



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 241 446**

② Número de solicitud: 200301617

⑤ Int. Cl.:

C11B 1/00 (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **04.07.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2005**

Fecha de la concesión: **26.01.2007**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2007**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Domínguez Giménez, Juan;
Haro Bailón, Antonio de;
Nabloussi, Abdelghani;
Velasco Varo, Leonardo y
Fernández Martínez, José María**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido linolénico.**

㉑ Resumen:

Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido linolénico.

Aceite vegetal obtenido de semillas de mostaza etíope (*Brassica carinata*) modificadas mediante un proceso de mejora genética convencional. Este aceite carece de ácido erúxico y presenta un elevado contenido en ácido linolénico, lo que le confiere propiedades de aceite secante de gran valor en la fabricación de tintas, barnices, pinturas, lacas, etc., así como en la industria oleoquímica.

ES 2 241 446 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

ES 2 241 446 B1

DESCRIPCIÓN

Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido linolénico.

5 Sector de la técnica

La presente invención se enmarca en el sector de la agricultura, debido a que se trata de un nuevo tipo de aceite producido por semillas de plantas mejoradas genéticamente. Este nuevo tipo de aceite tiene una amplia gama de aplicaciones industriales, principalmente como aceite secante en las industrias de tintas, pinturas, barnices, lacas, etc.

Estado de la técnica

El ácido linolénico es un ácido graso poliinsaturado (18:3 *n*-3) que confiere a los aceites en los que se encuentra presente en altas concentraciones unas propiedades tecnológicas únicas como aceites secantes, que los hace idóneos para su empleo en formulaciones comerciales de tintas, barnices, pinturas, lacas, etc. Asimismo, los aceites ricos en ácido linolénico tienen una amplia gama de aplicaciones como materia prima renovable en la industria oleoquímica (A. Overeem y col., Seed oils rich in linolenic acid as renewable feedstock for environment-friendly crosslinkers in powder coatings, Industrial Crops and Products, 10: 157-165, 1999). En la actualidad, el principal aceite secante empleado es el aceite obtenido de las semillas de lino (*Linum usitatissimum* L.), conocido como aceite de linaza, que posee entre el 45% y el 60% del total de ácidos grasos en forma de ácido linolénico (F.B. Padley y col., Occurrence and characteristics of oils and fats, En: The Lipid Handbook, ed. F.D. Gunstone, J.L. Harwood y F.B. Padley, London: Chapman & Hall, pp 47-223, 1994).

La mostaza etíope es una especie vegetal autóctona de Etiopía, donde se cultiva a pequeña escala como verdura y como planta oleaginosa, debido a que sus semillas contienen alto contenido en aceite. Trabajos realizados en diferentes partes del mundo han demostrado las ventajas de la mostaza etíope frente a otras especies como la colza (*Brassica napus*) y la mostaza india (*Brassica juncea*), cuando se cultivan en regiones semiáridas, debido a su mayor resistencia a la sequía (E. Fereres, J. M. Fernández Martínez, I. Mínguez y J. Domínguez: Productivity of *Brassica juncea* and *Brassica carinata* in relation to rapeseed, *B. napus*. I. Agronomic Studies. En: Proc. 6th Int. Rapeseed Conf., Paris, Francia 1983, pág. 293-298). Otra de las ventajas de la mostaza etíope respecto a otras *Brassicaceae oleaginosas* es su mayor resistencia o tolerancia a plagas y enfermedades (I.J. Anand, J.P. Sing y R. S. Malik : *B. carinata* a potential oilseed crop for rainfed agriculture. Eucarpia Cruciferae Newsletter 10: 76-78. 1985; R.K. Gugel, g. Seguin-Swartz y A. Petrie: Pathogenicity of three isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica* species and other crucifers. Can. J. Plant Pathol. 12: 75-82. 1990).

El aceite de mostaza etíope posee de forma natural un alto porcentaje de ácido erúcico, entre el 38% y el 45% (A. Getinet "Review on breeding of Ethiopian mustard, *Brassica carinata* A. Braun", Proceedings 7th International Rapeseed Conference, pag. 593-597, 1987). No obstante, se han desarrollado hasta la fecha tres tipos de semillas de mostaza etíope que producen aceite con bajo contenido en ácido erúcico. El primer tipo se obtuvo a través de un programa de cruzamientos entre diferentes plantas de mostaza etíope con niveles intermedios de este ácido graso (L.C. Alonso y col. "The outset of a new oilseed crop: *Brassica carinata* with low erucic acid content", Proceedings 8th International Rapeseed Conference, pag. 170-176, 1991). El segundo tipo se obtuvo mediante cruzamientos interespecíficos entre plantas de mostaza etíope con alto contenido en ácido erúcico y plantas de mostaza india (*B. juncea* [L.] Czern.) carentes de ácido erúcico (A. Getinet y col. "Development of zero erucic acid Ethiopian mustard through interspecific cross with zero erucic acid Oriental mustard", Can. J. Plant Sci. 74:793-795, 1994). El tercer tipo se obtuvo mediante cruzamientos interespecíficos de plantas de mostaza etíope con alto contenido en ácido erúcico con plantas de mostaza india (*B. juncea* [L.] Czern.) y colza (*B. napus* L.) carentes de ácido erúcico (J.M. Fernández-Martínez y col., Registration of zero erucic acid Ethiopian mustard genetic stock 25X-1, Crop Science 41: 282). La composición en ácidos grasos de los tipos de semilla cero erúcico, así como del tipo normal, se presenta en la Tabla 1. El contenido en ácido linolénico de algunos de los tipos de semillas de mostaza etíope carentes de ácido erúcico resultó considerablemente elevado en relación al material estándar alto erúcico, aunque los niveles máximos alcanzados (<25%) fueron muy inferiores a los niveles presentes en los principales aceites secantes, como el aceite de linaza (>45%).

ES 2 241 446 B1

TABLA 1

Ácidos grasos en aceite de mostaza etíope

Variedad	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico	Linolénico	Eicosenoico	Erúxico
Normal ¹	3.7	1.0	8.9	20.5	14.7	8.1	39.0
Cero erúxico ²	5.8	1.2	39.0	29.5	22.2	1.1	0.2
Cero erúxico ³	6.0	1.7	28.3	38.1	22.9	1.1	0.1
Cero erúxico ⁴	5.0	1.3	38.6	42.9	10.2	1.2	0.2

- (1) A. Getinet "Review on breeding of Ethiopian mustard, *Brassica carinata* A. Braun", Proceedings 7th International Rapeseed Conference, pag. 593-597, 1987.
- (2) L.C. Alonso y col. "The outset of a new oilseed crop: *Brassica carinata* with low erucic acid content", Proceedings 8th International Rapeseed Conference, pag. 170-176, 1991.
- (3) A. Getinet y col. "Development of zero erucic acid Ethiopian mustard through interspecific cross with zero erucic acid Oriental mustard", Can. J. Plant Sci. 74:793-795, 1994.
- (4) J.M. Fernández-Martínez y col., Registration of zero erucic acid Ethiopian mustard genetic stock 25X-1, Crop Science 41: 282.

Explicación de la invención

Uno de los objetos de la invención es un aceite vegetal obtenido de semillas de mostaza etíope (nombre científico *Brassica carinata* A. Braun) modificadas genéticamente mediante un proceso de mejora genética convencional que no implicó la producción de plantas transgénicas. Este aceite carece de ácido erúxico (menos del 0.5% en peso), y presenta un elevado contenido en ácido linolénico, entre el 30% y el 60% en peso del total de ácidos grasos en el aceite, lo que le confiere propiedades de aceite secante de gran valor en la fabricación de tintas, barnices, pinturas, lacas, etc, así como en la industria oleoquímica. En algunos casos el contenido en ácido linolénico de este aceite es siempre superior al 45%. Adicionalmente, este aceite vegetal presenta también un elevado contenido en ácido linoleico, entre el 25% y el 50% del total de ácidos grasos, de forma que la suma de ácidos grasos poliinsaturados (ácidos linoleico y linolénico) se encuentra entre el 60% y el 85% del total de ácidos grasos en el aceite, siendo en algunos casos esta suma de ácidos grasos poliinsaturados siempre superior al 70%. Los restantes ácidos grasos presentes en el aceite de mostaza etíope objeto de la presente invención están comprendidos entre el 4% y el 10% en peso de ácido palmítico; entre el 0.5% y el 2% en peso de ácido esteárico; entre el 10% y el 35% en peso de ácido oleico; e inferior al 4% en peso de ácido eicosenoico. El contenido de otros ácidos grasos menores (mirístico, palmitoleico, behénico, nervónico) es siempre inferior al 2% en peso. El contenido en ácido erúxico puede ser inferior al 0.1% e incluso inferior al 0.05% en peso.

El aceite vegetal objeto de la presente invención puede ser utilizado como aceite secante en formulaciones de pinturas, barnices, lacas, tintas, protectores de maderas y suelos, etc, así como en alimentación humana y animal.

Descripción detallada de la invención

Para la obtención de las plantas modificadas genéticamente cuyas semillas producen el aceite objeto de la presente invención, se ha llevado a cabo un largo proceso de mejora genética consistente en (1) programa de mutagénesis química, (2) programa de cruzamientos entre plantas mutantes con alto contenido en ácido oleico y alto contenido en ácido erúxico y plantas de una línea de mostaza etíope con bajo contenido en ácido linolénico y alto contenido en ácido erúxico, y (3) programa de recombinación genética entre productos obtenidos en el programa de cruzamientos y una línea de mostaza etíope con bajo contenido en ácido erúxico.

El programa de mutagénesis química consistió en el tratamiento de semillas normales con un producto químico con propiedades mutagénicas, esto es, capaz de inducir mutaciones en el ADN de la planta. Para que estas mutaciones resulten útiles, deben ser heredables, por lo que al tratamiento mutagénico siguió un proceso de varios años consistente en la identificación y fijación de aquellas mutaciones heredables que eran transmitidas de generación en generación. Como resultado de este programa se obtuvieron plantas de mostaza etíope cuyas semillas presentaban un incremento en el contenido en ácido oleico respecto a las semillas de plantas normales, aunque mantenían un contenido en

ES 2 241 446 B1

ácido erúxico similar al de semillas de plantas normales. El programa de mutagénesis se llevó a cabo durante cinco generaciones, al cabo de las cuales se demostró la estabilidad genética del carácter alto oleico en fondo alto erúxico, independiente de las condiciones de cultivo de las plantas.

5 El programa de cruzamientos consistió en el cruzamiento de plantas con alto contenido en ácido oleico y alto contenido en ácido erúxico, procedentes del programa de mutagénesis descrito anteriormente, con plantas con bajo contenido en ácido linolénico y alto contenido en ácido erúxico procedentes de la línea de mostaza etíope HF-186, desarrollada con anterioridad (L. Velasco y col., Selection for reduced linolenic acid content in Ethiopian mustard [*Brassica carinata* Braun], Plant Breeding 116: 396-397, 1997). Este cruzamiento produjo semillas F₂ transgresivas que presentaron un mayor contenido en ácido oleico que los parentales, manteniendo un contenido en ácido erúxico similar al de aquellos.

15 El programa recombinación genética entre productos obtenidos en el programa de cruzamientos y una línea de mostaza etíope caracterizada por bajo contenido en ácido erúxico se llevó a cabo durante cuatro generaciones. Las semillas F₁ procedentes de los cruzamientos iniciales se sembraron y las correspondientes plantas F₁ se autofecundaron, obteniéndose alrededor de 7500 semillas F₂. Estas semillas F₂ fueron sometidas a un proceso de cribado mediante la técnica no destructiva de análisis por reflectancia en el infrarrojo cercano, detectándose varias semillas caracterizadas por un contenido excepcionalmente elevado de ácido linolénico y un bajo contenido en ácido erúxico. A este proceso siguieron dos generaciones adicionales de fijación de los citados caracteres, tras las que se demostró la estabilidad de los caracteres alto linolénico y bajo erúxico, independientes de las condiciones de cultivo de las plantas.

20 El aceite extraído de estas semillas mantiene el mismo perfil de ácidos grasos.

Modo de realización de la invención

25 Primero

Programa de mutagénesis química

30 Semillas de mostaza etíope de la línea C-101, con 9.0% de ácido oleico, fueron sumergidas en agua a temperatura ambiente durante 16 horas para promover el ablandamiento de la cubierta externa y, por tanto, favorecer la penetración del agente mutagénico. Pasado este tiempo, se sumergieron por un período de 2 horas a temperatura ambiente y con una agitación continua a 75 r.p.m. en una solución del agente mutagénico metil-sulfonato de etilo (EMS), preparada a una concentración del 1% (vol/vol) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7. Tras el tratamiento mutagénico las semillas se lavaron durante 10 horas en agua corriente, se secaron, y se sembraron en campo. Las plantas correspondientes se cosecharon individualmente, y las semillas de cada una de las plantas cosechadas se sembraron en campo. Las plantas correspondientes se cosecharon individualmente y sus semillas se analizaron para conocer su composición en ácidos grasos. A partir de estos análisis, se seleccionó una planta con un contenido anormalmente alto en ácido oleico (19.3%). En sucesivas generaciones se realizó selección para aumentar su contenido en ácido oleico. La línea se denominó N2-3591 y su composición media en ácidos grasos, comparada con la línea a partir de la que se obtuvo, C-101, se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2

45 *Ácidos grasos en % (media ± desviación estándar)*

Variedad	16:0 ^a	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1
50 C-101	2.7 ± 0.4	1.1 ± 0.3	9.0 ± 1.1	19.6 ± 1.3	12.2 ± 0.7	6.7 ± 0.5	45.6 ± 1.8
N2-3591	2.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	20.4 ± 2.2	6.1 ± 0.5	11.7 ± 1.4	11.0 ± 1.1	47.0 ± 1.7

55 ^a16:0=ácido palmítico, 18:0=ácido esteárico, 18:1=ácido oleico, 18:2=ácido linoleico,

18:3=ácido linolénico, 20:1=ácido eicosenoico, 22:1=ácido erúxico

60 Segundo

Programa de cruzamientos

65 Plantas del mutante N2-3591 descrito anteriormente, con alto contenido en ácido oleico (20.4%), y alto contenido en ácido erúxico (47.0%) se cruzaron con plantas de la línea HF-186, caracterizada por poseer un bajo contenido en ácido linolénico (4.9%) y alto contenido en ácido erúxico (52.3%) en el aceite de sus semillas. El análisis de las semillas F₂ reveló la presencia de individuos transgresivos, con mayor contenido en ácido oleico (29.7%) y similar contenido en ácido erúxico (49.0%) que los parentales N2-3591 y HF-186. A partir de estas semillas transgresivas

ES 2 241 446 B1

se realizó un proceso de selección para fijar el carácter alto oleico, tras lo que se obtuvo la línea GSS1-59, cuya composición en ácidos grasos en comparación con los parentales N2-3591 y HF-186 se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3

Ácidos grasos en % (media ± desviación estándar)

Variedad	16:0 ^a	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1
N2-3591	2.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	20.4 ± 2.2	6.1 ± 0.5	11.7 ± 1.4	11.0 ± 1.1	47.0 ± 1.7
HF-186	2.9 ± 0.3	0.5 ± 0.1	8.6 ± 1.0	21.9 ± 0.8	4.9 ± 0.6	6.0 ± 0.5	52.3 ± 1.7
GSS1-59	2.1 ± 0.2	0.6 ± 0.2	31.0 ± 1.8	2.6 ± 0.7	2.9 ± 0.6	7.5 ± 1.0	53.4 ± 2.8

^a16:0=ácido palmítico, 18:0=ácido esteárico, 18:1=ácido oleico, 18:2=ácido linoleico, 18:3=ácido linolénico, 20:1=ácido eicosenoico, 22:1=ácido erúcido

Tercero

Programa de cruzamientos entre GSS1-59 y 25X-1

Plantas de la línea mutante alto oleico en fondo alto erúcido, GSS1-59, se cruzaron con plantas de la línea cero erúcido 25X-1. Las semillas obtenidas del cruzamiento se sembraron en macetas y las correspondientes plantas se autofecundaron y se cosecharon individualmente. Las semillas procedentes de estas plantas se cribaron para la composición en ácidos grasos de su aceite mediante análisis por reflectancia en el infrarrojo cercano. De un total de 7500 semillas analizadas se identificaron cuatro semillas con un contenido en ácido linolénico superior al 20% en peso del total de ácidos grasos y un contenido en ácido erúcido inferior al 0.1%. Estas semillas se sembraron y autofecundaron, procediéndose a una selección durante dos generaciones para alto contenido en ácido linolénico y bajo contenido en ácido erúcido. Al cabo de esta selección se obtuvo la línea ABO2105, cuya composición en ácidos grasos en semilla, comparada con las líneas a partir de las que se obtuvo, se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4

Ácidos grasos en % (media ± desviación estándar)

Variedad	16:0 ^a	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1
ABO2105	6.7 ± 1.2	1.1 ± 0.2	19.4 ± 2.7	34.5 ± 4.5	38.4 ± 4.8	1.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0
GSS1-59	2.1 ± 0.2	0.6 ± 0.2	31.0 ± 1.8	2.6 ± 0.7	2.9 ± 0.6	7.5 ± 1.0	53.4 ± 2.8
25X-1	5.3 ± 0.5	1.3 ± 0.2	32.9 ± 3.5	42.6 ± 2.3	16.4 ± 2.4	1.2 ± 0.2	0.1 ± 0.0

^a16:0=ácido palmítico, 18:0=ácido esteárico, 18:1=ácido oleico, 18:2=ácido linoleico, 18:3=ácido linolénico, 20:1=ácido eicosenoico, 22:1=ácido erúcido

REIVINDICACIONES

5 1. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido linolénico **caracterizado** porque dicho aceite
presenta un contenido en ácido erúcido inferior al 0.5% en peso respecto al total de ácidos grasos del aceite, un con-
tenido en ácido linolénico comprendido entre el 30% y el 60% en peso, un contenido en ácido linoleico comprendido
10 ente el 25% y el 50% en peso, un contenido en ácido palmítico comprendido entre el 4% y el 10% en peso, un conte-
nido en ácido esteárico comprendido entre el 0.5% y el 2% en peso, un contenido en ácido oleico comprendido entre
10% y el 35% en peso, y un contenido en ácido eicosenoico inferior al 4%.

10 2. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido linolénico según la reivindicación 1, **caracteri-
zado** porque el contenido en ácido linolénico es superior a 45%.

15 3. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido linolénico según las reivindicaciones 1 y 2,
caracterizado porque la suma de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico y ácido linolénico) se encuentra entre
el 60% y el 85% en peso del total de ácidos grasos en el aceite.

20 4. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido linolénico según las reivindicaciones 1 a 3,
caracterizado porque la suma de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico y ácido linolénico) es superior a 70%.

20 5. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido linolénico según las reivindicaciones 1 a 4,
caracterizado porque el contenido en ácido erúcido del aceite es inferior al 0.1% en peso respecto al total de ácidos
grasos del aceite.

25 6. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido linolénico según la reivindicación 5, **caracte-
rizado** porque el contenido en ácido erúcido del aceite es inferior al 0.05% en peso respecto al total de ácidos grasos
del aceite.

30 7. Utilización de un aceite de semilla de mostaza etíope según las reivindicaciones 1 a 6 como aceite secante en
formulaciones de pinturas, barnices, lacas, tintas, protectores de maderas y suelos, etc.

35 8. Utilización de un aceite de semilla de mostaza etíope según las reivindicaciones 1 a 6 en alimentación humana
y animal.

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 241 446

② Nº de solicitud: 200301617

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.07.2003**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C11B 1/00, A01H 1/04, 5/10

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2168046 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.05.2002, todo el documento.	1-8
A	ES 2166676 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.04.2002, todo el documento.	1-8
A	VELASCO, L. et al.: "Inheritance of reduced linoleic acid content in the Ethiopian mustard mutant N2-4961", Plant Breeding 121, pp.: 263-265, (2002), ISSN 0179-9541, todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

19.09.2005

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1