aceite vegetal que comprende un ácido graso poliinsaturado que tiene al menos 20 átomos de carbono (LC-PUFA), que es un aceite que tiene
- (a) un valor de anisidina (AnV) de menos de 25,
  - (b) un valor de peróxido (POV) de menos de 10;
  - (c) un contenido de triglicéridos de más de un 90 %; y
  - (d) un índice de estabilidad de aceite (OSI) de más de 5 horas a 80 °C
- 10 en el que el LC-PUFA es ácido araquidónico (ARA) y en el que el aceite vegetal comprende ARA a una concentración de >15 % en peso con respecto a los ácidos grasos totales en el aceite.
- 15 2. Un aceite de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene un valor de anisidina (AnV) de menos de 25.
3. Un aceite de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, que tiene un valor de peróxido (POV) de menos de 10.
- 20 4. Un aceite de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que tiene un contenido de triglicéridos de al menos un 90 %.
5. Un aceite de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que es un aceite que tiene un índice de estabilidad de aceite (OSI) de más de 5 horas a 80 °C.
- 25 6. Un aceite de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la concentración sumada de PUFA que tienen al menos 3 dobles enlaces es de al menos un 20 % en peso con respecto a los ácidos grasos totales en el aceite.
- 30 7. Un aceite de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, obtenido de una planta transgénica.
8. Un aceite de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, obtenido de una planta de la familia *Brassicaceae*.
9. Un aceite de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, obtenido de una planta del género *Brassica*.
- 35 10. Un aceite de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que es un aceite crudo.
11. Proceso en el que el aceite crudo de acuerdo con la reivindicación 10 se purifica, en el que dicha purificación comprende desodorizar el aceite a una temperatura por debajo de 200 °C, preferiblemente por debajo de 190 °C, preferiblemente por debajo de 185 °C.
- 40 12. Un producto alimenticio (para seres humanos o animales), que comprende un aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 45 13. Una fórmula infantil que comprende un aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
14. Una composición cosmética que comprende un aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 50 15. El uso de un aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la preparación de producto alimenticio (para seres humanos o animales).
16. El uso de un aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la preparación de una fórmula infantil.
- 55 17. El uso de un aceite de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la preparación de un producto cosmético.