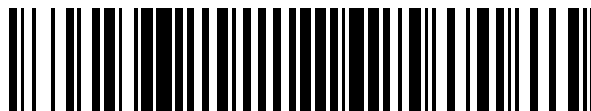


19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 402 484**

21 Número de solicitud: 201131692

51 Int. Cl.:

A01H 3/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.10.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.05.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
(50.0%)****Centro de Transferencia Tecnología - UPCT****Camino de Vera, s/n****46022 VALENCIA ES y****CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

72 Inventor/es:

BALAGUER ZAMORA, Begoña;**CASTELBLANQUE SORIANO, Maria Lourdes;****MARTÍ IBÁÑEZ, María Cristina;****RAMÍREZ GARCÍA, Vicente y****VERA VERA , Pablo**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE HIDROCARBUROS NATURALES DERIVADOS DEL METABOLISMO TERPENOIDE EN LA PLANTA EUPHORBIA LATHYRIS**

57 Resumen:

Procedimiento para aumentar la síntesis y acumulación de hidrocarburos naturales derivados del metabolismo terpenoide en la planta *Euphorbia lathyris*.

Procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos, caracterizado porque comprende tratar la planta *Euphorbia lathyris* con al menos un jasmonato, preferentemente jasmonato de metilo. Así como la biomasa enriquecida en triterpenos obtenida por dicho procedimiento, su uso como fuente de combustible energético y método de obtención de dicho combustible.

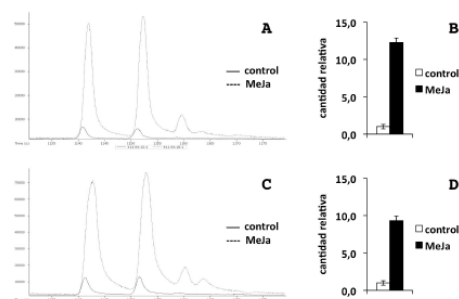


Fig. 4

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para aumentar la síntesis y acumulación de hidrocarburos naturales derivados del metabolismo terpenoide en la planta *Euphorbia lathyris*

5

Sector de la técnica

La presente invención se sitúa en el sector de los biocombustibles ya que proporciona biomasa de la planta *E. lathyris* enriquecida con triterpenos susceptibles de ser transformados en combustibles similares a la gasolina. Esta biomasa aumenta su contenido en triterpenos al ser tratada con jasmonatos y tendrá una capacidad productora de energía superior a la biomasa obtenida de *E. lathyris* sin tratar con jasmonatos.

10

Estado de la técnica

La cuestión energética es clave en el mundo actual. Desde finales del siglo XVIII los combustibles fósiles se han convertido en la fuente primaria de energía para la humanidad. Sin embargo, se trata de recursos energéticos no renovables que tardan millones de años en formarse y cuyas reservas se están consumiendo a una velocidad mayor que su regeneración. El calentamiento global, la subida del precio del barril del petróleo y la decreciente disponibilidad de los recursos fósiles en un espacio de tiempo más o menos largo ha impulsado a los países más desarrollados del mundo a la búsqueda de nuevas fuentes de energía.

15

20

25

Los combustibles líquidos obtenidos de la biomasa se perfilan como una alternativa a los combustibles derivados del petróleo que se utilizan básicamente en el transporte. El interés de los biocombustibles radica en que no alteran el equilibrio del CO₂ en la Tierra y por lo tanto emiten menos gases de efecto invernadero provocando un menor impacto ambiental comparado con los combustibles fósiles. Además pueden ser integrados en los sistemas existentes de suministro de combustibles, comercializados como mezclas con gasolina y gasóleo, o en estado puro, siendo compatibles con los vehículos actuales y contribuyendo al desarrollo rural.

Desde hace décadas se han estado usando cultivos alimentarios para la producción de biocombustibles, bioetanol o biodiésel, tales como caña de azúcar, maíz, remolacha, soja, colza, palma aceitera, etc. Sin embargo, es de debate público el peligro que la utilización de este tipo de cultivos puede acarrear en cuanto a la competencia en precio, tierras de cultivo, recursos hídricos, etc., con los cultivos alimentarios. De aquí ha surgido la necesidad de desarrollar biocombustibles de segunda generación, obtenidos a partir de cultivos no alimentarios.

30

Dentro de la búsqueda de estos nuevos cultivos energéticos, el premio Nobel Melvin Calvin propuso ya hace 30 años la planta *Euphorbia lathyris* como fuente de biomasa con fines energéticos. La principal característica de esta planta es que su látex contiene importantes cantidades de triterpenos hidrocarbonados que pueden usarse para obtener un combustible similar a la gasolina. Los análisis químicos indican que el 5% del peso seco de esta planta lo constituyen dichos triterpenos. Además *E. lathyris* contiene una considerable cantidad de azúcares (alrededor del 30% del peso seco) que se pueden extraer del crudo resultante tras la extracción de los terpenos y pueden ser fermentados para dar etanol. El residuo o bagazo (alrededor del 65% del peso seco) es un material lignocelulósico que puede ser utilizado también con fines energéticos, bien para la combustión directa bien para la producción de más azúcares (*Plants as a direct source of fuel*. M. Calvin, E. K. Nemethy, K. Redenbaugh, J. W. Otvos. *Experientia* (1982) 38:18-22). *E. lathyris* ofrece otra posibilidad interesante como es el aceite de su semilla. El contenido total de aceite en la semilla es casi del 50% de su peso, siendo su principal componente el ácido oleico.

35

40

45

E. lathyris es una planta de la familia de las Euforbiáceas con origen en el Mediterráneo y que puede encontrarse por muchas regiones templadas de todo el mundo. Se adapta fácilmente a diferentes ambientes, debido a su gran rusticidad y resistencia a la sequía, ya que únicamente requiere 30-40 mm de agua anualmente. Como cultivo energético, cabe destacar que no se trata de un cultivo apto para alimentación y puede crecer en tierras marginales sin apenas agua, tierras que no serían adecuadas para cultivos alimentarios. Por lo tanto, el cultivo de *E. lathyris* puede realizarse de forma no competitiva con otros cultivos aptos para alimentación.

50

Se suele considerar como una planta bienal, puesto que necesita sufrir un tratamiento de vernalización, es decir, necesita pasar frío para poder florecer. Las plantas procedentes de semillas de la Península Ibérica necesitan entre 3-8 semanas a 4-6°C para alcanzar una floración del 100%, de forma similar a las plantas procedentes de semillas de California, que necesitan entre 4-8 semanas a 4°C.

55

Sin embargo, su uso como materia prima para biocombustible no requiere que la planta florezca, pudiéndose tratar como una planta anual. En unos 5-7 meses de cultivo el crecimiento es suficiente y se puede recolectar la biomasa. Además tiene la ventaja de que los tocones que quedan en el campo tras la cosecha brotan al año siguiente y no se hace necesario volver a plantar.

60

En la literatura científica se pueden encontrar algunos datos, aunque pocos, de los rendimientos obtenidos en plantaciones experimentales de *E. lathyris*. En primer lugar, los trabajos de Melvin Calvin realizados en los años 80

65

5 en plantaciones en zonas áridas de California arrojan unos resultados de una producción de 27 toneladas (ton) de materia seca por hectárea (ha) y año en una explotación de 13.000 ha. De ellas 2,2 ton corresponden a hidrocarburos, 7 ton a azúcares fermentables y 5,2 ton al bagazo lignocelulósico. Estos rendimientos se obtienen a partir de plantas silvestres pero, según el mismo autor, mediante la mejora genética podría llegarse a producciones de 124 barriles por ha (unas 16 ton por ha de hidrocarburos). En segundo lugar, en plantaciones de *E. lathyris* en España en la misma época, Luis Ayerbe describe unas producciones de hasta 20 toneladas de materia seca por ha y año. En este caso, se estudiaron factores que afectan a la producción, como el suministro hídrico, la época y densidad de siembra y la fecha de recolección. Se observó que para siembras efectuadas en primavera la densidad más apropiada es de 36.000 plantas por ha, mientras que para siembras de otoño es 100.000 plantas por ha (*Euphorbia lathyris as an Energy Crop - Part 1. Vegetative Matter and Seed Productivity*. L. Ayerbe, J.L. Tenorio, P. Ventas, E. Funes, L. Mellado. *Biomass* (1984) 4:283-293).

15 En cuanto a la semilla de *E. lathyris*, se puede llegar a obtener rendimientos de 2500 kg/ha. Las semillas contienen aceites en un 43-48% de su peso que pueden ser utilizados para producción de biodiésel. En un estudio reciente, se analizan cultivos no alimentarios para la producción de biodiésel a partir de semillas y entre ellos se encuentran *E.lathyris* y *Jatropha curcas*. En *E. lathyris*, el contenido de aceite en la semilla es del 43% y su composición es un 81% de ácido oleico (C18:1), un 7% de ácido palmítico (C16:O) y un 5% de ácido linoleico. En *J. curcas*, el contenido de aceite en la semilla es del 38% y su composición es un 42% de ácido oleico (C18:1), un 37% de ácido linoléico (C18:2) un 13% de ácido palmítico (C16:O)(*Production and selected fuel properties of biodiesel from promising non-edible oils: Euphorbia lathyris L., Sapiumsebiferum L. and Jatropha curcas L.R. Wang, M. A. Hanna, W. W. Zhou, P. S. Bhadury, Q. Chen, B.A. Song, S. Yang. Bioresource Technology* (2011) 102:1194–1199). El biodiésel obtenido de *E. lathyris* es de mejor calidad, según estos autores, que el obtenido de *J. curcas*, puesto que presenta un porcentaje mayor de ácidos grasos monoinsaturados y un porcentaje muy bajo de poliinsaturados, características buscadas en un buen biodiésel.

25 Como ya se ha indicado anteriormente, el látex de *E. lathyris* contiene un tipo de triterpenos especialmente adecuados para la producción de biocombustibles. Se trata de triterpenos que pueden extraerse de la biomasa y someterse a un craqueo catalítico, similar al del petróleo, para producir un combustible parecido a la gasolina.

30 El látex es una suspensión o emulsión de partículas en un fluido acuoso y suele ser de color blanco, aunque también se puede presentar incoloro, amarillo o anaranjado. Se exuda en determinadas plantas tras sufrir una lesión en sus tejidos. Existen unas veinte familias botánicas que poseen especies productoras de esta sustancia, entre las cuales las Euforbiáceas, Compuestas, Asclepiadaceas, Sapotaceas y Moraceas son las más representativas.

35 La composición del látex es muy variable y puede contener multitud de metabolitos como carbohidratos, proteínas, ácidos orgánicos, alcaloides, taninos, terpenos, resinas, etc. Se encuentra caucho (cis-1,4-poliisopreno) en el látex de *Hevea brasiliensis*, *Ficus spp* y *Partheniu margentatum* y alcaloides en el látex de *Papaver somniferum* y *Morus spp*. También aparecen cardenólidos (glicósidos cardiacos), terpenoides, fenoles, proteasas, inhibidores de proteasas, lectinas, proteínas del tipo "hevein-likechitin-binding", quitinasas y oxidasas.

40 El látex se sintetiza y acumula en unas células especializadas, denominadas células laticíferas. Éstas mantienen bajo presión el látex dentro de la célula y crecen y se elongan dentro de los tejidos de la planta y forman impresionantes redes de estructuras tubulares.

45 Existen varios tipos de laticíferas según su morfología. La planta *E. lathyris* presenta células laticíferas no articuladas ramificadas. Las laticíferas no articuladas son unicelulares, multinucleadas, y se desarrollan a partir de una única célula que se elonga durante el crecimiento de la planta. Tienen un crecimiento intrusivo y parece ser que las células iniciales se encuentran en el embrión.

50 Los triterpenos presentes en el látex de *E. lathyris* constituyen hasta el 50% del peso seco del látex, son una mezcla de triterpenoles y ésteres de triterpenos con ácidos grasos y, por lo general, la relación entre los triterpenoles y los ésteres de triterpenos suele ser 2:1. Hay cuatro triterpenos principales, que suman un 90% de los triterpenos del látex. Éstos se han identificado como lanosterol, butirospermol, cicloartenol y 24-metilencicloartanol (*The composition of phytosterols, latex triterpenols and wax triterpenoids in the seedling of Euphorbia lathyris*, L.A. J. Koops, W. J. Baas, H. W. Groeneveld. *PlantScience*, (1991) 74:185-191).

55 Todos los isoprenoides, entre los cuales se encuentran los triterpenos, poseen esqueletos carbonados que pueden considerarse, formalmente, como derivados de la asociación de unidades de 5 átomos de carbono (isopreno), en concreto, derivados de dos moléculas: isopentenil-difosfato (IPP) y dimetil-alil-difosfato (DMAPP). La ruta biosintética de los isoprenoides consiste básicamente en la condensación de ese tipo de unidades para dar polímeros de cadenas más o menos largas, que pueden ciclar para dar estructuras policíclicas y sufrir reestructuraciones del esqueleto original.

60 Las plantas usan dos rutas para la síntesis de IPP y DMAPP: la ruta del mevalonato (MVA) localizada en el citosol y la ruta del metileritritol fosfato (MEP) localizada en los plastidios. La adición de unidades de IPP a la unidad de

DMAPP, reacciones catalizadas por preniltransferasas, conduce a la síntesis de cadenas de 10 átomos de carbono (geranildifosfato, GPP), de 15 átomos de carbono (farnesildifosfato, FPP) y de 20 átomos de carbono (geranilgeranildifosfato, GGPP), cadenas que constituyen los puntos de partida para la síntesis de los diferentes tipos de isoprenoides. El látex de *E. lathyris* contiene todas las enzimas necesarias para convertir mevalonato en triterpenos (*Sub-cellular fractionation of triterpenoid biosynthesis in Euphorbia lathyris latex*. C.L. Skrukrud, S.E. Taylor, D.R. Hawkins, E.K. Nemethy, M. Calvin. *Physiologia Plantarum*, (1988) 74(2):306-316). Una de las enzimas clave en la ruta de biosíntesis de los triterpenos es la HMGC_oA reductasa, pues parece ser que es la enzima limitante en *E. lathyris* (*Terpenoid Biosynthesis In Euphorbia Latex*. E.K. Nemethy, C. Skrukrud, G.J. Piazza M. Calvin. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1983)760:343-349).

Por otro lado, los jasmonatos son un grupo de compuestos que actúan como hormonas vegetales y están implicados en diferentes aspectos de la biología de las plantas, desde la respuesta a determinados estreses bióticos y abióticos hasta procesos de desarrollo y reproductivos y de metabolismo secundario. El ácido jasmónico (JA), el jasmonato de metilo (MeJa), el ácido 12-oxofitodienoico (12-OPDA) y los conjugados del ácido jasmónico con aminoácidos como isoleucina (JA-Ile), también denominados como oxilipinas, se encuentran de forma habitual en las plantas y son similares en estructura y biogénesis a las prostaglandinas, importantes moléculas señalizadoras en animales (*Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction*. N.C. Avanci, D.D. Luche, G.H. Goldman, M.H.S. Goldman. *Genetics and Molecular Research* (2010)9(1):484-505).

Los efectos fisiológicos de los jasmonatos fueron descritos inicialmente en los años 80. Posteriormente se ha ahondado en el conocimiento de la acción de los jasmonatos en los vegetales y se ha visto que, además de actuar en la resistencia a patógenos, están implicados en otros procesos del desarrollo vegetal, como la elongación de las raíces, el desarrollo del polen, la dehiscencia de las anteras, la maduración de las semillas y la defensa contra los daños producidos por herida, ozono o insectos (*Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction*. N.C. Avanci, D.D. Luche, G.H. Goldman, M.H.S. Goldman. *Genetics and Molecular Research* (2010) 9(1):484-505).

Se sabe que los jasmonatos tienen un papel central en la regulación de la biosíntesis de varios metabolitos secundarios, entre ellos terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides y antioxidantes. Por ejemplo, la aplicación de MeJa exógeno induce la acumulación de cafeoil putrescina en hojas de tomate, un metabolito derivado de las rutas metabólicas de fenilpropanoides y de poliaminas. De hecho, MeJa se usa de forma normal como elicitador de la producción de metabolitos secundarios, como saponinas, taxol y derivados, ginsenósidos, etc., en cultivos celulares vegetales (*Regulation of Secondary Metabolism by Jasmonate Hormones*. H. Zhang, J. Memelink. In: *Plant-derived Natural Products* (2009), A.E. Osbourn, V. Lanzotti (eds.)).

Desde el punto de vista fisiológico o funcional, la misión del látex en la planta aún no ha sido clarificada. La idea de que el látex fuera una reserva nutritiva fue completamente desechada al no encontrarse en la planta los enzimas necesarios para metabolizar las moléculas que lo componen y hasta la fecha no se conoce función del látex en el metabolismo primario. Las evidencias apuntan a que las laticíferas tendrían algún tipo de papel en los procesos de defensa de la planta, especialmente frente a herbívoros. La relación entre los jasmonatos y las laticíferas sólo ha sido estudiada en el contexto de dichos procesos de defensa. En trabajos llevados a cabo en el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*) se ha clonado y caracterizado una de las enzimas de la biosíntesis endógena del JA (la enzima aleno oxidado sintasa) y, aunque se cita el posible efecto de la modificación de dicha enzima sobre el metabolismo del látex, no se aporta ningún resultado en este sentido (*Characterisation of recombinant Hevea brasiliensis alleneoxide synthase: Effects of cyclooxygenase inhibitors, lipoxygenase inhibitors and salicylates on enzyme activity*. G. Norton, A. Pappusamy, F. Yusof, V. Pujade-Renaud, M. Perkins, D. Griffiths, H. Jones. *Plant Physiology and Biochemistry* 45 (2007) 129-138). Por otro lado, en especies del género *Asclepias* se ha estudiado la respuesta defensiva de las plantas al ataque de larvas de mariposas y, puesto que el JA se puede usar como elicitador del sistema defensivo, se ha estudiado en paralelo cómo influye el tratamiento con JA en las mismas especies. De las 3 especies estudiadas, *A. angustifolia*, *A. barjoniifolia* y *A. fascicularis*, sólo una muestra un aumento de la cantidad de metabolitos del látex como consecuencia del tratamiento con JA, mientras que las otras dos especies no muestran ningún tipo de respuesta al tratamiento (*Induced responses to herbivory and jasmonate in three milkweed species*. S. Rasmann, M. D. Johnson, A. A. Agrawal. *Journal of Chemical Ecology* (2009) 35:1326–1334). Por lo tanto aunque es conocida la implicación del JA en la respuesta patogénica de las plantas, en el caso de plantas productoras de látex nos encontramos con casos en los que existe relación entre los jasmonatos y el látex y en otros casos no hay pruebas de dicha relación.

Descripción de la invención

En la presente invención, la aplicación de MeJa en plantas de *E. lathyris* induce un aumento en la síntesis de triterpenos. Además, se han investigado los procesos moleculares y celulares que conducen a dicho efecto y los resultados indican que el MeJa induce la formación de células laticíferas. Mediante técnicas de histología se demuestra que, tras el tratamiento de las plantas con MeJa, en hojas aparece una red de células laticíferas mucho más densa que en las plantas no tratadas y mediante técnicas de biología molecular se observa que el tratamiento induce la expresión de genes específicos del metabolismo de terpenos y genes específicos de la dinámica de la

pared celular de las laticíferas, lo cual indica un crecimiento de dichas células tras el tratamiento con MeJa.

5 Un primer aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos, caracterizado porque comprende tratar la planta *E. lathyris* con al menos un jasmonato. Este jasmonato puede ser ácido jasmónico (JA), jasmonato de metilo (MeJa), ácido 12-oxofitodienoico (12-OPDA) o conjugados de ácido jasmónico con aminoácidos como, por ejemplo, isoleucina (JA-Ile).

10 Preferentemente, el procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos objeto de esta invención se puede caracterizar por tratar una planta *E. lathyris* con jasmonato de metilo (MeJa).

De acuerdo con una realización preferente, el procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos, tal como se describe en esta solicitud de patente, se puede caracterizar porque comprende pulverizar una solución de jamonato, preferentemente de jasmonato de metilo, sobre hojas de la planta *E. lathyris*.

15 De acuerdo con otra realización preferente de la presente invención, el procedimiento descrito en esta solicitud de patente puede comprender tratar la planta *E. lathyris*, preferentemente mediante pulverización sobre las hojas de la planta, con una solución que comprende entre 50 y 200 μM de jasmonato de metilo. De forma aún más preferente, la solución comprende 50 μM de jasmonato de metilo.

20 La solución de jasmonato utilizada para tratar la planta *E. lathyris* tal como se describe en esta solicitud de patente, preferentemente la solución de jasmonato de metilo, se puede obtener por disolución del correspondiente jasmonato en un solvente en el cual dicho compuesto sea soluble y, si se requiere, posteriormente diluir con agua hasta la concentración deseada. En un caso particular, la solución de jasmonato de metilo se puede obtener disolviendo dicho jasmonato en etanol y, posteriormente, diluir con agua hasta obtener la concentración de jasmonato de metilo deseada.

25 De acuerdo con otra realización preferente, el procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos, tal como se describe en esta solicitud de patente, también se puede caracterizar porque comprende tratar la planta *E. lathyris* con una solución de jasmonato, preferentemente de jasmonato de metilo, que además comprende al menos un surfactante.

30 Preferentemente, el procedimiento de la presente invención puede comprender tratar la planta *E. lathyris* con una solución de jasmonato que puede comprender un máximo de 0.10 % de al menos un surfactante, siendo aún más preferente que la solución comprenda un 0.02 % de surfactante.

35 El surfactante utilizado en el procedimiento descrito en esta solicitud de patente puede ser, entre otros, un polisorbato tal como monolaurato de polioxietilensorbitan (Tween-20), un polioxietileno tal como octil-fenoxi-polietoxi-etanol (Triton X-100) o un copolímero de poliéter y silicona tal como el producto comercial Silwet.

40 De acuerdo con una realización aún más preferente, el procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos, tal como se describe en esta solicitud de patente, se puede caracterizar porque puede comprender pulverizar sobre las hojas de la planta *E. lathyris* una solución que comprende 50 μM de jasmonato de metilo y 0.02 % de al menos un surfactante que es un copolímero de poliéter y silicona.

45 El procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos tal como se describe en esta solicitud de patente se puede realizar en cualquier momento tras la germinación de la planta.

50 De acuerdo con otra realización preferente, el procedimiento descrito en esta solicitud de patente se puede caracterizar porque puede comprender tratar la planta *E. lathyris* con jasmonato, preferentemente mediante pulverización sobre las hojas la planta, entre 15 días y 5 meses tras la germinación de la planta.

55 De acuerdo con otra realización preferente, el procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos, tal como se describe en esta solicitud de patente, se puede caracterizar porque el procedimiento comprende tratar la planta *E. lathyris* 3 veces en días alternos, preferentemente entre los 15 días y los 5 meses tras la germinación de la planta.

60 De forma aún más preferente, el procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos descrito también se puede caracterizar porque comprende pulverizar una solución de jasmonato, preferentemente de jasmonato de metilo, sobre las hojas de la planta *E. lathyris* 3 veces en días alternos, entre los 15 días y los 5 meses tras la germinación de la planta.

El tratamiento con jasmonato comprendido en el procedimiento de la invención se puede realizar en cualquier momento del crecimiento de la planta. En particular, se puede iniciar en cualquier momento entre los 15 días y los 5 meses tras la germinación con resultados similares en cuanto al aumento de triterpenos observados. En particular,

los inventores realizaron el tratamiento descrito iniciado a los 15 días, 30 días, 4 meses y 5 meses obteniendo resultados similares en cuanto al aumento de triterpenos.

5 La presente invención proporciona un procedimiento que permite la obtención de mayor cantidad de triterpenos tanto en el látex exudado por las células laticíferas como en las hojas que las contienen. A nivel celular, el tratamiento induce una red más densa de células laticíferas y a nivel molecular hay un aumento de la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de síntesis de los terpenos y con los procesos de diferenciación de células laticíferas. Este resultado implica una mayor cantidad de triterpenos en la biomasa de *E. lathyris* y por lo tanto una mayor productividad de este cultivo para fines energéticos ya que dichos compuestos triterpenoides pueden ser de utilidad para el desarrollo de biocombustibles o mezclas de gasolinas.

10 El procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos objeto de la presente invención, se puede caracterizar porque no modifica significativamente la proporción de triterpenos presentes de forma natural en la planta *E. lathyris*. Así la biomasa obtenida por el procedimiento descrito en esta solicitud de patente se puede caracterizar por comprender una mezcla de triterpenos formada por lanosterol, butirospermol, cicloartenol y 24-metilencicloartenol.

15 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a la biomasa enriquecida en triterpenos obtenida por el procedimiento descrito en esta solicitud de patente.

20 De acuerdo con una realización preferente, la biomasa enriquecida en triterpenos objeto de esta invención se caracteriza porque puede comprender una mezcla de triterpenos que comprende lanosterol, butirospermol, cicloartenol y 24-metilencicloartenol. La mezcla de triterpenos comprendida en la biomasa de la presente invención se caracteriza porque la concentración de los diferentes triterpenos, en particular de lanosterol, butirospermol, cicloartenol y 24-metilencicloartenol, es significativamente superior a la concentración de dichos compuestos en la biomasa sin tratar por el procedimiento de esta invención.

25 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de la biomasa enriquecida en triterpenos descrita en esta solicitud de patente como fuente de un combustible energético.

30 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de un combustible energético, caracterizado porque comprende las etapas de:

- 35 a) obtener biomasa enriquecida en triterpenos mediante un procedimiento tal como se describe en esta solicitud de patente,
b) recolectar la planta *E. lathyris* enriquecida en triterpenos de la etapa a), y
c) aislar los triterpenos presentes en la biomasa recolectada en la etapa b).

40 El aislamiento de los triterpenos en la etapa c) del método de obtención de un combustible energético a partir de la planta *E. lathyris*, tal como se describe en esta solicitud de patente, puede tener lugar por cualquier método conocido en la técnica. Preferentemente, el aislamiento puede tener lugar por extracción, y ésta se puede realizar a una temperatura entre 50 y 70°C en una mezcla de solvente orgánico, por ejemplo heptano, y agua.

45 Preferentemente, los triterpenos obtenidos a partir de la *E. lathyris* tal como se describe en esta solicitud de patente, pueden ser transformados previamente a su utilización como combustible convencional o como materia prima para la industria química.

50 De acuerdo con otra realización preferente, el método de obtención de combustible energético descrito en esta solicitud de patente también puede comprender una etapa d) de craqueo catalítico de los triterpenos obtenidos en la etapa c). Esta etapa de craqueo catalítico puede realizarse en condiciones habituales para este procedimiento y ampliamente conocidas por un experto en la materia.

Breve descripción de las figuras

55 Figura 1. Visualización de células laticíferas en tejidos de *E. lathyris*. (A) En cortes transversales de tallo se localizan las células laticíferas, mediante tinción con Sudan Black B, en el córtex (flechas horizontales) y en el xilema (flechas verticales). (B) La inmunolocalización de las células laticíferas con el anticuerpo de la enzima HMGR (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa), confirma la presencia de células laticíferas en córtex y en xilema. (C) La tinción de hipocotilos con Sudan Black B mediante la técnica de "whole-mount" permite observar la disposición de las células laticíferas a lo largo del eje de crecimiento de la planta.

60 Figura 2. Visualización de las células laticíferas, mediante tinción con Sudan Black B en "whole-mount" en plantas control (A) y tratadas con MeJa (B). Las células laticíferas se disponen formando una red en la superficie de la hoja. El tratamiento con MeJa provoca un incremento de la tinción, observándose una red de laticíferas más densa que en hojas de plantas control.

65

Figura 3. Análisis de GC-MS de látex de *E. lathyris* de plantas control (A) y de plantas tratadas con MeJa (B). En ambos cromatogramas se observan los picos correspondientes a los cuatro triterpenos principales. Son, de izquierda a derecha: lanosterol, butiroespermol, cicloartenol y 24-metilencicloartenol. En el cromatograma se ha seleccionado el ión 109, que aparece en el espectro de masas de los cuatro compuestos.

Figura 4. Comparación mediante análisis de GC-MS de la cantidad de triterpenos en *E. lathyris* tras el tratamiento con MeJa. Los análisis se realizaron en plántulas de 1 mes de edad (A y B) así como en plantas adultas de 5 meses (C y D). Los triterpenos se extrajeron de la biomasa de plantas control y tratadas, se sometieron al análisis de GC-MS y sobre los cromatogramas (A y C) se llevó a cabo la cuantificación (B y D) por integración de las áreas de los picos. En los cromatogramas de GC-MS se ha seleccionando el ión 411, que aparece en el espectro de masas de los dos primeros picos (lanosterol y butiroespermol). Los datos mostrados son la media con la desviación estándar de tres medidas independientes y los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados similares.

Figura 5. Análisis de la expresión de genes de *E. lathyris* mediante RT-qPCR en diferentes tejidos: hoja (H), tallo (T), raíz (R) y látex (L). (A) Expresión del gen S-adenosilmetionina-esterol-C-metiltransferasa (*SMT1*). (B) Expresión del gen endo-1,4-β-glucanasa (*EG*). El nivel de expresión para cada tejido y cada uno de los genes está normalizado respecto al gen eEF1a. Se tomó como valor de expresión 1 el correspondiente a hojas (H), y el valor del resto de las muestras se calculó relativo a este valor. La barra de error corresponde a la desviación estándar de tres réplicas técnicas.

Figura 6. Análisis de la expresión en tejido de hoja de los genes específicos de célula laticífera de *E. lathyris* tras el tratamiento con MeJa. Expresión del gen S-adenosilmetionina-esterol-C-metiltransferasa (*SMT1*) a tiempos cortos (A) y largos (B) tras el tratamiento. Expresión del gen endo-1,4-β-glucanasa (*EG*) a tiempos cortos (C) y largos (D) tras el tratamiento. El nivel de expresión para cada uno de los genes está normalizado respecto al gen eEF1a. Se tomó como valor de expresión 1 el correspondiente a tiempo 0 h, y el valor del resto de las muestras se calculó relativo a este valor. La barra de error corresponde a la desviación estándar de tres réplicas técnicas.

Figura 7. Comparación de la cantidad de triterpenos mediante análisis de GC-MS en plántulas de 1 mes de edad de *E. lathyris*, *E. palustris* y *E. corallioides* tras el tratamiento con MeJa. Los triterpenos se extrajeron de plantas control y plantas tratadas, se sometieron al análisis de GC-MS y sobre los cromatogramas se llevó a cabo la cuantificación por integración de las áreas de los picos. Los datos mostrados son la media con la desviación estándar de tres medidas independientes y los experimentos se repitieron al menos tres veces con resultados similares.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto que la aplicación de MeJa en plantas de *E. lathyris* provoca el aumento de la cantidad de triterpenos. Además, los inventores han investigado los procesos moleculares y celulares que conducen a dicho efecto y se concluye que el MeJa induce la formación de células laticíferas. Mediante técnicas de histología se demuestra que hay una red más densa de células laticífera en hojas, y mediante marcadores moleculares se observa que hay un aumento de la expresión de genes relacionados con el crecimiento celular de las laticíferas.

Estos ejemplos se presentan a modo de demostración pero de ningún modo pueden suponer un límite a la invención.

a) Tratamiento de las plantas de *E. lathyris* con jasmonato de metilo (MeJa)

Las semillas de *E. lathyris* se sembraron en alveolos con una mezcla de turba, perlita y vermiculita y se incubaron a 25°C. Tras la germinación, las plántulas fueron trasplantadas a macetas y, a diferentes estadios (desde 15-30 días hasta 4-5 meses), se trataron por pulverización sobre todas las hojas con una solución que contenía un rango de concentraciones de MeJa entre 50 y 200 μM. La solución y la concentración óptima de MeJa encontrada para producir el máximo de acumulación de triterpenos e inducción de células laticíferas fue la solución acuosa de 50 μM de MeJa, disuelto previamente en etanol, y 0,02% de un copolímero de poliéter y silicona comercializado como Silwet. Adicionalmente la aplicación de otros agentes surfactantes como monolaurato de polioxietilensorbitan (Tween-20) u octil-fenoxi-polietoxi-etanol (Triton X-100) fue capaz de reproducir resultados similares. Los tratamientos se llevaron a cabo pulverizando varias veces las plantas y se observó que las condiciones óptimas eran 3 pulverizaciones a días alternos. Las muestras para los posteriores análisis se recogieron a los 7 días de la primera pulverización. En todos los tratamientos se hicieron dos grupos de plantas: un grupo tratado con la solución de MeJa y otro grupo no tratado, control, al que se pulverizó con la misma solución acuosa pero sin tener MeJa.

b) MeJa induce el crecimiento de células laticíferas

Las tinciones con el colorante Sudan Black B permiten visualizar lípidos en tejidos vegetales, pero en la literatura científica no existe ningún ejemplo en el que se haya usado este colorante para teñir laticíferas de *E. lathyris*. En la presente invención, los tejidos de *E. lathyris* se tiñeron con Sudan Black B y se comprobó que esta tinción permite la

5 visualización de las células laticíferas por tinción de los lípidos (en este caso triterpenos) presentes en el látex. En plantas de *E. lathyris* se realizaron cortes transversales del tallo y se observaron al microscopio. Las células laticíferas se localizaron en el córtex y en el xilema (Figura 1A). Este resultado fue posteriormente verificado mediante inmunolocalización con el anticuerpo anti-HMGR (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa), una enzima de la ruta de biosíntesis de los terpenos. De esta forma se corroboró que la HMGR se localiza principalmente en células laticíferas (Figura 1B) y que la inmunolocalización decora el mismo tipo de células que la tinción con Sudan Black B (Figura 1A). La técnica histológica de "whole-mount" (tinción de tejidos intactos, sin cortar) permite en este caso observar la distribución espacial de estas células. Tanto en hoja como en tallo se observó la morfología alargada de las laticíferas y sus ramificaciones. En tallo, siguen un patrón de diferenciación longitudinal paralelo al eje de crecimiento (Figura 1C) y en hoja forman una red por toda la superficie de la hoja (Figura 2A) y presentan más ramificaciones que en tallo.

10 En el caso de las plantas tratadas con MeJa, se tomaron muestras de hojas y de hipocotilos de las plantas control y de las plantas tratadas. En las hoja de las plantas tratadas (Figura 2B), las laticíferas se visualizan como una red mucho más tupida que en el caso de las plantas control (Figura 2A). En el hipocotilo de las plantas tratadas, aparece un mayor número de laticíferas respecto a las plantas control. Ambos resultados confirman que el tratamiento al que han sido expuestas las plantas acarrea un aumento en la cantidad de células laticíferas (Figura 2), sugiriendo por tanto un efecto morfogénico del MeJa sobre dicho proceso celular.

15 Para la fijación y tinción con Sudan Black B del tallo de *E. lathyris*, se realizó un corte sobre una zona a la que previamente se le había aplicado N₂ líquido (para evitar la pérdida excesiva de látex en el corte) e inmediatamente se sumergió en la solución fijadora (FAE) y se sometió a vacío durante 15 minutos. Posteriormente se realizaron los cortes de 4 mm de grosor y se incubaron con la misma solución fijadora durante 16 horas. Las muestras así obtenidas se utilizaron para tinción con Sudan Black B, al 0,1% (p/v) en etanol al 70%, a temperatura ambiente y se montaron en glicerol:agua (1:1) para su observación al microscopio.

20 Para la inmunolocalización, las muestras se obtuvieron y fijaron en FAE de la misma forma descrita anteriormente. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron para su inclusión en parafina y la realización de secciones de 8 µm en microtomo sobre portaobjetos. A continuación las secciones se desparafinaron e hidrataron. Las muestras se bloquearon con BSA al 5% en PBS y se incubaron con el anticuerpo correspondiente (en este caso HMGR). Tras un periodo adecuado de incubación, se realizaron lavados con PBS y Tween-20 para eliminar el exceso de anticuerpo y se incubó con el anticuerpo secundario, que estaba conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. Se realizaron los lavados para eliminar el exceso de anticuerpo y se reveló en una solución de NBT y BCIP durante el tiempo adecuado para desarrollar la coloración púrpura.

25 Para la tinción con Sudan Black B en "whole-mount" se utilizaron plántulas tratadas con MeJa y no tratadas. La plántula entera se fijó en FAE, se sometió a vacío durante 20 minutos y se dejó a 4°C durante 16 horas en la solución fijadora. Posteriormente se procedió a un lavado con etanol al 70% para eliminar el fijador, se sumergió el tejido en Sudan Black B, al 0,1% (p/v) en etanol al 70%, a temperatura ambiente y se monitorizó el desarrollo de la tinción en un microscopio. Finalizada la tinción, se realizó un aclarado en NaOH 2M durante 16 horas.

30 c) MeJa conduce a un aumento de los triterpenos del látex

35 En la literatura está descrito que el látex de *E. lathyris* contiene una mezcla de triterpenoles y ésteres de triterpenos y que cuatro de estos triterpenos, lanosterol, butirospermol, cicloartenol y 24-metilencicloartanol, constituyen más del 90% de los triterpenos del látex. En el presente trabajo se extrajeron del látex los lípidos no saponificables y se identificaron, mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS), los cuatro triterpenos principales descritos. Además, se realizaron extractos de plantas y de la misma forma se identificaron los triterpenos del látex en la biomasa.

40 En el caso de las plantas tratadas con MeJa, se confirmó que no se modifica el tipo de triterpenos presentes en el látex tras el tratamiento. Para ello se tomaron muestras de látex, se extrajeron los lípidos y se analizaron por GC-MS. Los cromatogramas obtenidos indicaron que tanto en las plantas control (Figura 3A) como en las tratadas (Figura 3B) se observan los cuatro picos correspondientes a los cuatro compuestos principales del látex que son lanosterol, butirospermol, cicloartenol y 24-metilencicloartanol; por lo tanto el tratamiento con MeJa no cambia la calidad del látex de *E. lathyris*. Por otro lado se observó que sí que se produce un aumento de la cantidad de dichos triterpenos en las plantas tratadas con MeJa respecto a las de control (Figura 4). Mediante GC-MS se compararon los extractos de la biomasa de plantas control y tratadas y, sobre los cromatogramas (Figura 4A y 4C), se realizó la cuantificación mediante la selección de un ión específico, el 411, presente en los espectros de masas de dos de los cuatro triterpenos principales, en concreto en lanosterol y butirospermol. Los triterpenos aumentan entre 9 y 12 veces su cantidad en la biomasa tras el tratamiento con MeJa (Figura 4B y 4D). Estos aumentos se observan en tratamientos realizados sobre las plantas en diferentes estadios de crecimiento, desde plántulas de 1 mes (Figura 4A y 4B) a plantas adultas de 5 meses (Figura 4C y 4D).

65 Para la extracción de lípidos de látex, se realizó una incisión con cuchilla en el tallo de la planta, se recogió el látex

exudado con pipeta y se congeló inmediatamente en N₂ líquido. A 100 µl de látex congelado se añadieron 1 ml de heptano y 0,25 ml de agua, se mantuvo a 60°C durante 15 minutos y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica recuperada tras la centrifugación se saponificó con 0,5 ml de una solución de KOH 10% (p/v) en etanol:agua (1:1) durante 15 minutos a 60°C para convertir todos los ésteres de triterpenoles presentes en el látex a la forma alcohol. Los lípidos no saponificables, entre los que se encuentran los triterpenos, se recuperan en la fase orgánica tras la saponificación.

Para la extracción de lípidos de planta, se tomaron las 4-6 primeras hojas del ápice de la planta mientras se congelaban con N₂ líquido los pecíolos (para evitar que se saliese el látex) y posteriormente se trituró el tejido en N₂ líquido. A 1 g de material se añadieron 10 ml de heptano y 5 ml de agua, se mantuvo a 60°C durante 1 hora y se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos. La fase orgánica recuperada tras la centrifugación se saponificó con 5 ml de una solución de KOH 10% (p/v) en etanol:agua (1:1) durante 15 minutos a 60°C. Los lípidos no saponificables, entre los que se encuentran los triterpenos, se recuperan en la fase orgánica tras la saponificación.

Los extractos obtenidos, bien de látex o bien de hoja, se sometieron directamente al análisis de GC-MS. El sistema de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) está constituido por un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas Pegasus® 4D GC-TOFMS (LECO). La columna usada fue BPX35 (30 m, 0,32 mm, 0,25 µm) y como gas portador se utilizó helio a un flujo de 2 ml/minuto. Las condiciones de temperatura para el horno fueron de 85°C 2 min y una rampa de 15°C/min hasta alcanzar 360°C. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto electrónico a una energía de ionización de 70 eV. Las muestras se analizaron en el modo "scan" con un rango m/z entre 70-600. La temperatura de la fuente de ionización fue de 200°C. Los cromatogramas muestran en el eje de abscisas el tiempo de retención en segundos y en el eje de ordenadas la abundancia relativa de cada compuesto. Los cuatro compuestos principales del látex de *E. lathyris* fueron identificados por su espectro de masas. Además lanosterol y cicloartenol fueron confirmados mediante análisis de GC-MS de compuestos puros.

d) MeJa induce la expresión de genes de biosíntesis de terpenos y genes de diferenciación celular de laticíferas

En el caso de *E. lathyris*, no se disponía de información previa sobre expresión de genes y se trata de un organismo superior cuyo genoma es desconocido. En casos así, el análisis del transcriptoma es uno de los primeros pasos del abordaje genómico y mediante la secuenciación de alto rendimiento de ESTs se puede obtener información sobre el nivel de expresión de distintos genes en diferentes tejidos y condiciones, así también como la secuencia de los ADNc correspondientes a los genes que se están expresando. Para llevar a cabo este análisis, se extrajo ARN total de látex y de hipocotilos de plantas de *E. lathyris*, se retrotranscribió a cDNA y se procedió con la secuenciación 454 (GS FLX Titanium). Las secuencias obtenidas se ensamblaron, se analizaron mediante bioinformática para obtener sus correspondientes anotaciones y así identificar genes homólogos por comparación con otras especies y generar una base de datos para *E. lathyris*. La comparación de los datos obtenidos para látex y para hipocotilos permitió identificar genes específicos de látex.

En una primera aproximación, se identificaron genes candidatos de la ruta biosintética de los isoprenoides y genes implicados en el desarrollo y la identidad celular de células laticíferas. Los genes identificados fueron utilizados como marcadores de dichos procesos y se llevó a cabo el análisis de su expresión mediante Real Time Quantitative PCR (RT-qPCR), análisis que por un lado sirvió para confirmar los datos de expresión obtenidos con el análisis del transcriptoma y por otro lado permitió obtener los niveles de expresión de dichos genes en diferentes tejidos, como hoja, tallo y raíz además de látex.

Los genes estudiados en particular corresponden al gen S-adenosilmetionina-esterol-C-metiltransferasa (*SMT1*) codificado por SEQ ID No. 1, que codifica una enzima implicada en la ruta de biosíntesis de los terpenos, catalizando la metilación de lanosterol y cicloartenol, y cuya secuencia presenta homología con la misma proteína de otras especies vegetales, y al gen que codifica la proteína endo-1,4-β-glucanasa (EG) codificada por SEQ ID No. 2, implicada en la dinámica de la pared celular de células laticíferas y cuya secuencia presenta homología con la misma proteína de otras especies vegetales. En ambos casos se confirmó mediante RT-qPCR que se trata de genes expresados mayoritariamente en látex (Figura 5).

En el caso de las plantas tratadas con MeJa, se analizó la expresión de estos genes para elucidar qué tipo de mecanismo puede conducir al aumento de terpenos en la planta y a la diferenciación observada de células laticíferas. Para ello, las plantas de *E. lathyris* se trataron con MeJa y se analizó la expresión de los genes a diferentes tiempos tras el tratamiento. Los resultados muestran por un lado que el gen *SMT1*, seleccionado como marcador de la síntesis de terpenos, aumenta su expresión en las plantas tratadas respecto a las plantas control tanto a tiempos cortos (Figura 6A) como a tiempos largos (Figura 6B), lo cual indica una activación de la síntesis de terpenos. De forma similar, la expresión del gen *EG* se induce a tiempos cortos (Figura 6C) y a tiempos largos (Figura 6D) tras el tratamiento con MeJa. Dicho gen se ha seleccionado como marcador de los genes implicados en la dinámica de la pared celular de célula laticífera, y estos resultados apuntan a que estas células inician un crecimiento intrusivo tras la aplicación de MeJa, lo cual está en concordancia con el aumento de la red de laticíferas

observado en las tinciones de hoja y de hipocotilo.

5 Para las extracciones de ARN, el material vegetal (0,5 g en el caso de tejido y 3 g en el caso de látex) se homogeneizó en mortero con N₂ líquido y se transfirió a un tubo de 15 ml que contenía 4 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 9,0, EDTA 15 mM pH 8,0, ClNa 200 mM y Sarkosyl 0,5%) al que se le había añadido β-mercaptoetanol (8 μl/ml). Una vez mezclado se añadieron 4 ml de fenol, 0,8 ml de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y 280 μl AcNa 3 M pH 5,3. Se agitó en vortex y se dejó en hielo 15 min. El sobrenadante obtenido tras centrifugar en frío a 10.000 rpm 10 minutos se volvió a purificar con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), centrifugando de nuevo. La fase acuosa se transfirió a un tubo, se añadió 1 volumen de isopropanol y se enfrió 20 minutos a -70°C. Después de centrifugar en frío 10 minutos a 10.000 rpm, el precipitado se lavó con etanol 80%, se dejó secar al aire y se resuspendió con 1 ml de agua. A continuación se realizó una precipitación selectiva de ARN añadiendo 0,5 ml de LiCl₂ 8 N y se incubó toda la noche en hielo. Por centrifugación en centrífuga refrigerada se separó el ARN (precipitado) del resto de ácidos nucleicos (disueltos en el sobrenadante). Éste se lavó con etanol al 80% y se dejó secar, resuspendiéndose después en agua.

10 La cuantificación de la expresión de los distintos genes se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa. El ADNc de cadena simple se sintetizó a partir de 1 μg de ARN total utilizando el kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas). Este ARN total previamente fue tratado con DNase I (DNA-free kit™ Ambion) siguiendo, en ambos casos, las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido (20 μl) se diluyó con 80 μl de agua. Para las reacciones de RT-qPCR se utilizaron 2 μl de este ADNc y el kit Power SYBR® Green PCR master Mix (Applied Biosystem) en un volumen total de reacción de 20 μl. El equipo utilizado fue un 7500 Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystem. De cada una de las muestras se hicieron tres réplicas técnicas. Para la cuantificación de la expresión se utilizó el Método ΔΔCt y la expresión relativa de los distintos genes se calculó utilizando como gen constitutivo eEF1a (elongation factor 1-alpha). Para el diseño de los oligos se utilizó el software Primer Express (Applied Biosystem) y los pares de oligos empleados para cada gen fueron los siguientes:

a) para eEF1a

SEQ ID No. 3: 5'-CATGCCAGATGAAGCTAGGCT-3'

SEQ ID No. 4: 5'-GAGACGCGTGTTCAGGAAG-3'

30 b) para S-adenosil-metionina-esterol-C-metiltransferasa

SEQ ID No. 5: 5'- CCGCGGATTTGAAGTTTTTC-3'

SEQ ID No. 6: 5'-AGCGATGGACAAGCTATCGAA-3'

c) para endo-1,4-β-glucanase

SEQ ID No. 7: 5'- AGGACGAAAGGAGTGAAGAGACG-3'

35 SEQ ID No. 8: 5'-AATGGAGGAGAAAGAGGATGAGC-3'

e) MeJa no induce un aumento de triterpenos del látex en *Euphorbia palustris* y en *Euphorbia corallioides*.

40 *Euphorbia palustris* y *Euphorbia corallioides* son especies productoras de látex, al igual que *E. lathyris*. A partir del látex, se extrajeron los terpenos de látex de dichas especies y se sometieron a análisis de GC-MS. De esta forma se identificaron los terpenos principales de látex que, al igual que *E. lathyris*, son lanosterol, butirospermol, cicloartenol y 24-metilencicloartanol, aunque en diferentes proporciones que las encontradas en *E. lathyris*.

45 De la misma forma que se hizo con *E. lathyris*, se trataron con MeJa plantas de *E. palustris* y *E. corallioides* de 1 mes de edad tras la germinación, se extrajeron los terpenos de las hojas y se cuantificaron sobre los cromatogramas de GC-MS. El resultado fue que en ambas especies no se observó un aumento significativo de la cantidad de triterpenos de látex en la biomasa de las plantas (Figura 7). Por lo tanto, el efecto del MeJa sobre los terpenos del látex parece ser específico para *E. lathyris*.

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos, caracterizado porque comprende tratar la planta *Euphorbia lathyris* con al menos un jasmonato.
2. Procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos según la reivindicación 1, caracterizado porque el jasmonato es jasmonato de metilo.
- 10 3. Procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque comprende pulverizar una solución de jasmonato sobre hojas de la planta *E. lathyris*.
- 15 4. Procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado porque comprende tratar la planta *E. lathyris* con una solución que comprende entre 50 y 200 μM de jasmonato de metilo.
- 20 5. Procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos según la reivindicación 4, caracterizado porque comprende tratar la planta *E. lathyris* con una solución que comprende 50 μM de jasmonato de metilo.
6. Procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende tratar la planta *E. lathyris* con una solución de jasmonato que comprende adicionalmente al menos un surfactante.
- 25 7. Procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos según la reivindicación 6, caracterizado porque la solución de jasmonato comprende un máximo de 0.10 % de al menos un surfactante.
8. Procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque comprende tratar la planta de *E. lathyris* con jasmonato entre 15 días y 5 meses tras la germinación de la planta.
- 30 9. Procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el procedimiento comprende tratar la planta *E. lathyris* 3 veces en días alternos.
- 35 10. Biomasa enriquecida en triterpenos, caracterizada porque ésta se obtiene por un procedimiento tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 40 11. Biomasa enriquecida en triterpenos según la reivindicación 10, caracterizada porque comprende una mezcla de triterpenos que comprende lanosterol, butirospermol, cicloartenol y 24-metilencicloartanol.
- 45 12. Uso de biomasa enriquecida en triterpenos tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, como fuente de combustible energético.
- 50 13. Método de obtención de un combustible energético, caracterizado porque comprende las etapas de:
a) obtener biomasa enriquecida en triterpenos mediante un procedimiento tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,
b) recolectar la planta *E. lathyris* enriquecida en triterpenos de la etapa a), y
c) aislar los triterpenos presentes en la biomasa recolectada en la etapa b).
14. Método de obtención de un combustible energético, según la reivindicación 13, caracterizado porque comprende una etapa adicional d) de craqueo catalítico de los triterpenos aislados en la etapa c).

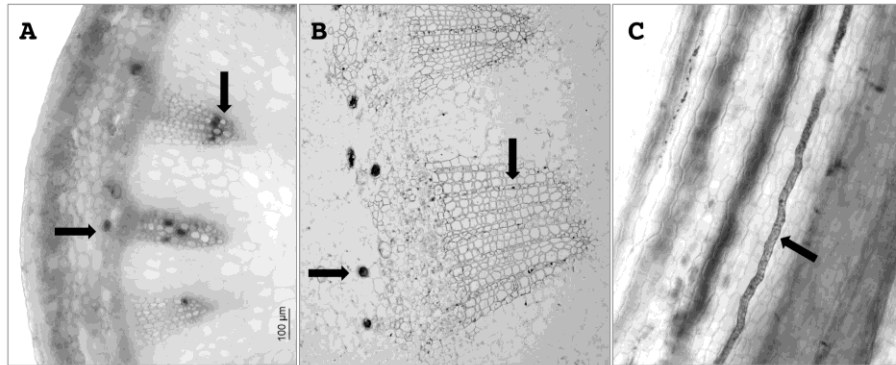


Fig. 1

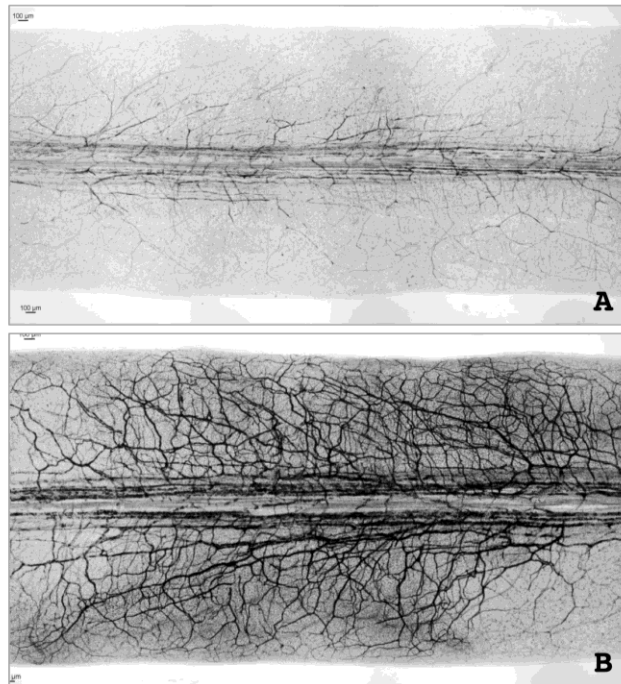


Fig. 2

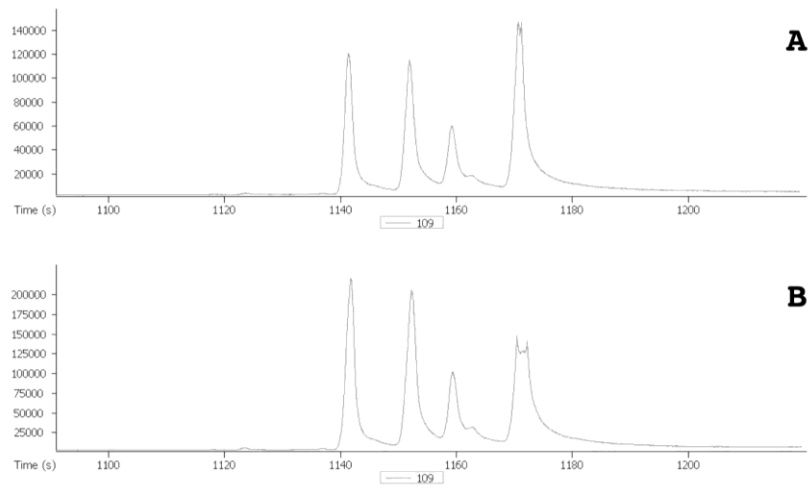


Fig. 3

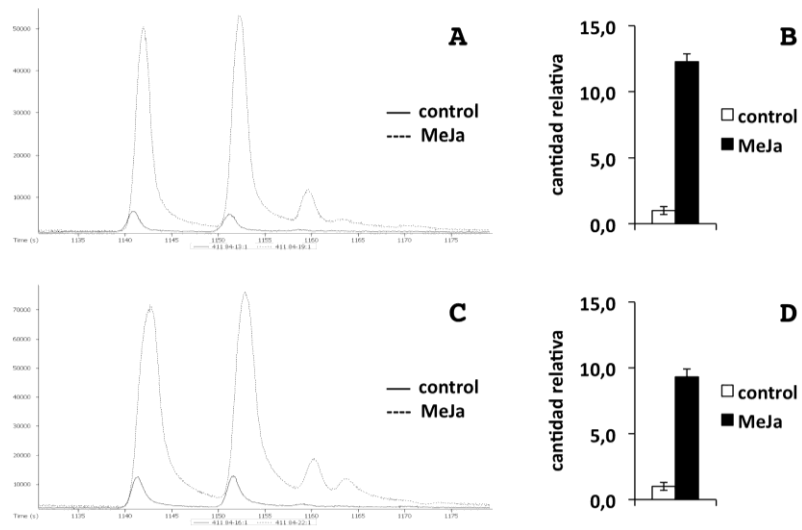


Fig. 4

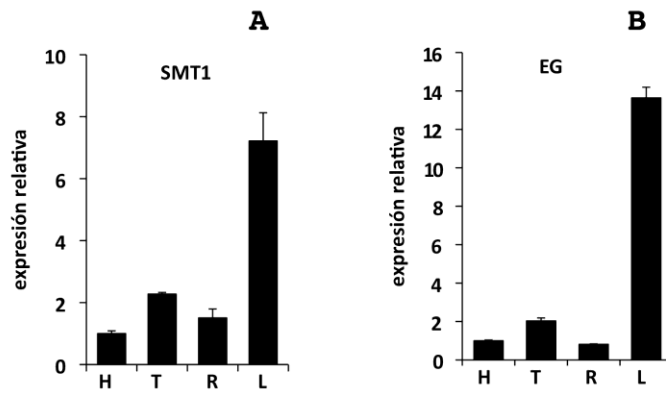


Fig. 5

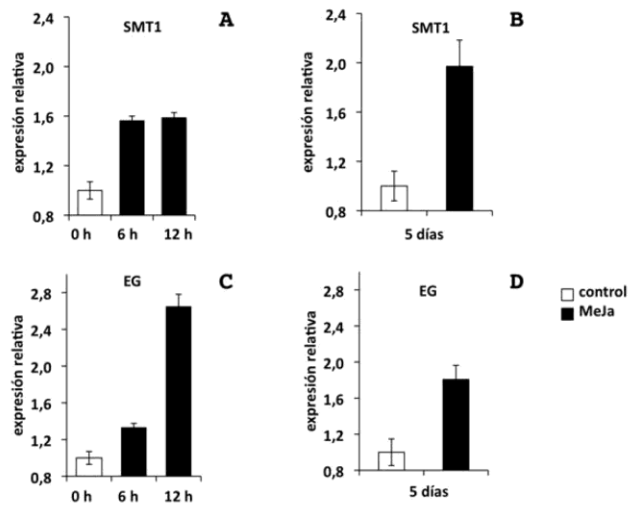


Fig. 6

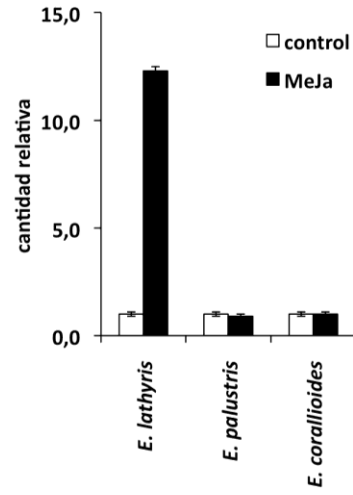


Fig. 7



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131692

②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.10.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A01H3/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MANGAS S., ET AL. The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of <i>Centella asiatica</i> , <i>Ruscus aculeatus</i> and <i>Galphimia glauca</i> cultured plants. <i>Phytochemistry</i> . 2006. Vol. 67, páginas 2041-2049.	1-14
A	LEE M-H., ET AL. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in <i>Panax ginseng</i> overexpressing squalene synthase gene. 2004. <i>Plant Cell Physiol</i> . Vol. 45(8), páginas 976-984.	1-14
A	KIM Y.S., ET AL. Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in <i>Bupleurum falcatum</i> . 2010. <i>Planta</i> . Vol. 233(2), páginas 343-355.	1-14

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
10.05.2012

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

A01H

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.05.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MANGAS S., ET AL. The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of <i>Centella asiatica</i> , <i>Ruscus aculeatus</i> and <i>Galphimia glauca</i> cultured plants. <i>Phytochemistry</i> . Vol. 67, páginas 2041-2049.	2006
D02	LEE M-H., ET AL. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in <i>Panax ginseng</i> overexpressing squalene synthase gene. <i>Plant Cell Physiol</i> . Vol. 45(8), páginas 976-984.	2004
D03	KIM Y.S., ET AL. Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in <i>Bupleurum falcatum</i> . <i>Planta</i> . Vol. 233(2), páginas 343-355.	2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP 11/1986)**

La solicitud de patente divulga un procedimiento de obtención de biomasa enriquecida en triterpenos caracterizado porque comprende tratar la planta *Euphorbia lathyris* con al menos un jasmonato.

Los documentos D01, D02 y D03 muestran diferentes aspectos que relacionan el jasmonato de metilo con la producción de triterpenos en diferentes especies vegetales. En ninguno de los documentos citados se refleja que el tratamiento de *Euphorbia lathyris* con jasmonato tenga como consecuencia una obtención de biomasa enriquecida en triterpenos. Por tanto, las reivindicaciones 1-14 presentan novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 de LP 11/1986.