(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 395 567**

(21) Número de solicitud: 201131051

(51) Int. Cl.:

C12N 15/01 (2006.01)
A23D 9/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

22.06.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

13.02.2013

(71) Solicitantes:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
SERRANO, 117
28006 MADRID ES

(72) Inventor/es:

VELASCO VARO, Leonardo;
FERNÁNDEZ MARTÍNEZ, José María;
PÉREZ VICH, Begoña y
FERNANDEZ DE LA CUESTA, Álvaro

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

(54) Título: **ACEITE DE GIRASOL CON ELEVADO CONTENIDO EN FITOESTEROLES**

(57) Resumen:
Aceite de girasol con elevado contenido en fitoesteroles.
Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles que se caracteriza por poseer entre 7660 y 14980 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado.

ES 2 395 567 A1

DESCRIPCIÓN

Aceite de girasol con elevado contenido en fitoesteroles.

El objeto de la presente invención es un aceite de girasol con elevado contenido en esteroles vegetales o fitoesteroles, que se caracteriza por poseer entre 7660 y 14980 mg de fitoesteroles totales por kg de aceite no refinado. La fracción de fitoesteroles de este aceite está compuesta por campesterol, que representa entre el 4.2% y el 30.9% del total de fitoesteroles en el aceite, estigmasterol, que representa entre el 4.3% y el 29.8% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-7-campesterol, que representa entre el 0.2% y el 15.7% del total de fitoesteroles en el aceite, clerosterol, que representa entre el 0.2% y el 8.6% del total de fitoesteroles en el aceite, beta-sitosterol, que representa entre el 20.4% y el 85.2% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-5-avenasterol, que representa entre el 0.3% y el 20.9% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-5,24-estigmastadienol, que representa entre el 0.2% y el 10.0% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-7-estigmastenol, que representa entre el 2.1% y el 52.4% del total de fitoesteroles en el aceite, y delta-7-avenasterol, que representa entre el 0.6% y el 15.8% del total de fitoesteroles en el aceite. Constituye otro objeto de la presente invención las semillas de girasol que contienen un aceite con las mencionadas características y las plantas de girasol que al ser autofecundadas producen semillas con las características mencionadas. Constituyen también objeto de la presente invención el método de análisis del contenido en fitoesteroles a partir de semillas enteras de girasol, trozos de semillas de girasol o harina de girasol, así como el método para la obtención de semillas de girasol con contenido elevado en fitoesteroles consistente en tratamiento mutagénico de semillas de girasol e identificación de mutantes mediante análisis no destructivo de semillas de girasol empleando el método de análisis arriba mencionado. La extracción de los fitoesteroles contenidos en este aceite así como la utilización del aceite y de los fitoesteroles extraídos a partir de él en alimentación humana y animal y en la formulación de alimentos y productos nutracéuticos o farmacéuticos enriquecidos en fitoesteroles son asimismo objeto de la presente invención.

SECTOR DE LA TÉCNICA

La invención se enmarca en el sector de la agricultura, en el sector alimentario, y en el sector nutracéutico y farmacéutico. El aceite de girasol objeto de la presente invención presenta un elevado contenido en fitoesteroles (también denominados esteroles vegetales o simplemente esteroles), muy superior a la de otros aceites de girasol existentes en la actualidad. El elevado contenido en fitoesteroles le confiere un elevado valor nutricional debido al potencial de los fitoesteroles para reducir los niveles de colesterol en sangre. Asimismo, el elevado contenido en fitoesteroles en el aceite permite rentabilizar la extracción de los mismos para su empleo en la preparación de alimentos enriquecidos en fitoesteroles o en formulados nutracéuticos o farmacéuticos que incluyan fitoesteroles en su composición.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. Entre los factores de riesgo para estas enfermedades se encuentra un nivel elevado de colesterol en sangre, particularmente de colesterol-LDL (World Health Organization, 2003. *The World Health Report. Shaping the Future*. WHO, Geneva, Switzerland). El colesterol, perteneciente al amplio grupo de compuestos isoprenoides, es el principal esterol presente en animales. Sus equivalentes en plantas son los esteroles vegetales o fitoesteroles, que presentan una gran similitud química y funcional con el colesterol. En ambos casos, se trata de moléculas derivadas del escualeno y constan de un anillo tetracíclico ciclopentanoperhidrofenantreno y una cadena lateral en el carbono C17 (Fig. 1). Se han identificado más de 250 fitoesteroles diferentes. La mayoría de ellos, al igual que el colesterol, presentan un doble enlace entre los carbonos C5 y C6 del anillo tetracíclico, y se denominan delta-5-esteroles. A este grupo pertenecen los fitoesteroles más comunes, entre los que se encuentran sitosterol, campesterol, estigmasterol, y delta-5-avenasterol. Otro grupo de fitoesteroles presentan un doble enlace entre los carbonos C7 y C8 del anillo tetracíclico, y se denominan delta-7-esteroles. En este grupo se encuentan entre otros delta-7-avenasterol, delta-7-estigmastenol y gramisterol. Algunos de los fitoesteroles de los tipos delta-5 y delta-7 pueden presentar asimismo un doble enlace adicional en la cadena lateral, como por ejemplo estigmasterol (delta-5,22; Fig. 1). Por último, existen también fitoesteroles saturados, es decir, sin dobles enlaces, denominados fitoestanoles. A efectos de simplificación, en esta descripción del estado de la técnica se hablará de fitoesteroles en general, incluyendo en este término también a los fitoestanoles.

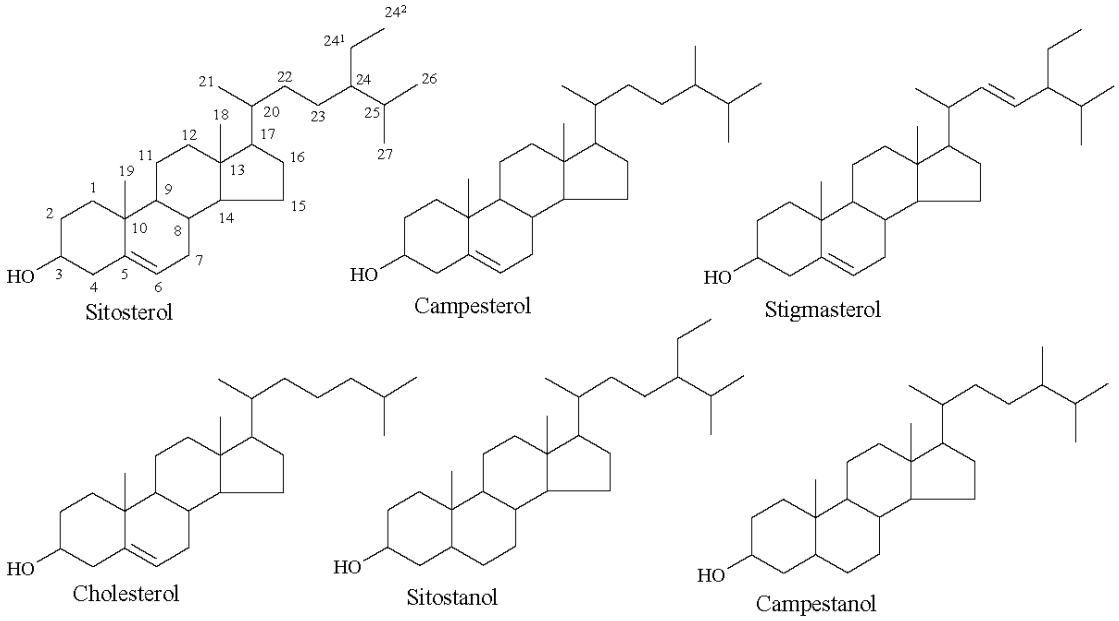

Fig. 1. Estructura química de algunos de los fitoesteroles (sitosterol, campesterol, stigmasterol) y fitoestanoles (sitostanol, campestanol) más comunes en comparación con el colesterol.

Los fitoesteroles se encuentran tanto de forma libre como de forma conjugada con otros compuestos, principalmente ácidos grasos y glucósidos (Piironen et al., 2000. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:939-966).

Los fitoesteroles han sido empleados tradicionalmente en la industria cosmética y farmacéutica, si bien el principal interés sobre estos compuestos se debe a la aparición de aplicaciones en el campo de la alimentación, inicialmente como aditivos o ingredientes alimentarios naturales, y más recientemente como unos de los principales productos de la nutracéutica, una nueva ciencia que estudia los efectos terapéuticos de los componentes de los alimentos (Kritchevsky y Chen, 2005. Phytosterols- health benefits and potential concerns: a review. *Nutrition Research* 25:413-428). A mediados de la década de 1950 se descubrió que los fitoesteroles poseían la propiedad de reducir los niveles de colesterol en animales (Peterson, 1951. Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 78:143-147) y humanos (Pollak, 1953. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* 7: 702-706). Desde entonces, se han sucedido numerosos estudios que han confirmado el efecto de los fitoesteroles en la dieta en la reducción de los niveles de colesterol LDL y la mortalidad causada por enfermedades coronarias (Andersson et al., 2004. Intake of dietary plant sterols is inversely related to serum cholesterol concentration in men and women in the EPIC Norfolk population: a cross-sectional study. *European Journal of Clinical Nutrition* 58: 1378-1385). A raíz de estos estudios, los fitoesteroles empezaron a ser considerados como compuestos con un excepcional interés farmacológico y nutricional, si bien, debido a su baja solubilidad, su administración debe realizarse previa transformación en sus correspondientes ésteres, que presentan asimismo gran valor fisiológico en la reducción de los niveles de colesterol (Vanhanen et al., 1994. Serum levels, absorption efficiency, faecal elimination and synthesis of cholesterol during increasing doses of dietary sitostanol esters in hypercholesterolaemic subjects. *Clinical Science* 87: 61-67). Su utilización comercial en alimentos enriquecidos comenzó en 1995 en Finlandia, donde se lanzó al mercado por primera vez una margarina enriquecida con fitoestanoles (Benecol®, Raisio Plc., Raisio, Finlandia). En la actualidad, se puede encontrar en el mercado un amplio espectro de productos enriquecidos con fitoesteroles y fitoestanoles, que incluye margarinas, quesos, bebidas lácteas, o incluso pasta (Salo et al., 2005. Plant estanol ester as cholesterol-lowering ingredient of Benecol® foods. In: *Healthful Lipids*. C.A. Akoh, O.M. Lai, eds. AOCS Press, Champaign, IL, EE.UU, pp. 699-730).

La principal fuente natural de fitoesteroles en la dieta son los aceites vegetales y sus productos derivados (margarinas, etc.), seguidos de los cereales y frutos secos. En la Tabla 1 se muestra el contenido medio en esteroles de los principales aceites vegetales comestibles sin refinar.

Tabla 1. Contenido medio (mg kg^{-1}) de los principales fitoesteroles en aceites vegetales comestibles no refinados (Padley et al., 1994. Occurrence and characteristics of oils and fats. In *The Lipid Handbook*, eds. F.D. Gunstone, J.L. Harwood and F.B. Padley. London: Chapman & Hall, pp. 47-223).

	Maiz	Oliva	Palma	Colza	Soja	Girasol
Campesterol	2691	28	358	1530	720	313
Estigmasterol	702	14	204	0	720	313
Beta-sitosterol	7722	1310	1894	3549	1908	2352
Δ5-avenasterol	468	29	51	122	108	156
Δ7-estigmastenol	117	58	25	306	108	588
Δ7-avenasterol	0	0	0	0	36	156
Brassicasterol	0	0	0	612	0	0
Otros	0	0	0	0	0	39
Total	11700	1439	2532	6119	3600	3917

Al igual que ocurre con otros compuestos presentes en las semillas, por ejemplo ácidos grasos o tocoferoles, la cantidad total y perfil de fitoesteroles dentro de una determinada especie vegetal está determinada tanto por el genotipo de la planta como por factores ambientales (Amar et al., 2008. Genetic variation and genotype x environment interactions of phytosterol content in three doubled haploid populations of winter rapeseed. *Crop Science* 48:1000-1006). En el caso del girasol, no obstante, apenas se han realizado hasta la fecha estudios sobre variabilidad genética y ambiental para contenido total y perfil de fitoesteroles en semillas. Vlahakis y Hazebroek (2000. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: effects of genetics, planting location, and temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77:49-53) encontraron un rango de variación entre 2100 y 4540 mg kg^{-1} aceite en 12 variedades de girasol cultivadas en varios ambientes, concluyendo que la variación era consecuencia tanto de diferencias genéticas entre las variedades como de efectos ambientales. Gotor et al. (2007. Quantification of sunflower minor components by near infrared spectrometry NIR. *Helia* 30:183-190) evaluaron una amplia colección de variedades y líneas puras de girasol en varios ambientes y encontraron un rango de variación para contenido en fitoesteroles entre 1250 y 7650 mg kg^{-1} aceite. El perfil medio de fitoesteroles en aceite de girasol está compuesto por 8% campesterol, 8% estigmasterol, 60% beta-sitosterol, 4% delta-5-avenasterol, 15% delta-7-estigmastenol, 4% delta-7-avenasterol, y 1% de otros fitoesteroles menores (Padley et al., 1994. Occurrence and characteristics of oils and fats. In *The Lipid Handbook*, eds. F.D. Gunstone, J.L. Harwood and F.B. Padley. London: Chapman & Hall, pp. 47-223). Algunos autores han estudiado los rangos de variación para perfil de fitoesteroles en aceite de girasol. Vlahakis y Hazebroek (2000. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: effects of genetics, planting location, and temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77:49-53)) encontraron niveles máximos de 20% campesterol, 18% estigmasterol, y 82% beta-sitoesterol. Verleyen et al. (2002. Analysis of free and sterified sterols in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79:117-122) describieron niveles máximos de 16% campesterol, 9% estigmasterol, 69% beta-sitosterol, y 15% delta-5-avenasterol. El Real Decreto 308/1983 de 25 de enero por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles (BOE Núm. 44 de 21 de febrero de 1983, páginas 4853-4858) no establece límites para contenido total o perfil de esteroles en el aceite de girasol. Por el contrario, el Real Decreto 478/2007 de 13 de abril por el que se modifica el Real Decreto 308/1983 (BOE Núm. 99 de 25 de abril de 2007, páginas 18069-18070) especifica que el aceite de girasol debe contener un total de esteroles totales comprendidos entre 1700 y 5200 ppm (ppm = mg de esteroles por kg de aceite), con una composición que debe cumplir los siguientes límites: menor o igual a 0.5% de colesterol, menor o igual a 0.2% de brasicasterol, de 5.0 a 13.0% de campesterol, de 4.5 a 13.0% de estigmasterol, de 42.0 a 70.0% de beta-sitosterol, de 1.5 a 6.9% de delta-5-avenasterol, de 6.5 a 24.0% de delta-7-estigmasterol, de 3.0 a 9.0% de delta-7-avenasterol, y menor o igual a 9.5% de otros esteroles. Debe señalarse que en el mencionado Real Decreto 478/2007 de 13 de abril se confunde delta-7-estigmastenol por delta-7-estigmasterol, lo que ya aparece corregido en el Real Decreto 1716/2010 de 17 de diciembre por el que se modifica el real decreto 308/1983 (BOE Núm. 317 de 30 de diciembre de 2010, páginas 108823-108825), en el que se establecen los mismos límites de contenido total y perfil de esteroles a los establecidos en el Real Decreto 478/2007, pero referidos específicamente a los aceites de girasol procedentes de semillas con alto esteárico-alto oleico.

Roche et al. (2006. Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108:287-297) estudiaron los efectos ambientales sobre la acumulación de fitoesteroles en semillas de girasol, concluyendo que tanto la temperatura como la disponibilidad de agua durante la fase de formación de las semillas ejercían gran influencia sobre la acumulación de fitoesteroles en semillas de girasol.

El desarrollo de germoplasma de girasol con mayor contenido en fitoesteroles en semillas al descrito en la literatura permitiría el desarrollo de nuevos productos con alto contenido natural en fitoesteroles y permitiría reducir costes de producción en el aislamiento de fitoesteroles naturales a partir de aceite de girasol. No obstante, no existen en la literatura trabajos dirigidos al desarrollo de germoplasma de girasol con niveles elevados de fitoesteroles.

Entre las técnicas existentes para crear nueva variación genética no existente en el germoplasma de un cultivo determinado, destacan las técnicas de inducción de mutaciones o mutagénesis. La mutagénesis consiste en la aplicación de un agente con propiedades mutagénicas a una parte de la planta para inducir modificaciones en su ADN. Cuando el agente mutagénico se aplica a las semillas, estas alteraciones del ADN o mutaciones se transmiten a la descendencia y, una vez identificadas aquellas de interés y fijadas, dan lugar a nuevos caracteres que pueden introducirse en variedades comerciales o cultivares. El tratamiento mutagénico genera alteraciones genéticas aleatorias en puntos determinados del genoma de la planta. No obstante, cuando el tratamiento se aplica a un número elevado de semillas, se maximiza la probabilidad de cubrir todo el genoma de la planta y por tanto de generar variación para el carácter deseado. Von Wettstein et al. (1959. *Mutationsforschung und Züchtung. 1st Edition*. Westdteutscher Verlag, Köln, Germany, pp. 21-28) citan varios ejemplos sobre la reproducibilidad de los tratamientos mutagénicos, es decir, la obtención de forma consistente de un tipo determinado de mutante siempre que el tratamiento y la evaluación de mutantes se realicen sobre un número suficiente de individuos. Otros ejemplos los encontramos en los trabajos de Jenkins (1959) sobre Drosophila (Mutagenesis at a complex locus in Drosophila with the monofunctional alkylating agent, ethyl methanesulphonate. *Genetics* 57:783-793), y Svetleva (2004) sobre la obtención de mutante cloróticos en judía (Induction of chlorophyll mutants in common bean under the action of chemical mutagens ENU and EMS. *Journal of Central European Agriculture* 5:85-90). En relación con caracteres bioquímicos de las semillas, deben mencionarse varios ejemplos sobre la obtención del mismo carácter modificado a través de varios experimentos independientes de mutagénesis. Así, se han obtenido mediante mutagénesis semillas de soja con niveles elevados en ácido palmítico de forma independiente por Erickson et al. (1988. Inheritance of altered palmitic acid percentage in two soybean mutants. *Journal of Heredity* 79:465-468), Bubeck et al. (1989, Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. *Crop Science* 29:652-656), Fehr et al. (1991. Inheritance of elevated palmitic acid content in soybean seed oil. *Crop Science* 31: 1522-1524), y Takagi et al. (1995. Reduced and elevated palmitic acid mutants in soybean developed by X- ray irradiation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59:1778-1779). También en soja, varios experimentos independientes de mutagénesis dieron como resultado la detección y fijación de mutantes con alto contenido en ácido esteárico, destacando los trabajos de Hammond y Fehr (1983. Registration of A6 germplasm line of soybean. *Crop Science* 23: 192-193), Graef et al. (1985. Inheritance of three stearic acid mutants of soybean. *Crop Science* 25:1076-1079), Bubeck et al. (1989. Inheritance of palmitic and stearic acid mutants of soybean. *Crop Science* 29:652-656), y Rahman et al. (1995. High stearic acid soybean mutant induced by X-ray irradiation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59: 922-923). Otro ejemplo interesante lo encontramos en especies de brassicas oleaginosas, donde se ha obtenido germoplasma con bajo contenido en ácido linolénico en una gran número de trabajos independientes de mutagénesis empleando una amplia gama de agentes mutágenos químicos y físicos, destacando los trabajos de Rakow (1973. Selektion auf Linol- und Linolensäuregehalt in Rapssamen nach mutagener Behandlung. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtg* 69:62-82), Röbbelen y Nitsch (1975. Genetical and physiological investigations on mutants for polyenoic fatty acids in rapeseed, Brassica napus L. I. Selection and description of new mutants. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtg* 75:93-105), Auld et al. (1992. Rapeseed mutants with reduced levels of polyunsaturated fatty acids and increased levels of oleic acid. *Crop Science* 32:657-662), Velasco et al. (1997. Induced variability for C18 unsaturated fatty acids in Ethiopian mustard. *Canadian Journal of Plant Science* 77:91-95), y Spasibionek (2006. New mutants of winter rapeseed – *Brassica napus* L. – with changed fatty acid composition. *Plant Breeding* 125:259-267). Por último, Fernández-Martínez et al. ((2009. Mutation breeding for oil quality improvement in sunflower. En: Q.Y. Shu, editor, *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Food and Agriculture Organization iof the United Nations, Rome, pp. 197-202) describieron varios ejemplos sobre mutantes con niveles modificados de ácido palmítico y ácido esteárico en semillas de girasol empleando diversos procedimientos de mutagénesis química y física Todos estos ejemplos ponen de manifiesto que las técnicas de mutagénesis permiten obtener los fenotipos deseados que no se encuentran disponibles en el germoplasma de la especie considerada, y que estas técnicas son reproducibles, es decir, el mismo carácter modificado puede obtenerse en diferentes experimentos realizados de forma independiente, siempre que se sigan los protocolos adecuados y se maneje un elevado número de plantas en las sucesivas generaciones del programa de mutagénesis.

Como se acaba de mencionar, uno de los aspectos clave para la obtención de un determinado fenotipo mediante mutagénesis es el manejo de un elevado número de individuos. El caso más general es la aplicación del tratamiento mutagénico a las semillas. Existe una amplia gama de productos químicos y tipos de radiaciones que producen alteraciones genéticas. A los primeros se les conoce momo mutantes químicos, y a los segundos como mutantes físicos. Entre los mutante químicos destacan como más utilizados en tratamientos de semillas el metil sulfonato de etilo (EMS), azida sódica (NaN3), etilnitrosourea (ENU), N-metilnitrosourea (NMU), y dimetilsulfato (DMS). Entre los mutantes físicos destacan los rayos X, rayos gamma, y neutrones rápidos. Los diferentes agentes mutagénicos difieren en su modo de acción pero, como se comentó anteriormente, un mismo carácter modificado puede obtenerse con distintos agentes mutagénicos (Von Wettstein et al., 1959. *Mutationsforschung und Züchtung*. 1st Edition. Westdteutscher Verlag, Köln, Germany, pp. 21-28). Aspectos clave para el éxito del tratamiento mutagénico es el empleo de la metodología adecuada (tratamiento previo de las semillas, uso de la dosis adecuada, tiempo de aplicación del agente mutágeno, etc.) así como la aplicación de la misma a un elevado número de semillas. Cuanto mayor sea el número de semillas sometidas a tratamiento, mayor será la probabilidad de obtener el fenotipo deseado.

Las semillas sometidas a tratamiento mutagénico reciben en nombre de semillas M_1, y las plantas derivadas de ellas plantas M_1.

En general las mutaciones son recesivas, es decir, no se expresan a nivel de semillas M_1 o plantas M_1 sino a nivel semillas M_2 (semillas producidas por las plantas M_1) o plantas M_2 (plantas derivadas de semillas M_2), dependiendo de la naturaleza del control genético del carácter. En los caracteres gametofíticos, controlados por el genotipo del embrión en desarrollo, las mutaciones recesivas pueden detectarse a nivel de semillas M_2 individuales. Por el contrario, en los caracteres esporofíticos, controlados por el genotipo de la planta madre, las mutaciones recesivas se detectan a nivel de plantas M_2 mediante el análisis de muestras de semillas M_3 producidas por las plantas M_2. El contenido en fitoesteroles en semillas es un carácter esporofítico (Amar et al., 2008. Genetic variation and genotype x environment interactions of phytosterol content in three doubled haploide populations of winter rapeseed. *Crop Science* 48:1000-1006).

Debido a su naturaleza esporofítica, la detección de mutaciones que afectan al contenido en fitoesteroles requiere el análisis de un gran número de plantas M_2 derivadas del tratamiento de semillas M_1 con agentes mutagénicos químicos o físicos. La identificación de mutantes con niveles elevados de fitoesteroles sólo es posible si se dispone de una técnica analítica que permita analizar el contenido en fitoesteroles de forma no destructiva, rápida y precisa. Sin embargo, los métodos tradicionales para el análisis de fitoesteroles en semillas vegetales requieren la extracción previa del aceite de las semillas (Dutta and Normen, 1998. Capillary column gas-liquid chromatographic separation of 5-unsaturated and saturated phytosterols. *Journal of Chromatography A* 816:177–184). La necesidad de extraer el aceite ralentiza el proceso de análisis y no permite manejar grandes tamaños de poblaciones. Alternativamente, y tomando como base métodos para analizar el contenido en colesterol en alimentos (Klatt et al., 1995. Cholesterol analysis in foods by direct saponification-gas chromatographic method: collaborative study. *Journal of AOAC International* 78:75-79), se han desarrollado métodos que permiten analizar el contenido en fitoesteroles en materias primas sólidas tales como harina de trigo (Toivo et al., 2000. Factors affecting sample preparation in the gas chromatographic determination of plant sterols in whole wheat flour. *Food Chemistry* 68:239-245) o semillas de colza (Amar et al., 2008. Genetic variation and genotype x environment interactions of phytosterol content in three doubled haploide populations of winter rapeseed. *Crop Science* 48:1000-1006). Estas técnicas, sin embargo, son destructivas (las semillas analizadas son destruidas durante el proceso de análisis y por consiguiente no pueden sembrarse para dar lugar a la siguiente generación) y no han sido adaptadas a los requerimientos de los programas de selección a partir de mutagénesis, basados principalmente en el análisis no destructivo de un gran número de muestras consistentes en un pequeño número de semillas. La combinación de técnicas de mutagénesis con técnicas eficientes de detección de mutantes de forma no destructiva ha permitido el desarrollo de un elevado número de mutantes de girasol con propiedades modificadas de la calidad de su aceite, principalmente con niveles modificados de ácidos grasos y tocoferoles (revisado por Fernández-Martínez et al., 2008. Sunflower. En: *Oil Crop Breeding*. J. Vollmann, I. Rajcan (eds), Springer, pp. 155-232). Sin embargo, no se han identificado hasta la fecha mutantes de girasol con niveles elevados de fitoesteroles en sus semillas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Descripción Breve

La presente invención se refiere a un aceite de girasol extraído a partir de semillas de girasol que presenta un elevado contenido en fitoesteroles, superior al contenido en fitoesteroles de cualquier aceite de girasol existente en el mercado o descrito en la literatura. Este aceite posee entre 7660 y 14980 mg de fitoesteroles totales por kg de aceite no refinado. La fracción de fitoesteroles de este aceite está compuesta por campesterol, que representa entre el 4.2% y el 30.9% del total de fitoesteroles en el aceite, estigmasterol, que representa entre el 4.3% y el 29.8% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-7-campesterol, que representa entre el 0.2% y el 15.7% del total de fitoesteroles en el aceite, clerosterol, que representa entre el 0.2% y el 8.6% del total de fitoesteroles en el aceite, beta-sitosterol, que representa entre el 20.4% y el 85.2% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-5-avenasterol, que representa entre el 0.3% y el 20.9% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-5,24-estigmastadienol, que representa entre el 0.2% y el 10.0% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-7-estigmastenol, que representa entre el 2.1% y el 52.4% del total de fitoesteroles en el aceite, y delta-7-avenasterol, que representa entre el 0.6% y el 15.8% del total de fitoesteroles en el aceite.

La presente invención se refiere también a las semillas de girasol que contienen un aceite con las mencionadas características, y las plantas de girasol que al ser autofecundadas producen semillas con las características mencionadas. No existen en la actualidad semillas de girasol que produzcan un aceite con el elevado contenido en fitoesteroles que el que presenta el aceite obtenido de las semillas objeto de la presente invención.

Constituyen también objeto de la presente invención el método de análisis del contenido en fitoesteroles a partir de semillas enteras de girasol, trozos de semillas de girasol o harina de girasol, así como el método para la obtención de semillas de girasol con contenido elevado en fitoesteroles consistente en tratamiento mutagénico de

semillas de girasol e identificación de mutantes mediante análisis no destructivo de semillas de girasol empleando el método de análisis arriba mencionado.

Asimismo constituye otro objeto de la presente invención la utilización del aceite y de los fitoesteroles extraídos a partir de él en alimentación humana y animal y en la formulación de alimentos y productos nutracéuticos o farmacéuticos enriquecidos en fitoesteroles.

Descripción Detallada

La presente invención se refiere a un aceite de girasol caracterizado por poseer un elevado contenido de fitoesteroles, que es producido por plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) que han sido modificadas genéticamente mediante un programa de mutagénesis. El contenido en fitoesteroles del aceite es de 7660 a 14980 mg de fitoesteroles totales por kg de aceite no refinado. Estos elevados niveles de fitoesteroles no son producidos en la naturaleza por plantas de girasol y han sido obtenidos mediante un proceso complejo consistente en inducción artificial de mutaciones, puesta a punto de un método de identificación de mutantes, identificación de plantas mutantes mediante aplicación de nuevo método desarrollado, y fijación del nuevo carácter identificado. El elevado contenido en fitoesteroles objeto de la presente invención es heredable y se produce siempre con independencia de las condiciones de cultivo.

El manejo de grandes poblaciones en el proceso de mutagénesis junto con la puesta a punto de un método eficiente de identificación de mutantes han permitido obtener elevados niveles de fitoesteroles totales con diferentes perfiles de fitoesteroles individuales. Así, la fracción de fitoesteroles de este aceite está compuesta por campesterol, que representa entre el 4.2% y el 30.9% del total de fitoesteroles en el aceite, estigmasterol, que representa entre el 4.3% y el 29.8% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-7-campesterol, que representa entre el 0.2% y el 15.7% del total de fitoesteroles en el aceite, clerosterol, que representa entre el 0.2% y el 8.6% del total de fitoesteroles en el aceite, beta-sitosterol, que representa entre el 20.4% y el 85.2% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-5-avenasterol, que representa entre el 0.3% y el 20.9% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-5,24-estigmastadienol, que representa entre el 0.2% y el 10.0% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-7-estigmastenol, que representa entre el 2.1% y el 52.4% del total de fitoesteroles en el aceite, y delta-7-avenasterol, que representa entre el 0.6% y el 15.8% del total de fitoesteroles en el aceite. La obtención de elevado contenido total en fitoesteroles junto con diferentes perfiles de los mismos indicó que el incremento del contenido total fue debido en algunas de las líneas obtenidas a una acumulación diferencial de uno o varios fitoesteroles individuales.

Para la obtención de las plantas modificadas genéticamente cuyas semillas dan lugar a un aceite con elevado contenido en fitoesteroles, se ha llevado a cabo un proceso de modificación genética de las semillas mediante mutagénesis consistente en cuatro etapas: (1) Inducción de mutaciones artificiales en semillas de una variedad de girasol con contenido estándar en fitoesteroles en su aceite mediante mutágenos químicos y físicos; (2) Puesta a punto de un método no destructivo de identificación de mutantes con niveles alterados de fitoesteroles adaptado al análisis de un elevado número de muestras de pequeño tamaño; (3) Identificación de individuos con niveles alterados de fitoesteroles; y (4) Fijación del nuevo carácter consistente en niveles elevados de fitoesteroles en las semillas y en el aceite extraído de las mismas.

Para la inducción de mutaciones en semillas se emplearon agentes mutagénicos químicos y físicos. Entre los agentes mutagénicos químicos destacan metil sulfonato de etilo (EMS), azida sódica (NaN3), etilnitrosourea (ENU), N-metilnitrosourea (NMU), y dimetilsulfato (DMS). Entre los mutantes físicos destacan los rayos X, rayos gamma, y neutrones rápidos. Antes de proceder al tratamiento mutagénico, fue necesario proceder a determinar las condiciones óptimas del tratamiento, incluyendo el pretratamiento de las semillas, dosis del agente mutagénico a aplicar, y tiempo de aplicación. En los tratamientos con agentes mutagénicos físicos, el tratamiento se realizó directamente sobre semillas intactas, sin necesidad de pretratamiento de las mismas. En el caso de tratamiento con un agente mutagénico químico, el pretratamiento consistió en sumergir las semillas en agua durante un período de tiempo determinado para favorecer el ablandamiento de la cubierta externa de la semilla y consiguientemente una mejor penetración del agente mutagénico.

La determinación de la dosis óptima de un determinado agente mutagénico requirió la realización de pruebas previas empleando diferentes tipos de pretratamiento de las semillas, dosis del agente mutagénico, y tiempo de aplicación. Una vez realizados los tratamientos, se sembraron las semillas y se determinó el porcentaje de germinación y supervivencia de plantas a los 40 días después del tratamiento y, en comparación con el porcentaje de germinación y supervivencia que presentaron las semillas sin tratar, se calculó la dosis letal 50% (LD 50), que es el tratamiento que inhibe la germinación o desarrollo del 50% de las semillas en comparación con las semillas no tratadas. Este tratamiento suele considerarse como el óptimo para la creación de nueva variación, ya que combina una buena supervivencia de plantas con una gran eficiencia en la inducción de mutaciones (Brunner, 1995. *Methods of induction of mutations*. Plant Breeding Unit. Joint FAO/IAEA Programme, IAEA Laboratories, Siebersdorf, Austria, 62 pp).

Los tratamientos mutagénicos se aplicaron a un elevado número de semillas, teniendo en cuenta una supervivencia aproximada del 50% de semillas como se ha mencionado anteriormente. Las semillas sometidas a tratamiento mutagénico reciben en nombre de semillas M_1. Una vez aplicado el tratamiento mutagénico con las condiciones óptimas de pretratamiento de las semillas, dosis de agente mutagénico y tiempo de aplicación determinados previamente, se procedió a la germinación de las semillas M_1. Para ello, las semillas se pusieron en papel de filtro humedecido con agua de grifo y se mantuvieron durante 48 h en cámara de crecimiento a 27ºC y en condiciones de oscuridad. Alternativamente las semillas pueden sembrarse en macetitas conteniendo sustrato vegetal o directamente en campo, si bien el porcentaje de germinación es mayor cuando la germinación se realiza en papel de filtro humedecido. Las semillas germinadas se trasplantaron a macetitas de tamaño aproximado 7x7x7 cm conteniendo sustrato vegetal y se mantuvieron en cámara de crecimiento durante 14 días a 25/18ºC (día/noche) con un fotoperíodo de 16 h. Transcurrido este tiempo las plantas, denominadas plantas M_1, se trasplantaron a campo o a macetas de mayor tamaño que se mantuvieron en invernadero o umbráculo. Con anterioridad al inicio de la floración, las inflorescencias se embolsaron con bolsas de papel para evitar la llegada de polen ajeno. Terminada la floración y maduración de las semillas, éstas se cosecharon a nivel de planta M_1 individual, se limpiaron y clasificaron. Las semillas cosechadas sobre plantas M_1 se denominan semillas M_2. Como el carácter contenido en fitoesteroles en semillas es un carácter esporofítico (Amar et al., 2008. Genetic variation and genotype x environment interactions of phytosterol content in three doubled haploide populations of winter rapeseed. *Crop Science* 48:1000-1006), no fue necesario analizar las semillas M_2, sino que éstas se sembraron para generar una gran población de plantas M_2. La siembra de semillas M_2 se realizó directamente en campo, mediante el procedimiento de “planta a surco” (plant to row), es decir, se siembra un surco de semillas M_2 por cada una de las plantas M_1 cosechadas. La distancia entre surcos fue de 1 m y la distancia entre plantas dentro del surco fue de 20 cm.

Las plantas M_2 procedentes de las semillas M_2 se identificaron de forma individual para poder seguir su genealogía. Las inflorescencias se embolsaron antes de la floración, como se ha descrito anteriormente. La recolección se realizó a nivel de plantas individuales. El conjunto de semillas M_3 recolectadas sobre cada una de las plantas M_2 constituye la muestra sobre la que se analizó el contenido en fitoesteroles con el objetivo de identificar posibles mutantes para este carácter. Junto a las plantas M_2 se cultivaron plantas de las líneas puras y cultivares de girasol cuyas semillas se sometieron a los tratamientos mutagénicos, y que se emplearon como control.

Para la identificación de posibles mutantes para contenido en fitoesteroles en el aceite, se procedió a analizar de forma no destructiva el contenido en aceite de las semillas y el contenido en fitoesteroles en las semillas. Con ambos análisis, fue posible determinar el contenido en fitoesteroles referido al contenido en aceite de las semillas. El análisis no destructivo fue necesario para maximizar la probabilidad de detectar mutantes, debido a que parte de las plantas M_2 produjeron un reducido número de semillas, debido a la presencia de mutaciones desfavorables consecuencia del tratamiento mutagénico. El análisis no destructivo de contenido en aceite en las semillas se realizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN), que permite analizar el contenido en aceite de muestras consistentes en 12 semillas (aquenios descascarillados) intactas de girasol. Una vez analizado el contenido en aceite, se aplicó la técnica de la media semilla a las semillas empleadas para el análisis de contenido en aceite. La técnica de la media semilla consiste en cortar un pequeño trozo de la semilla en su parte distal al embrión de forma que no se afecta la capacidad de germinación de la semilla. Esta técnica se ha empleado para el análisis del perfil de ácidos grasos en semillas de girasol (Conte et al., 1989. Half-seed analysis: rapid chromatographic determination of the main fatty acids of sunflower seed. *Plant Breeding* 102:158-165) y para el análisis del perfil de tocoferoles en semillas de girasol (Velasco et al., 2004. Novel variation for tocopherol profile in a sunflower created by mutagenesis and recombination. *Plant Breeding* 123:490-492) pero no había sido empleada hasta la fecha para el análisis del contenido en fitoesteroles en semillas de girasol. Los 12 trozos de semilla cortados se emplearon para el análisis de fitoesteroles en semilla, mientras que las 12 semillas cortadas, que contienen el embrión, se guardaron en tubos Eppendorf identificados con el código de la planta M_2 correspondiente y se conservaron en cámara fría (4 ºC) hasta el momento de la siembra.

Los 12 trozos de semilla procedentes de cada planta M_2 se dividieron en dos grupos de 6 trozos. Se analizó en contenido y perfil de fitoesteroles en uno de los dos grupos y el segundo se conservó refrigerado para ser analizado como muestra de confirmación en el caso que el análisis de la primera muestra arrojara un resultado interesante. Para el análisis del contenido total y perfil de fitoesteroles se puso a punto un nuevo método de análisis de fitoesteroles a partir de trozos de semillas de girasol basado en la adaptación de métodos desarrollados para materias primas sólidas tales como harina de trigo (Toivo et al., 2000. Factors affecting sample preparation in the gas chromatographic determination of plant sterols in whole wheat flour. *Food Chemistry* 68:239-245) o semillas enteras de colza (Amar et al., 2008. Genetic variation and genotype x environment interactions of phytosterol content in three doubled haploid populations of winter rapeseed. *Crop Science* 48:1000-1006). El método no destructivo desarrollado específicamente para el análisis de medias semillas de girasol y detección de mutantes con contenido elevado de fitoesteroles se describe en detalle en el Ejemplo 1 de esta memoria.

En este trabajo se emplearon varios agentes mutagénicos (véanse dos ejemplos en la próxima sección) sobre un total de 18000 semillas procedentes de varias líneas puras y cultivares de girasol, que dieron lugar a 7605 plantas

M_1 que alcanzaron la madurez y produjeron semillas M_2. Se sembraron a partir de ellas 6693 familias M_2 en campo, con una media de 11.96 plantas M_2 por cada familia M_1, resultando en un total de 80048 plantas M_2, de las cuales 12007 plantas produjeron menos de 24 semillas y fueron descartadas, mientras que 68041 plantas produjeron semillas M_3 que fueron analizadas para contenido en aceite y contenido en fitoesteroles en semilla mediante el método descrito anteriormente. Las plantas de las líneas control presentaron un contenido en fitoesteroles entre 3542 y 6455 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado, mientras que las plantas M_2 presentaron un rango de variación entre 2375 y 12698 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado. A nivel de perfil de fitoesteroles, las plantas de las líneas control presentaron un contenido en campesterol entre el 4.1% y el 11.7% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en estigmasterol entre el 2.6% y el 14.2% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-7-campesterol entre el 0.5% y el 4.2% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en clerosterol entre el 0.2% y el 2.9% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en beta-sitoesterol entre el 54.6% y el 75.8% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-5-avenasterol entre el 0.3% y el 5.1% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-5,24-estigmastadienol entre el 0.1% y el 2.2% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-7-estigmastenol entre el 5.8% y el 17.3% del total de fitoesteroles en el aceite, y un contenido en delta-7-avenasterol entre el 2.0% y el 5.1% del total de fitoesteroles en el aceite. Las plantas M_2 presentaron un contenido en campesterol entre el 2.8% y el 27.6% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en estigmasterol entre el 3.3% y el 26.9% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-7-campesterol entre el 0.3% y el 12.7% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en clerosterol entre el 0.1% y el 7.0% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en beta-sitosterol entre el 36.4% y el 84.2% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-5-avenasterol entre el 0.2% y el 15.9% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-5,24-estigmastadienol entre el 0.1% y el 8.0% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-7-estigmastenol entre el 1.2% y el 46.7% del total de fitoesteroles en el aceite, y un contenido en delta-7-avenasterol entre el 0.2% y el 13.6% del total de fitoesteroles en el aceite.

A partir de la evaluación de plantas M_2, se seleccionaron 27 plantas M_2 con más de 9000 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado y se evaluaron 48 plantas M_3 por cada una de las plantas M_2 seleccionadas. El análisis de las plantas M_3 se hizo de forma no destructiva sobre 16 semillas M_4 producidas por cada planta M_3, como se ha descrito anteriormente para el análisis de las plantas M_2. Esta población de 8064 plantas M_3 presentó un rango de variación entre 7660 y 14980 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado. Para perfil de fitoesteroles, la población de 8064 plantas M_3 presentó un contenido en campesterol entre el 4.2% y el 30.9% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en estigmasterol entre el 4.3% y el 29.8% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-7-campesterol entre el 0.2% y el 15.7% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en clerosterol entre el 0.2% y el 8.6% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en beta-sitoesterol entre el 20.4% y el 85.2% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-5-avenasterol entre el 0.3% y el 20.9% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-5,24-estigmastadienol entre el 0.2% y el 10.0% del total de fitoesteroles en el aceite, un contenido en delta-7-estigmastenol entre el 2.1% y el 52.4% del total de fitoesteroles en el aceite, y un contenido en delta-7-avenasterol entre el 0.6% y el 15.8% del total de fitoesteroles en el aceite. La variación detectada para perfil de fitoesteroles dentro de la población de plantas M_3 con elevado contenido total en fitoesteroles indica que el incremento en el contenido total en fitoesteroles puede producirse por el incremento en el contenido en uno o varios fitoesteroles individuales. Cualquier mutación que favorezca la acumulación de un determinado fitoesterol repercute tanto sobre el contenido total en fitoesteroles en el aceite como en la proporción de ese fitoesterol en el conjunto de fitoesteroles totales del aceite.

Teniendo en cuenta el rango en el contenido total en fitoesteroles de las líneas de girasol obtenidas en el programa de mutagénesis, las realizaciones particulares de la invención incluyen aceites con un contenido en fitoesteroles superior a 7660 mg por kg de aceite no refinado, superior a 10000 mg por kg de aceite no refinado, y superior a 12500 mg por kg de aceite no refinado.

En otra realización particular de la invención el aceite de la invención presenta un contenido en campesterol superior al 21% del total de fitoesteroles en el aceite.

En otra realización particular de la invención el aceite de la invención presenta un contenido en estigmasterol superior al 19% del total de fitoesteroles en el aceite.

En otra realización particular de la invención el aceite de la invención presenta un contenido en delta-7-campesterol superior al 5% del total de fitoesteroles en el aceite.

En otra realización particular de la invención el aceite de la invención presenta un contenido en clerosterol superior al 3% del total de fitoesteroles en el aceite.

En otra realización particular de la invención el aceite de la invención presenta un contenido en beta-sitosterol inferior al 42% del total de fitoesteroles en el aceite.

En otra realización particular de la invención el aceite de la invención presenta un contenido en delta-5-avenasterol superior al 7% del total de fitoesteroles en el aceite.

En otra realización particular de la invención el aceite de la invención presenta un contenido en delta-5,24-estigmastadienol superior al 3% del total de fitoesteroles en el aceite.

En otras dos realizaciones particulares de la invención el aceite de la invención presenta un contenido en delta-7-estigmastenol superior al 25% del total de fitoesteroles en el aceite y superior al 35% del total de fitoesteroles en el aceite.

Y en otra realización particular de la invención el aceite de la invención presenta un contenido en delta-7-avenasterol superior al 10% del total de fitoesteroles en el aceite.

Dado el elevado contenido en fitoesteroles del aceite de la invención, este aceite y los fitoesteroles extraídos a partir del mismo puede ser utilizado de forma idónea en alimentación humana y/o animal. Igualmente el aceite de la invención y los fitoesteroles extraídos a partir de él pueden emplearse en la formulación de alimentos y productos nutracéuticos o farmacéuticos enriquecidos en fitoesteroles.

En una realización particular de la invención, el aceite de la invención es obtenible a partir de la extracción de semillas de girasol de la línea de semillas IASF-27, depositada el 5 de mayo de 2011 en el ATCC (American Type Culture Collection) Patent Depository, Manassas, VA, EEUU, con número de depósito PTA-11870.

Las mezclas de aceites que contienen el aceite de la invención también constituyen un objeto de la presente invención, así como la harina obtenida como el residuo del proceso de extracción del aceite a partir de las semillas de girasol.

Constituyen otro objeto de la presente invención las semillas de girasol que contienen un aceite con las características del aceite de la invención. Se trata de semillas que dan lugar a plantas que tras su germinación contienen en sus semillas, al ser autofecundadas, un aceite con las características del aceite de la invención, con independencia de las condiciones de cultivo de las plantas. En una realización particular las semillas de la invención proceden de la línea de girasol IASF-27, depositada el 5 de mayo de 2011 en el ATCC (American Type Culture Collection) Patent Depository, Manassas, VA, EEUU, con número de depósito PTA-11870. Las semillas objeto de la presente invención pueden ser utilizadas para la obtención del aceite de la invención.

Asimismo las plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) que al ser autofecundadas producen semillas que contienen el aceite de la invención también constituyen otro objeto de la presente invención.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1: Mutagénesis química

a) Material vegetal empleado

Se emplearon semillas de una entrada particular de la variedad Peredovik de girasol, seleccionada por presentar un elevado contenido total en fitoesteroles dentro del análisis de una amplia colección de germoplasma de girasol. Las semillas, analizadas antes del tratamiento mutagénico, presentaron un contenido en fitoesteroles de 5719 mg por kg de aceite. El perfil de fitoesteroles, analizado antes del tratamiento mutagénico, estuvo compuesto por 6.4% campesterol, 11.1% estigmasterol, 2.4% delta-7-campesterol, 0.5% clerosterol, 59.6% beta-sitosterol, 1.5% delta-5-avenasterol, 1.2% delta-5,24-estigmastadienol, 14.8% delta-7-estigmastenol, y 2.5% delta-7-avenasterol.

b) Cálculo de la dosis de mutágeno

Se tomaron lotes de 400 semillas de la variedad Peredovik y cada lote se sometió a una dosis de tratamiento mutagénico con el agente mutagénico metilsulfonato de etilo (EMS) con el objetivo de determinar la dosis óptima de tratamiento, próxima a la dosis letal 50 (LD50). Las dosis ensayadas fueron 30 mM, 50 mM, 70 mM, 90 mM, y 110 mM. Para la realización del tratamiento mutagénico, las semillas se embebieron durante 16 horas en agua. Pasado este tiempo, las semillas se transfirieron a una solución del agente mutagénico metilsulfonato de etilo (EMS) con una concentración de 30 mM, 50 mM, 70 mM, 90 mM, o 110 mM en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.0 durante 2 horas, manteniendo una agitación constante de 60 rpm. Tras este período, las semillas se lavaron durante 16 horas con agua de grifo y se sembraron en un medio inerte (vermiculita) para determinar el porcentaje de germinación y supervivencia. Se empleó asimismo un testigo al que no se le añadió agente mutagénico. El porcentaje de plantas viables a los 40 días del tratamiento fueron: 97.3% en el tratamiento testigo, 79.9% en el tratamiento a una dosis 30 mM de EMS, 72.3% en el tratamiento a una dosis 50 mM de EMS, 63.8% en el tratamiento a una dosis 70 mM de EMS, 52.7% en el

tratamiento a una dosis 90 mM de EMS, y 39.8% en el tratamiento a una dosis 110 mM de EMS. Se tomó como dosis óptima 90 mM de EMS, al ser la más próxima a la dosis letal 50.

c) Tratamiento mutagénico

Cuatro mil quinientas semillas de girasol de la variedad Peredovik se sometieron a un tratamiento mutagénico con metilsulfonato de etilo (EMS) a una concentración 90 mM siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Tras el tratamiento mutagénico, las semillas (generación M_1) se lavaron durante 16 horas con agua corriente y posteriormente se sembraron en el campo. A los 40 días de la siembra se hizo un conteo de plantas en el campo, resultando en un total de 1856 plantas M_1. Las inflorescencias de las plantas M_1 se embolsaron 3 días antes del indicio de la floración para la obtención de semilla M_2 procedente de autofecundación. Un total de 418 plantas M_1 produjeron menos de 24 semillas y fueron descartadas. Veinticuatro semillas M_2 de las restantes 1438 plantas M_1 se sembraron en campo en un surco individual por cada familia M_1, obteniéndose un total de 27380 plantas M_2. Cada planta fue embolsada antes de la floración para la obtención de la semilla M_3 procedente de autofecundación, como se ha descrito anteriormente.

d) Puesta a punto de un método de identificación de mutantes

El análisis del contenido total y perfil de fitoesteroles en 27380 muestras de semillas M_3 procedentes de plantas M_2 individuales es inviable empleando el método oficial de análisis de fitoesteroles (Norma UNE-EN ISO 12228:2000. BOE núm. 202 de 23 de agosto de 2000, páginas 30109-30113) que se basa en la extracción previa del aceite de las semillas. Por este motivo, se procedió al desarrollo de un método alternativo de análisis de muestras de semillas de girasol. El método tenía que cumplir cuatro requisitos: 1) debe ser no destructivo, debido a que muchas de las plantas M_2 produjeron un pequeño número de semillas M_3 que no podían ser destruidas en el proceso analítico; 2) debe emplear una cantidad pequeña de muestra y de reactivos químicos; 3) debe ser rápido y permitir el análisis de un elevado número de muestras por día; y 4) los resultados obtenidos con el método de análisis deben mostrar una buena correlación con los resultados obtenidos mediante el método oficial.

Para poder expresar los resultados obtenidos en el análisis del contenido en fitoesteroles en semillas de girasol como contenido en fitoesteroles en aceite, es necesario en primer lugar medir de forma no destructiva el contenido en aceite en las semillas (aquenios descascarillados). Para realizar este análisis, se descascarillaron 12 aquenios M_3 de cada planta M_2 y las 12 semillas se secaron en estufa a 45ºC durante 72 horas. A continuación se analizó el contenido en aceite en las semillas mediante resonancia magnética nuclear (RMN) en un equipo Oxford 400 analyzer (Oxford Analytical Instruments Ltd., Abingdon, OX, Reino Unido), empleando aceite crudo de girasol para la calibración del equipo. A cada una de las semillas empleadas en el análisis de contenido en aceite se les aplicó la técnica de la media semilla, consistente en cortar un pequeño trozo de la semilla en la parte distal al embrión de forma que no se afecta la capacidad de germinación de la semilla. Los 12 trozos de semilla cortados se emplearon para el análisis de fitoesteroles en semilla, mientras que las 12 semillas cortadas, que contienen el embrión, se guardaron en tubos Eppendorf identificados con el código de la planta M_2 correspondiente y se conservaron en cámara fría (4 ºC) hasta el momento de la siembra.

Los 12 trozos de semilla procedentes de cada planta M_2 se dividieron en dos grupos de 6 trozos. Se analizó el contenido y perfil de fitoesteroles en uno de los dos grupos y el segundo se conservó refrigerado para ser analizado como muestra de confirmación en el caso que el análisis de la primera muestra arrojara un resultado interesante. Para el análisis del contenido total y perfil de fitoesteroles se puso a punto un nuevo método de análisis de fitoesteroles a partir de trozos de semillas de girasol que se describe a continuación. Los trozos de semilla de girasol se pesaron en una balanza de precisión y se dispusieron en tubos de polipropileno de 10 ml, añadiéndose 200 microlitros de una solución de colestrol (99% pureza, referencia C8667, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) en hexano-etanol (3:2) a una concentración 0.1% como patrón interno. A continuación se procedió a realizar una etapa de hidrólisis alcalina. Para ello, se añadieron 2 mililitros de una solución al 2% de hidróxido potásico en etanol y se procedió a la molienda y homogenización de las semillas en la solución empleando un homogenizador Heidolph RC 500 (Heidolph, Kelheim, Alemania) equipado con una broca de acero inoxidable de 8 mm de diámetro, a una velocidad de 5,000 rpm durante 15 segundos. Los restos de semilla en la broca se arrastraron al tubo de polipropileno empleando 1 mililitro de la solución de hidróxido potásico en etanol. Los tubos se introdujeron en un baño de agua a 80ºC durante 15 minutos. Tras este período, se procedió a la extracción de la fracción insaponificable. Para ello, se añadieron 1 mililitro de hexano y 1.5 mililitros de agua y se agitaron los tubos en vortex. Tras este proceso, se formaron dos capas, con los fitoesteroles disueltos en hexano en la capa superior. Ésta se transfirió a un vial de vidrio de 2 mililitros que se mantuvo en horno a 37.5 ºC durante 16 horas. Posteriormente se procedió a una etapa de derivatización de los fitoesteroles. Para ello, se añadieron a los viales 50 microlitros de hexano y 50 microlitros de una solución sililante compuesta de piridina:hexametildisilazano:trimetilclorosilano en una proporción volumétrica 9:3:1 (Silan-Sterol-1, referencia 355650.0922, Panreac Química, Barcelona, España) y los viales se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, la solución se transfirió a un vial de vidrio conteniendo un microinserto de 200 microlitros y se centrifugaron a 4,000 revoluciones por minuto durante 10 minutos (Unicen 21, Ortoalresa, Madrid, España). Tras la centrifugación, los viales se taparon y se mantuvieron en congelador a -20ºC hasta su análisis mediante cromatografía de gases. La cromatografía de gases se realizó en un cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 600

GC equipado con columna capilar ZB-5 (diámetro interno = 0.25 mm, longitud = 30 m, grosor de relleno = 0.10 µm; Phenomenex, Torrance, CA, EEUU). Se empleó hidrógeno como gas portador a una presión de 125 KPa. El inyector y el detector de ionización de llama se mantuvieron a 320ºC. El régimen térmico del horno fue el siguiente: 240ºC como temperatura inicial, que fue aumentando a razón de 5ºC por minuto hasta una temperatura final de 265ºC, que se mantuvo durante 10 minutos. El tiempo final de análisis fue de 15 minutos. Las áreas de los diferentes fitoesteroles presentes en las semillas de girasol se identificaron mediante comparación de los tiempos de retención con patrones. La cuantificación del contenido total en fitoesteroles se realizó en base al área del patrón interno, cuya concentración en la muestra es conocida. Una vez conocidos el contenido en fitoesteroles en las semillas y el contenido en aceite en las semillas, se expresó el contenido en fitoesteroles como mg de fitoesteroles por kg de aceite. El método se validó con el método oficial de análisis de fitoesteroles, resultando en una correlación de r=0.85 entre los resultados de ambos métodos.

e) Identificación y caracterización de mutantes

El método de análisis del contenido total y perfil de fitoesteroles en semillas de girasol desarrollado para este trabajo, descrito en el apartado anterior, permitió el análisis de alrededor de 100 muestras por operario y día, lo que posibilitó el análisis de la población de 27380 plantas M_2 a nivel de plantas individuales. Tras esta evaluación, se encontró que 4 plantas M_2 presentaban un contenido en fitoesteroles superior a 9000 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado, que se fijó de forma arbitraria como límite de selección. Semillas M_3 de cada una de las plantas M_2 seleccionadas se sembraron en campo, se embolsaron para la obtención de semilla M_4 procedente de autofecundación, y se cosecharon a nivel de plantas individuales. Se evaluaron 48 plantas M_3 por cada una de las familias M_2. El contenido en fitoesteroles de las plantas M_3 estuvo entre 7660 y 11855 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado, mientras que el perfil de fitoesteroles fue diferente en distintas familias M_2, lo que indicó que se puede incrementar el contenido total en fitoesteroles mediante el incremento del contenido en fitoesteroles individuales. En la Tabla 2 se muestran los rangos de variación contenido total y perfil de fitoesteroles en las 48 plantas M_3 de cada una de las familias M_2 seleccionadas.

Tabla 2. Rangos de variación para contenido total en fitoesteroles (mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado) y perfil de fitoesteroles (% del total de fitoesteroles) en 4 familias M_2 procedentes e tratamiento mutagénico con EMS. Se analizaron 48 plantas M_3 por cada una de las familias M_2.

Carácter[a]	Familia M_2			
	IASF-27[b]	IASF-5894	IASF-9336	IASF-18589
Total	8042-11855	8268-11751	7942-10666	7660-9764
Camp	5.0-9.3	21.4-29.6	4.6-7.9	5.2-9.1
Est	5.1-7.2	19.1-26.3	4.6-7.1	9.5-13.6
7-Camp	0.8-1.5	8.6-11.9	0.4-1.1	0.2-0.6
Clero	0.6-1.2	0.5-0.9	0.6-1.1	0.3-0.8
Sito	60.8-73.4	27.6-36.8	22.3-48.3	71.4-80.9
5-Aven	0.7-1.6	0.4-1.1	0.8-1.2	0.5-1.0
5,24-Est	0.8-1.4	0.5-1.0	1.1-2.6	0.5-1.0
7-Est	11.2-15.9	6.3-11.1	35.5-52.4	2.1-4.5
7-Aven	1.9-4.7	2.0-4.9	3.6-7.4	0.6-1.3

[a]Total=Contenido total en fitoesteroles; Camp=Campesterol; Est=Estigmasterol; 7-Camp=Delta-7-Campesterol; Clero=Clerosterol; Sito=Beta-sitosterol; 5-Aven=Delta-5-Avenasterol; 5,24-Est=Delta-5,24-estigmastadienol; 7-Est=Delta-7-estigmastenol; 7-Aven=Delta-7-avenasterol.

[b]Las semillas de la línea IASF-27 han sido depositadas el 5 de mayo de 2011 en el ATCC (American Type Culture Collection) Patent Depository, Manassas, VA, EEUU, con número de depósito PTA-11870.

Tras los análisis de plantas M_3 individuales, se mezclaron partes iguales de semillas M_4 de cada planta M_3 para cada familia M_2, se extrajo el aceite de la mezcla de semillas y se analizó el contenido en fitoesteroles y el perfil de fitoesteroles en el aceite mediante el método oficial de análisis (Norma UNE-EN ISO 12228:2000; BOE núm. 202 de 23 de agosto de 2000, páginas 30109-30113). En las cuatro familias M_2, el contenido en fitoesteroles y perfil de fitoesteroles en el aceite determinados mediante el método oficial estuvo dentro de los rangos de variación mostrados para cada familia M_2 en la Tabla 2.

Ejemplo 2. Mutagénesis física

a) Material vegetal empleado

Se emplearon semillas de una selección de la línea pura IAS-13, desarrollada en el programa de mejora genética de girasol de Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC) y seleccionada por presentar alto contenido en fitoesteroles totales en el análisis de una amplia colección de germoplasma de girasol. Las semillas, analizadas antes del tratamiento mutagénico, presentaron un contenido en fitoesteroles de 5346 mg por kg de aceite. El perfil de fitoesteroles, analizado antes del tratamiento mutagénico, estuvo compuesto por 6.8% campesterol, 7.9% estigmasterol, 1.3% delta-7-campesterol, 0.8% clerosterol, 65.8% beta-sitosterol, 1.3% delta-5-avenasterol, 0.8% delta-5,24-estigmastadienol, 12.7% delta-7-estigmastenol, y 2.5% delta-7-avenasterol.

b) Cálculo de la dosis de mutágeno

Se tomaron lotes de 250 semillas de la línea pura IAS-13 y cada lote se sometió a una dosis de tratamiento mutagénico con rayos gamma emitidos por una fuente de ^{60}Co con el objetivo de determinar la dosis óptima de tratamiento, próxima a la dosis letal 50 (LD50). Las dosis ensayadas fueron 100 Gy, 200 Gy, 300 Gy, 400 Gy, 500 Gy, y 600 Gy. Tras el tratamiento, las semillas se mantuvieron durante 48 h en desecador y posteriormente se sembraron en un medio inerte (vermiculita) para determinar el porcentaje de germinación y supervivencia. Se empleó asimismo un testigo no tratado. El porcentaje de plantas viables a los 40 días del tratamiento fueron: 95.6% en el tratamiento testigo, 96.2% en el tratamiento a una dosis de 100 Gy, 94.4% en el tratamiento a una dosis de 200 Gy, 86.5% en el tratamiento a una dosis de 300 Gy, 77.2% en el tratamiento a una dosis de 400 Gy, 65.4% en el tratamiento a una dosis de 500 Gy, y 60.6% en el tratamiento a una dosis de 600 Gy. Se tomó como dosis óptima 600 Gy de radiación gamma.

c) Tratamiento mutagénico

Tres mil semillas de girasol de la línea pura IAS-13 se sometieron a un tratamiento mutagénico con rayos gamma emitidos por una fuente de ^{60}Co a una dosis de 600 Gy. Tras el tratamiento mutagénico, las semillas (generación M_1) se sembraron en el campo. A los 40 días de la siembra se hizo un conteo de plantas en el campo, resultando en un total de 1455 plantas M_1. Las inflorescencias de las plantas M_1 se embolsaron 3 días antes del indicio de la floración para la obtención de semilla M_2 procedente de autofecundación. Un total de 92 plantas M_1 produjeron menos de 24 semillas y fueron descartadas. Veinticuatro semillas M_2 de las restantes 1363 plantas M_1 se sembraron en campo en un surco individual por cada familia M_1, obteniéndose un total de 23182 plantas M_2. Cada planta fue embolsada antes de la floración para la obtención de la semilla M_3 procedente de autofecundación, como se ha descrito anteriormente.

d) Identificación y caracterización de mutantes

Se empleó el método de análisis del contenido total y perfil de fitoesteroles en semillas de girasol descrito en el Ejemplo 1 para el análisis de la población de 23182 plantas M_2 a nivel de plantas individuales. Tras esta evaluación, se encontró que 3 plantas M_2 presentaban un contenido en fitoesteroles superior a 9000 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado, que se fijó de forma arbitraria como límite de selección. Semillas M_3 de cada una de las plantas M_2 seleccionadas se sembraron en campo, se embolsaron para la obtención de semilla M_4 procedente de autofecundación, y se cosecharon a nivel de plantas individuales. Se evaluaron 48 plantas M_3 por cada una de las familias M_2. El contenido en fitoesteroles de las plantas M_3 estuvo entre 8162 y 14980 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado, mientras que el perfil de fitoesteroles fue diferente en distintas familias M_2. En la Tabla 3 se muestran los rangos de variación contenido total y perfil de fitoesteroles en las 48 plantas M_3 de cada una de las familias M_2 seleccionadas.

Tabla 3. Rangos de variación para contenido total en fitoesteroles (mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado) y perfil de fitoesteroles (% del total de fitoesteroles) en 3 familias M_2 procedentes de tratamiento mutagénico con rayos gamma. Se analizaron 48 plantas M_3 por cada una de las familias M_2.

Carácter	Familia M_2		
	IASF-30025	IASF-32158	IASF-45555
Total	12875-14980	10051-11460	8162-10122
Camp	5.2-8.0	4.7-7.1	4.2-8.3
Est	6.0-10.3	5.8-11.0	7.5-11.1
7-Camp	0.9-1.6	0.8-1.3	0.2-0.6
Clero	0.5-1.2	0.2-0.9	0.3-0.7
Sito	60.3-70.1	58.6-69.9	52.6-68.9
5-Aven	0.9-1.7	1.2-1.9	0.3-1.1
5,24-Est	0.8-1.4	0.6-1.1	0.4-0.9
7-Est	11.1-16.7	12.3-19.6	12.4-17.6
7-Aven	1.3-4.5	2.2-5.1	5.6-9.4

[a]Total=Contenido total en fitoesteroles; Camp=Campesterol; Est=Estigmasterol; 7-Camp=Delta-7-Campesterol; Clero=Clerosterol; Sito=Beta-sitosterol; 5-Aven=Delta-5-Avenasterol; 5,24-Est=Delta-5,24-estigmastadienol; 7-Est=Delta-7-estigmastenol; 7-Aven=Delta-7-avenasterol.

Tras los análisis de plantas M_3 individuales, se mezclaron partes iguales de semillas M_4 de cada planta M_3 para cada familia M_2, se extrajo el aceite de la mezcla de semillas y se analizó el contenido en fitoesteroles y el perfil de fitoesteroles en el aceite mediante el método oficial de análisis (Norma UNE-EN ISO 12228:2000. BOE núm. 202 de 23 de agosto de 2000, páginas 30109-30113). En las cuatro familias M_2, el contenido en fitoesteroles y perfil de fitoesteroles en el aceite determinados mediante el método oficial estuvo dentro de los rangos de variación mostrados para cada familia M_2 en la Tabla 2.

REIVINDICACIONES

1.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles que se caracteriza por poseer entre 7660 y 14980 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado.

2.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, que se caracteriza porque la fracción de fitoesteroles de este aceite está compuesta por campesterol, que representa entre el 4.2% y el 30.9% del total de fitoesteroles en el aceite, estigmasterol, que representa entre el 4.3% y el 29.8% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-7-campesterol, que representa entre el 0.2% y el 15.7% del total de fitoesteroles en el aceite, clerosterol, que representa entre el 0.2% y el 8.6% del total de fitoesteroles en el aceite, beta-sitosterol, que representa entre el 20.4% y el 85.2% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-5-avenasterol, que representa entre el 0.3% y el 20.9% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-5,24-estigmastadienol, que representa entre el 0.2% y el 10.0% del total de fitoesteroles en el aceite, delta-7-estigmastenol, que representa entre el 2.1% y el 52.4% del total de fitoesteroles en el aceite, y delta-7-avenasterol, que representa entre el 0.6% y el 15.8% del total de fitoesteroles en el aceite.

3.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, que se caracteriza por poseer un contenido total en fitoesteroles superior a 10000 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado, y preferentemente superior a 12500 mg de fitoesteroles por kg de aceite no refinado.

4.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, que se caracteriza porque el contenido en campesterol es superior al 21% del total de fitoesteroles presentes en el aceite.

5.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, que se caracteriza porque el contenido en estigmasterol es superior al 19% del total de fitoesteroles presentes en el aceite.

6.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, que se caracteriza porque el contenido en delta-7-campesterol es superior al 5% del total de fitoesteroles presentes en el aceite.

7.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, que se caracteriza porque el contenido en clerosterol es superior al 3% del total de fitoesteroles presentes en el aceite.

8.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, que se caracteriza porque el contenido en beta-sitosterol es inferior al 42% del total de fitoesteroles presentes en el aceite.

9.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, que se caracteriza porque el contenido en delta-5-avenasterol es superior al 7% del total de fitoesteroles presentes en el aceite.

10.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, que se caracteriza porque el contenido en delta-5,24-estigmastadienol es superior al 3% del total de fitoesteroles presentes en el aceite.

11.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, que se caracteriza porque el contenido en delta-7-estigmastenol es superior al 25% del total de fitoesteroles presentes en el aceite, y preferentemente superior al 35% del total de fitoesteroles presentes en el aceite.

12.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, que se caracteriza porque el contenido en delta-7-avenasterol es superior al 10% del total de fitoesteroles presentes en el aceite.

13.- Aceite de semilla de girasol con elevado contenido total en fitoesteroles según la reivindicación 1, caracterizado porque es obtenible a partir de la extracción de semillas de girasol de la línea de semillas IASF-27, depositada el 5 de mayo de 2011 en el ATCC (American Type Culture Collection) Patent Depository, Manassas, VA, EEUU, con número de depósito PTA-11870.

14. Mezclas de aceites que contienen un aceite de semilla de girasol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. Harina obtenida como el residuo del proceso de extracción de un aceite de semilla de girasol según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

16. Semillas de girasol caracterizadas porque contienen un aceite con las características de fitoesteroles descritas en las reivindicaciones 1 a 13.

17.- Semillas de girasol según la reivindicación 16, caracterizadas porque las plantas a las que dan lugar tras su germinación contienen en sus semillas, al ser autofecundadas, un aceite con las características de fitoesteroles descritas en las reivindicaciones 1 a 13, con independencia de las condiciones de cultivo de las plantas.

18.- Semillas de girasol según la reivindicación 16 caracterizadas porque la línea de la que proceden es la línea de girasol IASF-27, depositada con fecha 5 de mayo de 2011 en ATCC (American Type Culture Collection) Patent Depository, Manassas, VA, EEUU, con número de depósito PTA-11870.

19.- Plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) que al ser autofecundadas producen semillas que contienen un aceite con las características de fitoesteroles descritas en las reivindicaciones 1 a 13.

20.- Método de análisis del contenido en fitoesteroles en semillas enteras de girasol, trozos de semillas de girasol, o harina de girasol, consistente en: a) hidrólisis alcalina de las semillas enteras, trozos de semillas o harina de girasol; b) extracción de la fracción insaponificable; c) derivatización de los fitoesteroles; y d) separación y cuantificación de los fitoesteroles individuales mediante cromatografía de gases y uso de patrón interno.

21.- Método para la obtención de semillas de girasol con contenido elevado en fitoesteroles según las reivindicaciones 1 a 13, consistente en: a) Tratamiento de semillas de girasol con un agente mutagénico a una concentración suficiente y durante un período de tiempo suficiente para inducir mutaciones en genes implicados en la biosíntesis de fitoesteroles, de forma que las mutaciones inducidas resulten en un contenido elevado de fitoesteroles en semillas; b) Siembra de semillas mutagenizadas o semillas M_1, cultivo y autofecundación de plantas M_1 y obtención de semillas M_2; c) Siembra de semillas M_2, cultivo y autofecundación de plantas M_2 y obtención de semillas M_3; d) Corte de un pequeño trozo de semilla de la parte distal al embrión en un grupo de semillas M_3 de la misma planta M_2, y análisis del contenido en fitoesteroles de los trozos cortados de las semillas según el método de análisis objeto de la reivindicación 20, de forma que las semillas originales M_3 mantienen su capacidad germinativa y pueden ser sembradas en el caso de identificación de elevado contenido en fitoesteroles en los trozos analizados de las semillas.

22. Utilización de semillas de girasol según las reivindicaciones 16 a 18 para la obtención de aceite descrito en las reivindicaciones 1 a 13.

23. Utilización de aceite de girasol según las reivindicaciones 1 a 13 para la alimentación humana y animal.

24. Utilización de aceite de girasol según las reivindicaciones 1 a 13 para la elaboración de productos enriquecidos con fitoesteroles.

25. Utilización de aceite de girasol según las reivindicaciones 1 a 13 para la extracción de fitoesteroles contenidos en el mismo.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201131051

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 22.06.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***C12N15/01*** (2006.01)
A23D9/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 01/79513 A2 (UNILEVER NV [NL]; UNILEVER PLC [GB]; LEVER HINDUSTAN LTD [IN]; HARKER MARK [GB]; HELLYER SUSAN AMANDA [GB]; HOLMBER NIKLAS [GB]; SAFFORD DICK [GB]) 25-10-2001. Reivindicaciones.	1, 13-15, 17-19
X	WO 01/31027 A1 (UNILEVER NV [NL]; UNILEVER PLC [GB]; LEVER HINDUSTAN LTD [IN]; HARKER MARK [GB]; HELLYER SUSAN AMANDA [GB]; HOLMBERG NIKLAS [GB]; SAFFORD RICHARD [GB]) 03-05-2001. Reivindicaciones.	1, 13-15, 17-19
A	GOTOR, A.A., ET AL. Quantification of sunflower minor components by near infrared spectrometry (NIR). 2007. *Helia* Vol.30, páginas 183-190. Página 183.	1-19
A	WO 2004/007730 A1 (UNILEVER NV [NL]; UNILEVER PLC [GB]; LEVER HINDUSTAN LTD [IN]; HOLMBERG NIKLAS [SE]; SAFFORD RICHARD [GB]) 22-01-2004.	1-19

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	Examinador	Página
13.08.2012	**I. Rueda Molíns**	1/4

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

C12N, A23D

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: 13.08.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-19	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	2-12, 16	**SI**
	Reivindicaciones	1, 13-15, 17-19	**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	WO 01/79513 A2 (UNILEVER NV [NL]; UNILEVER PLC [GB]; LEVER HINDUSTAN LTD [IN]; HARKER MARK [GB]; HELLYER SUSAN AMANDA [GB]; HOLMBER NIKLAS [GB]; SAFFORD DICK [GB]).	25.10.2001
D02	WO 01/31027 A1 (UNILEVER NV [NL]; UNILEVER PLC [GB]; LEVER HINDUSTAN LTD [IN]; HARKER MARK [GB]; HELLYER SUSAN AMANDA [GB]; HOLMBERG NIKLAS [GB]; SAFFORD RICHARD [GB]).	03.05.2001
D03	GOTOR, A.A., ET AL. Quantification of sunflower minor components by near infrared spectrometry (NIR). *Helia* Vol.30, páginas 183-190.	2007
D04	WO 2004/007730 A1 (UNILEVER NV [NL]; UNILEVER PLC [GB]; LEVER HINDUSTAN LTD [IN]; HOLMBERG NIKLAS [SE]; SAFFORD RICHARD [GB]).	22.01.2004

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

La solicitud de patente divulga un aceite de girasol que presenta un elevado contenido en fitoesteroles.

Los documentos D01, D02 y D04 muestran diferentes procedimientos para incrementar el contenido de fitoesteroles en diferentes especies vegetales.

El documento D03 refleja un análisis del contenido de fitoesteroles presentes en el aceite de girasol.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)

En las reivindicaciones 1 y 13, de la solicitud de patente, se reivindica un aceite de semilla de girasol (que puede ser obtenible a partir de la línea de semillas IASF-27) con elevado contenido total en fitoesteroles que se caracteriza por poseer entre 7660 y 14980 mg de fitoesteroles por Kg de aceite no refinado. También está reivindicado en la solicitud de patente, en las reivindicaciones 14 y 15, mezclas de aceites que contengan el aceite de girasol anteriormente citado y la harina obtenida en el proceso de extracción del mismo. En las reivindicaciones 17-19 se reivindica el uso del aceite objeto de la invención para alimentación humana y animal, para la elaboración de productos enriquecidos en fitoesteroles y para la extracción de fitoesteroles contenidos en el mismo.

Los documentos D01 y D02 divulgan (en el apartado de reivindicaciones) como mediante la introducción de un determinado gen en una planta es posible obtener una planta modificada genéticamente que presente sus semillas con mayor contenido de fitoesteroles. El incremento del contenido de fitoesteroles de las semillas irá desde un 10% hasta un 30% (tal y como se refleja en la reivindicación 4 del documento D01 y en la reivindicación 2 del documento D02). Una de las especies vegetales citadas en los documentos D01 y D02, como posibles candidatas, para ser modificadas genéticamente es el girasol, tal y como se divulga en la reivindicación 7 del documento D01 y en la reivindicación 4 del documento D02.

En el estado de la técnica existen diferentes documentos que reflejan un rango de variación para el contenido de fitoesteroles, presentes en el aceite de girasol. Tal y como se indica en la página 7 de la descripción de la solicitud de patente, un documento que refleje lo expuesto anteriormente podría ser el documento D03, documento que muestra, en su página 183, un rango de variación para el contenido de fitoesteroles presentes en el aceite de girasol de 1250 a 7650 mg de fitoesteroles por Kg de aceite.

Teniendo en cuenta el rango de variación, para el contenido de fitoesteroles, presentes en el aceite de girasol, divulgado en el estado de la técnica, la obtención de un aceite de semilla de girasol con un contenido de fitoesteroles de entre 7660 y 14980 mg por Kg de aceite no presentaría dificultad técnica para un experto en la materia, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D01 o en el documento D02. Mezclar el aceite objeto de la invención con otros aceites, emplear la harina obtenida en el proceso de extracción del mismo, usar el aceite para alimentación, para elaborar productos enriquecidos en fitoesteroles, así como para la extracción de estos, son prácticas habituales reflejadas en el estado de la técnica. Por tanto, las reivindicaciones 1, 13-15, 17-19 presentan novedad, pero no actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 de la LP11/1986.