



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 30 280 T2 2007.10.11**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 185 160 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 30 280.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/05150**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 936 860.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/074470**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.06.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **14.12.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.03.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **23.08.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A01H 5/10 (2006.01)**
A23D 7/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

326501	04.06.1999	US
99204384	17.12.1999	EP
180455 P	04.02.2000	US

(73) Patentinhaber:

**Consejo Superior De Investigaciones Cientificas,
Sevilla, ES**

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**MARTINEZ-FORCE, Enrique, E-41008 Sevilla, ES;
MUNOZ-RUZ, Juan, E-14010 Cordoba, ES;
FERNANDEZ-MARTINEZ, Maria, Jose, E-14012
Cordoba, ES; GARCES, Rafael, E-41907 Valencia
de la Concepción (Sevil, ES**

(54) Bezeichnung: **SONNENBLUMENPFLANZEN, -SAMEN UND -ÖLE MIT EINEM HOHEN GEHALT AN ÖLSÄURE
UND STEARINSÄURE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Sonnenblumensamen, die ein Öl mit einem hohen Oleinsäure- und hohem Stearinsäuregehalt enthalten. Die Erfindung betrifft auch Sonnenblumenpflanzen, die diese Samen herstellen, und das Öl, das in den Samen enthalten ist. Zusätzlich betrifft die Erfindung Verfahren zum Herstellen der Sonnenblumensamen, Sonnenblumenpflanzen und des Öls.

[0002] Die Anwendungen von Ölen werden durch ihre Fettsäurezusammensetzung bestimmt. Die Hauptkomponente von Ölen sind die Triacylglycerol (TAG)-Moleküle, die für gewöhnlich mehr als 95% des Öls ausmachen. Drei Fettsäuren sind an ein Glycerolmolekül gebunden, um das TAG zu bilden. Wenn diese Fettsäuren vor allem gesättigte Fettsäuren („Gesättigte“) sind, wird das Produkt Fett genannt und es ist bei Raumtemperatur fest. Wenn auf der anderen Seite die Fettsäuren vor allem ungesättigt sind, dann wird es Öl genannt, und es ist bei Raumtemperatur flüssig.

[0003] Die aus Samen erhaltenen Öle, die im gemäßigttem Klima kultiviert wurden (Sonnenblume, Sojabohne, Rapssamen, etc.), weisen vor allem ungesättigte Fettsäuren, wie Linol- und Oleinsäuren, auf, sie sind also flüssig und werden in erster Linie zum Kochen, als Salatdressing, etc. verwendet. Fette werden aus Tieren (Margarine, Schmalz, etc.), einigen tropischen Bäumen (Kakao, Palme) oder chemisch modifizierten (Hydrierung und Umesterung) flüssigen Pflanzenölen erhalten. Sie weisen vor allem gesättigte (Palmitin- oder Stearinsäuren) oder chemisch modifizierte Fettsäuren (trans-Fettsäuren), alle mit hohen Schmelzpunkten, auf.

[0004] Tabelle 1 zeigt als ein Beispiel die Fettsäurezusammensetzung und andere Eigenschaften einiger Fette und Öle. Die Fette werden für den Großteil der Lebensmittelindustrie benötigt, um Margarine, Backfett, Backwaren, Süßwaren, Snacks, etc. herzustellen. Die Lebensmittelindustrie verwendet das Fett für diese Zwecke aufgrund seiner plastischen Eigenschaften (sie schmelzen nicht, können verstrichen werden oder kleben nicht an der Hand) und der Stabilität (sie haben eine gute Widerstandskraft gegenüber einer Oxidation bei Raum- oder hohen Temperaturen).

Tabelle 1

Öl oder Fett	Fettsäurezusammensetzung						Eigenschaften	
	Andere ¹	Myristin- säure	Palmitin- säure	Stearin- säure	Olein- säure	Linol- säure	Trans	Gesättigt
Schmalz	3	2	25	12	45	10	1	79
Butter	14	10	26	12	28	3	3	84
Margarine			10	7	46	34	23	
Palmenöl		1	45	5	39	9		18
Olivenöl	1		14	3	71	10		2
Kakaobutter			26	35	35	3		4
normale Sonnenblume			7	5	30	57		1
oleinsäurereiche Sonnenblume			5	4	88	2		1

¹ "andere" sind Palmitoleinsäure im Falle von Schmalz, und Olivenöl und auch Fettsäuren mit weniger als 12 Kohlenstoffen in Butter

* hängt ab vom Hydrierungsniveau

[0005] Die gegenwärtig verfügbaren Fette sind jedoch keine gute Wahl, da sie negative Ernährungseigenschaften aufweisen. Das Hauptproblem ist, dass sie die schlechte Form des Serumcholesterols (Lipoproteine niedriger Dichte, LDL) anheben. Dies folgt aus mehreren Tatsachen, wobei einige mit dem Ursprung des Fetts und andere mit der Manipulation davon in Verbindung stehen. Tierische Fette haben die meisten der gesättigten Fettsäuren in der Position 2 des TAG-Moleküls. Die meisten Pflanzenfette und Öle haben jedoch nur geringe Mengen an gesättigten Fettsäuren in dieser Position und sind daher gesünder.

[0006] Während der Verdauung wird das TAG-Molekül durch Enzyme, die Lipasen ([Fig. 1](#)) genannt werden, hydrolysiert. Die Fettsäuren in den Positionen 1 und 3 werden als freie Fettsäuren freigesetzt. Wenn diese Fettsäuren gesättigt sind, bilden sie unlösliche Salze mit Kalzium und Magnesium, die meistens ausgeschieden werden. Aber Fettsäuren in Position 2 bilden mit dem Glycerol ein Molekül Monoacylglycerol, das detergente Eigenschaften hat und leicht vom Körper absorbiert wird. Die gesättigten Fettsäuren von Tierfetten werden dann absorbiert, was dann zu einem Anheben der LDL führt.

[0007] Um den Prozentsatz an gesättigten Fettsäuren zu erhöhen, werden Pflanzenöle hydriert und/oder umgeestert. Zum Beispiel wird die Hydrierung eines Canola-Öls in US 5,885,643 beschrieben. US 5,885,643 lehrt, dass die Hydrierung eines Canola-Öls eine Zunahme bei den trans-Fettsäuren, die wahrscheinlich sogar noch schlimmer sind als gesättigte Fettsäuren, wie von Willett, W.C. & Ascherio, A. (1994) Trans fatty acids: Are the effects only marginal? American Journal of Public Health 84:722-724 gezeigt wurde, zur Folge hat. Das Umesterungsverfahren verändert die Fettsäuren innerhalb der drei Positionen zufällig, was ein gesundes Pflanzenöl mit wenigen gesättigten Fettsäuren in der 2 Position in ein Öl umwandelt, das fast 30% an gesättigten Fettsäuren aufweist. Daher führt keine der zwei chemischen Modifikationen zu einem gesunden Produkt.

[0008] Jedoch sind nicht alle Fette ungesund. Es wurde gezeigt, dass Kakaobutter, die etwa 60% an gesättigten Fettsäuren aufweist, wobei der Rest hauptsächlich Oleinsäure ist, das Serumcholesterol nicht anhebt. Dies ist die Folge zweier hauptsächlich Gründe. Einer ist, dass nur 4% der gesättigten Fettsäuren in Position 2 stehen und der andere ist, dass die gesättigte Hauptfettsäure Stearinsäure ist. Die Stearinsäure hat keine negative Auswirkung auf das Serumcholesterol. Möglicherweise trägt die Menge von 35% Oleinsäure in der Kakaobutter ebenso zu ihrer gesunden Eigenschaft bei.

[0009] Es ist wichtig anzumerken, dass, ausgenommen in Kakaobutter, Palmitinsäure die gesättigte Hauptfettsäure der Gebrauchsfette ist. Palmitinsäure ist jedoch kein sehr gesundes Fett.

[0010] Die traditionelle Züchtung und die Mutagenese sind nicht die einzigen Mittel gewesen, die verwendet worden sind, um Samen zu bilden, die Öle mit unterschiedlichen Fettsäureprofilen hervorbringen. Man hat sich auch mit der Zunahme der Stearinsäure in öltragenden Pflanzen durch das Einführen von Transgenen in das Kernplasma zur Veränderung des Fettsäure-Biosyntheseweges des Pflanzenöls beschäftigt. Die Fettsäure-Biosynthese des Pflanzenöls, jedoch besonders des Sonnenblumenöls, schließt die Biosynthese von im Wesentlichen zwei Gesättigten (Palmitat, Stearat) und zwei Ungesättigten (Oleat und Linolat) ein. In Ölsamen ist die Stearoyl-ACP-Desaturase das Enzym, das die erste Doppelbindung im Stearoyl-ACP einbringt, um das Oleoyl-ACP zu bilden. Daher ist dies ein Enzym, das bei der Bestimmung der Nichtsättigung in den C18-Fettsäuren behilflich ist.

[0011] Im U.S. Patent Nr. 5,443,974 wurde die Hemmung der Canolaenzym-Stearoyl-ACP-Desaturase beschrieben. Die Stearatmengen wurden erhöht, aber die Mengen an Palmitat wurden im Grunde nicht beeinflusst. Über die Hemmung des Pflanzenenzym Stearoyl-ACP-Desaturase in Canola wurde ebenfalls in Knutzon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2624-28 (1992) berichtet. Diese Ergebnisse zeigten eine Zunahme der Stearatmenge, das im Canolasamen hergestellt wurde. Die Forschung zeigte auch, dass die Hemmung durch Antisense in Samen von Canola beziehungsweise der Sojabohne eine Erhöhung des Stearats erbrachte. Wenn ein Plasmid, das ein Gen enthält, das für die Stearoyl-ACP-Desaturase kodiert, in Canola eingebracht wurde, ergab diese Hemmung eine Erhöhung der Stearinsäure jedoch unglücklicherweise eine Verringerung beim Oleat. Jedoch führte in der Sojabohne diese Hemmung des Stearates zu einer weniger dramatischen Verringerung beim Oleat. Diese langsamere Verringerung beim Oleat könnte jedoch eine Funktion der anfänglichen geringeren Mengen an Oleat in der Sojabohne gewesen sein. Der Fettsäureweg in den meisten Ölsamen-Pflanzen scheint resistent gegen das Beibehalten erhöhter Mengen sowohl an Oleinsäure- als auch an Stearinsäure zu sein.

[0012] PCT/US 97/01419 beschreibt erhöhte Mengen sowohl an Stearinsäure als auch Palmitinsäure in Sonnenblumen durch die Hemmung des Pflanzenenzym Stearoyl-ACP-Desaturase. Wie weiter oben angedeutet, wird Palmitinsäureöl jedoch nicht als ein sehr gesundes Öl angesehen.

[0013] PCT/US 96/09486 offenbart, dass sowohl die Palmitinsäure- als auch die Oleinsäuremengen in Sonnenblumenöl erhöht sein können, wobei die Samen erhöhte Mengen an Palmitinsäure von 21-23% und an Oleinsäure von 61% aufweisen. Das Sonnenblumenöl ist bei Raumtemperatur flüssig. Die erhöhte Palmitinfettsäuremenge erlaubt es aber angeblich, dass das Öl in Backwaren und in Margarine mit relativ geringem Hydrierungsniveau verwendet werden kann, was zu einer relativ geringen Menge an trans-Fettsäuren in dem sich daraus ergebenden Produkt führt. Jedoch dürfte der kommerzielle Wert aufgrund der großen Menge an Pal-

mitinsäure in Frage gestellt werden.

[0014] Daher besteht weiterhin ein Bedarf für Sonnenblumenöl, das sowohl gesund als auch für industrielle Zwecke verwendbar ist. Darüber hinaus ist es wünschenswert ein Sonnenblumenöl zu besitzen, das eine Balance von guten Gesättigten und guten Ungesättigten aufweist, d.h. das reich an Ungesättigten ist, jedoch ausreichend Gesättigte aufweist, um für Margarinen oder Backwaren ohne hohe Hydrierungsniveaus verwendet zu werden, wodurch es zu keinen trans-Fettsäuren in dem sich daraus ergebendem Produkt kommt. Im Grunde besteht weiterhin ein Bedarf für eine Sonnenblumenpflanze, die einen Samen hervorbringen kann, der Öl enthält, das reich an Oleinsäure und an Stearinsäure mit verringerten Linolsäuremengen ist.

[0015] Es ist daher das Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Pflanzenöl mit hohem Stearinsäure- (als gesättigte Fettsäure) und hohem Oleinsäure- (als ungesättigte Fettsäure) Gehalt bereitzustellen, das die oben beschriebenen Probleme mit Fett verringert. In diesem Öl soll die Stearinsäure bevorzugt in den Positionen 1 und 3 des TAG liegen.

[0016] Die vorliegende Erfindung basiert auf den folgenden Überlegungen. Die Fettsäuresynthese in Samen findet innerhalb des Plastids statt ([Fig. 2](#)). Eine Serie von zyklischen Reaktionen katalysiert durch den enzymatischen Komplex FAS I erzeugt das Palmitoyl-ACP, das 16 Kohlenstoffatome hat. Ein zweiter enzymatischer Komplex, der FAS II genannt wird, verlängert das Palmitoyl-ACP zu dem Stearoyl-ACP (18 Kohlenstoffatome), das, um das Oleoyl-ACP zu erzeugen, weiter durch die Stearat-Desaturase modifiziert wird. Dies sind die drei vom Plastid synthetisierten Hauptfettsäuren, die vom ACP durch die Wirkung des Enzyms Thioesterase abgespalten werden und dann aus dem Plastid exportiert werden. Im Cytoplasma kann die Oleinsäure später zu Linol- und Linolensäuren desaturiert werden.

[0017] Das TAG (Lagerungsöl) wird im Cytoplasma mittels des Pools von Fettsäuren im Cytoplasma hergestellt. Dieser Pool von Fettsäuren besteht aus den Fettsäuren, die aus dem Plastid exportiert werden und der Linolsäure, die durch Desaturierung im Cytoplasma erzeugt wurde. Demnach wird die Fettsäurezusammensetzung der TAG durch die Fettsäuren bestimmt, die aus dem Plastid exportiert werden, plus der Linolsäure, die im Cytoplasma hergestellt wird.

[0018] Es wurde dann überlegt, dass eine neue Sonnenblumenpflanze, die reich an Stearin- und Oleinsäuren ist, ausgewählt werden könnte, wenn eine verringerte Stearat-Desaturase-Aktivität (was zu einer Abnahme bei der Menge des gebildeten Oleoyl-ACP und dadurch zu einer Zunahme beim Stearoyl-ACP führt) mit einer guten Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Stearoyl-ACP (was dazu führt, dass die Stearinsäure aus dem Plastid ins Cytoplasma transportiert wird) kombiniert wird. Diese Pflanze wird eine Ansammlung vom Stearoyl-ACP innerhalb des Plastids erzeugen, und die gute Aktivität der Thioesterase gegenüber dem Stearoyl-ACP sollte es sehr gut aus dem Plastid exportieren, wo ein hoher Stearinsäuregehalt vorliegt, der für die TAG-Biosynthese verfügbar ist.

[0019] Aus dem Plastid heraus, ist im Cytoplasma der hohe Oleinsäurecharakter notwendig, um den Linolsäuregehalt niedrig zu halten. In oleinsäurereichen Linien arbeitet der Umwandlungsweg nicht vernünftig, so dass dort keine Umwandlung von Oleinsäure zu Linolsäure stattfindet.

[0020] Die vorliegende Erfindung basiert daher auf dem Befund, dass durch Selektion einer Elternlinie, die einen hohen Stearin (HS)-Säuregehalt aufweist auf der einen Seite und einer zweiten Elternlinie, die eine hohe Oleinsäure- und hohe Thioesterase-(HOHT) Aktivität gegenüber dem Stearoyl-ACP aufweist auf der anderen Seite, Kreuzungen durchgeführt werden können, die Samen mit einer Kombination der Eigenschaften der Stearinsäurereichen und der Oleinsäurereichen (HSHO) ergeben. Zusätzlich wurde überraschenderweise herausgefunden, dass in dem Öl ein Maximum von 10 Gew.-% der Fettsäuregruppen in der sn-2-Position der TAG-Moleküle gesättigte Fettsäuregruppen sind.

[0021] Daher betrifft die vorliegende Erfindung Sonnenblumensamen, die ein Öl enthalten, das einen Oleinsäuregehalt von mehr als 40 Gew.-% und einen Stearinsäuregehalt von mehr als 12 Gew.-%, auf Basis des Gesamtfettsäuregehalt des Öls, umfasst und wobei ein Maximum von 10 Gew.-% der Fettsäuregruppen in der sn-2-Position der TAG-Moleküle, die das Öl ausmachen, gesättigte Fettsäuregruppen sind. Die gesättigten Fettsäuregruppen sind bevorzugt Stearinsäuregruppen. Es wird bevorzugt, dass das Öl in der sn-2-Position der TAG-Moleküle ein Maximum von 8%, noch bevorzugt ein Maximum von 5 Gew.-% an gesättigten Fettsäuregruppen, insbesondere Stearinsäuregruppen, aufweist. In Bezug auf die anderen Fettsäuren wird bevorzugt, dass der Oleinsäuregehalt bei 55 bis 75 Gew.-% liegt, der Stearinsäuregehalt bei 15 bis 50 Gew.-%, insbesondere bei 20 bis 40 Gew.-%, liegt und der Linolsäuregehalt bei weniger als 20 Gew.-% liegt. Bevorzugt liegt die

Gesamtmenge an gesättigten Fettsäuren bei mindestens 20 Gew.-%.

[0022] Die Auswahl der Eltern kann wie folgt erzielt werden. Linien mit hohem Stearinsäuregehalt sind Linien mit einem Stearinsäuregehalt von mehr als 12%, bevorzugt mehr als 20%. Ein Beispiel einer solchen stearinsäurereichen (HS) Elternlinie, die nach der Mutagenese ausgewählt worden ist und ein Stearinsäuregehalt von 26 Gew.-% hat, ist als „CAS-3“ verfügbar (ATCC Hinterlegungsnr. 75968, hinterlegt am 14. Dezember 1994). Ein anderes Beispiel ist „CAS-4“ mit einem Stearinsäuregehalt von 16,1 Gew.-% (ATCC Hinterlegungsnr. 75969, hinterlegt am 14. Dezember 1994). Durch Analysieren der Fettsäurezusammensetzung von Öl, das aus den Samen von anderen Kandidatenlinien abstammt, wird der Fachmann in der Lage sein, andere geeignete Elternlinien auszuwählen.

[0023] Man fand heraus, dass einige der herkömmlichen oleinsäurereichen Abwandlungen nicht für den Zweck der Erfindung verwendet werden konnten, da man herausfand, dass sie eine sehr niedrige Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Stearoyl-ACP aufwiesen. Um dies durch Messen der Thioesterase-Aktivität zu überwinden, können Linien mit guter Aktivität gegenüber dem Stearoyl-ACP aus den zugänglichen Sammlungen der oleinsäurereichen Linien ausgewählt werden.

[0024] Kurz um, man würde zuerst die Fettsäurezusammensetzung des Öls verschiedener viel versprechender Linien analysieren. Eine geeignete HOHT-Elternlinie würde mehr als 7-8% Stearinsäure und entweder weniger als 5% Linolsäure oder mehr als 75% Oleinsäure aufweisen. Anschließend müssen die ausgewählten Linien wachsen und selbstbestäubt werden. Die Gesamtthioesterase-Aktivität wird in Samen 15 Tage nach dem Aufblühen (15DAF) sowohl am Oleoyl-ACP als auch am Stearoyl-ACP gemessen. In geeigneten Linien sollte die Aktivität gegenüber dem Stearoyl-ACP mehr als 10% der Aktivität gegenüber dem Oleoyl-ACP betragen. Das Verhältnis zwischen beiden Aktivitäten bestimmt, ob eine Linie als Elternlinie geeignet ist oder nicht.

[0025] In Tabelle 2 wird die Fettsäurezusammensetzung und Thioesterase-Aktivität von zwei oleinsäurereichen Sonnenblumenlinien dargestellt.

Tabelle 2

Stearinsäuregehalt und Thioesterase-Vmax gegenüber dem Stearoyl-ACP 15 Tage nach dem Aufblühen von Samen auf zwei oleinsäurereichen Sonnenblumenlinien.

Sonnenblumenlinie	Stearinsäure (%)	Thioesterase-Aktivität Vmax
HOHT	17,8	2,03
HOLT	8,0	0,82

[0026] Die HOHT-Linie ist eine oleinsäurereiche Linie mit einer Thioesterase- gegenüber einer Stearoyl-ACP-Aktivität (HOHT) von mehr als dem Zweifachen von dem der Thioesterase-Vmax gegenüber dem Stearoyl-ACP bei einer gewöhnlichen oleinsäurereichen Linie (HOLT). Die relative Aktivität der Enzyme gegenüber dem Stearoyl-ACP, die in Bezug auf die eine gegenüber dem Oleoyl-ACP standardisiert wurde, wird in [Fig. 3](#) dargestellt. Diese Linie weist konsequenterweise am 15 Tag nach dem Aufblühen (Tabelle 2) mehr Stearinsäure auf und dies ebenso im Öl, das aus den gereiften Samen (Tabelle 3) erhalten wurde.

Tabelle 3

Fettsäurezusammensetzung (%) von Samen aus zwei oleinsäurereichen Sonnenblumenlinien.

Sonnenblumenlinie	Fettsäurezusammensetzung (%)					
	Palmitinsäure	Stearinsäure	Oleinsäure	Linolensäure	Arachinsäure	Behensäure
HOHT	4,3	9,7	78,5	3,9	1,0	2,6
HOLT	3,8	4,9	84,3	4,8	0,5	1,7

[0027] Diese HOHT-Elternlinie wurde am 7. September 1999 bei der American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, Va 20110-2209) hinterlegt und mit der Nummer PTA-628 ausgewiesen.

[0028] Linien von beiden Typen (HOHT und HOLT) wurde mit der stearinsäurereichen CAS-3-Linie gekreuzt. In den [Fig. 4](#) (für HOHT) und 5 (für HOLT) wird die F2-Segregation für beide Merkmale (hoher Stearinsäuregehalt und hoher Oleinsäuregehalt) gezeigt. Die Samen mit einem höheren Gehalt an Stearin- und Oleinsäuren liegen innerhalb eines Kreises. Aus den Figuren ergibt sich, dass die HOHT-Linie mit einer hohen Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Stearoyl-ACP oleinsäurereiche, stearinsäurereiche Samen aufweist, und die Linie ohne eine hohe Thioesterase-Aktivität keine Samen dieses Typs aufweist. Tabelle 4 zeigt die Fettsäurezusammensetzung dieser Linien.

Tabelle 4 Fettsäurezusammensetzung von ausgewählten oleinsäurereichen und stearinsäurereichen Linien mit hoher und niedriger Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Stearoyl-ACP nach der Kreuzung mit der HS-Linie CAS-3

Sonnenblumenlinie	Fettsäurezusammensetzung (%)					
	Palmitinsäure	Stearinsäure	Oleinsäure	Linolensäure	Arachinsäure	Behensäure
HOHT x CAS-3	5,2	24,6	59,2	6,8	1,8	2,4
HOLT x CAS-3	4,3	17,4	72,1	4,0	1,3	2,8

[0029] Die ausgewählten F2-Linien werden für 5 bis 6 Generationen unter isolierten Bedingungen geselbstet, um Kontaminationen zu verhindern. Die sich daraus ergebenden Generationen werden auf Basis des hohen Oleinsäure- und Stearinsäuregehaltes ausgewählt. Die Thioesterase-Aktivität kann analysiert werden, um beim Auswahlverfahren zu helfen. Auf ähnliche Weise kann ein durch Marker unterstütztes Züchten angewendet werden, um irgendein oder alle der drei Merkmale aufzufinden, um das Auswahlverfahren schneller zu machen. Verschiedene Marker, wie zum Beispiel der SSR-Mikrosatellit, ASO, RFLP und ähnliche, können angewendet werden. Die Verwendung von Markern ist nicht notwendig, da Standardtests zum Bestimmen der Oleinsäure, der Stearinsäure und der Thioesterase-Aktivität bekannt sind. Jedoch machen einmal identifizierte Marker das Auffinden von Merkmalen einfacher und sie werden früher im Leben der Sonnenblumenpflanze aufgefunden.

[0030] Die reinrassigen Sonnenblumenzüchtungspflanzen erzeugen ein Öl mit einer ähnlichen Fettsäurezusammensetzung wie die F2-Samen, die mit einem niedrigen Gehalt an gesättigter Fettsäure in der 2 Position des TAG-Moleküls (Tabelle 5) ausgewählt werden.

Tabelle 5

Fettsäurezusammensetzung von Öl, TAG und sn-Positionen von ausgewählten reinrassigen Züchtungs-HS-HO-Pflanzen. n.d. = nicht detektiert.

	Fettsäurezusammensetzung (mol%)					
	Palmitin- säure	Stearin- säure	Olein- säure	Linol- säure	Arachin- säure	Behen- säure
Gesamtöl	5,5	24,9	57,8	8,2	1,7	1,8
TAG	5,6	26,1	57,6	7,4	1,6	1,7
sn-2- Position	1,7	1,9	87,4	9,0	n.d.	n.d.
sn-1 und 3-Posi- tion	7,2	33,1	46,8	7,3	2,7	2,9

[0031] Die Erfindung betrifft auch Sonnenblumenpflanzen, die Samen ausbilden, die das oben beschriebene Öl der Erfindung und das Öl an sich enthalten, als auch Produkte, die aus den Samen erhalten werden, wie zum Beispiel Mehl und zerkleinerte Samen.

[0032] Die Sonnenblumenpflanzen und Sonnenblumensamen der Erfindung sind durch ein Verfahren erhältlich, das umfasst:

a) Bereitstellen von Samen, die ein Öl mit einem Stearinsäuregehalt von mindestens 12 Gew.-%, auf Basis des Gesamtfettsäuregehaltes des Öls, aufweisen, durch:

i) mutagenische Behandlung von Sonnenblumensamen mit einem Stearinsäuregehalt von weniger als 12%;

ii) Hervorbringen von Sonnenblumenpflanzen daraus, die bestäubt worden sind, um Samen hervorzubringen;

iii) Testen der Samen auf den gewünschten Stearinsäuregehalt; und

iv) wahlweise Wiederholen der Schritte b) und c);

b) Bereitstellen von Samen, die ein Öl mit einem Oleinsäuregehalt von mindestens 40 Gew.-%, auf Basis des Gesamtfettsäuregehaltes des Öls, aufweisen und die eine Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Stearoyl-ACP aufweisen, die mindestens 10% der Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Oleoyl-ACP entspricht;

c) Kreuzen von Pflanzen, die aus den in Schritt (a) und (b) bereitgestellten Samen, herangezogen wurden;

d) Ernten der F1-Samen Nachkommenschaft.

Bevorzugt umfasst das Verfahren weiterhin die Schritte:

e) Pflanzen der Samen der F1-Nachkommenschaft, um Sonnenblumenpflanzen heranzuziehen;

f) Selbstbestäuben der dadurch herangezogenen Sonnenblumenpflanzen, um F2-Samen hervorzubringen;

g) Testen der Samen auf das Vorhandensein eines Stearinsäuregehalts im Öl von mindestens 12 Gew.-%, und einem Oleinsäuregehalt von mindestens 40 Gew.-% und einer Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Stearoyl-ACP, die bei mindestens 10% der Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Oleoyl-ACP liegt;

h) Pflanzen der Sonnenblumensamen mit den gewünschten Niveaus beim Stearinsäuregehalt, Oleinsäuregehalt und der Thioesterase-Aktivität, um Sonnenblumenpflanzen heranzuziehen;

i) Selbstbestäuben der daraus herangezogenen Pflanzen, um F3-Samen hervorzubringen; und

j) wahlweise Wiederholen der Schritte g), h) und i) bis die gewünschten Niveaus beim Stearinsäuregehalt, Oleinsäuregehalt und der Thioesterase-Aktivität gefestigt sind.

[0033] Wünschenswerterweise liegt der Stearinsäuregehalt bei mindestens 15 Gew.-%, bevorzugter bei mindestens 20 Gew.-%.

[0034] Das Sonnenblumenöl der vorliegenden Erfindung mit einem Oleinsäuregehalt von mehr als 40 Gew.-% und einem Stearinsäuregehalt von mehr als 12 Gew.-%, auf Basis des Gesamtfettsäuregehaltes des

Öls, kann durch Extrahieren von Öl aus den Samen erhalten werden. Das Verfahren schließt bevorzugt ein Extraktionsverfahren ein, das keine wesentliche Modifikation des (Sonnenblumen)-Öls einschließt.

[0035] Zusätzlich gibt es beim Extraktionsverfahren des Öls aus den Samen bevorzugt weder eine wesentliche chemische oder eine physikalische Modifikation noch findet eine enzymatische Neuordnung statt und bevorzugt auch kein wesentliches Aushärten des Öls.

[0036] Das Öl gemäß der Erfindung ist besonders geeignet, um in Nahrungsmittel verwendet zu werden. Nahrungsmittel, die für diesen Öltyp insbesondere verwendbar sind, schließen Brotaufstriche, Margarinen, Backfette, Soßen, Eiscreme, Suppen, Backwaren, Süßwaren und ähnliches ein. In diesen Nahrungsmitteln liegt die Menge an Sonnenblumenöl bevorzugt bei 3 bis 100 Gew.-% relativ zum Gesamtölgewicht im Produkt. Wenn es gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet wird, um einen Brotaufstrich zu bilden, wird das Sonnenblumenöl bevorzugt als fester Rohstoff in Mengen von 5 bis 20 Gew.-% verwendet.

[0037] Die Sonnenblumensamen der vorliegenden Erfindung sind an sich auch für den menschlichen und tierischen Verbrauch geeignet.

[0038] Das Öl der Erfindung mit einem Oleinsäuregehalt von mehr als 40 Gew.-% und einem Stearinsäuregehalt von mehr als 12 Gew.-%, auf Basis des Gesamtfettsäuregehaltes des Öls, eignet sich auch, um in kosmetischen Produkten verwendet zu werden. Diese kosmetischen Produkte können bevorzugt Sonnenblumenölmengen von 3 bis 100 Gew.-% enthalten. Einige Beispiele dieser Kosmetikprodukte schließen Cremes, Lotionen, Lippenstifte, Seifenstücke und Haut- oder Haaröle ein.

[0039] Helianthus annuus-Pflanzen, die Samen mit dem gewünschten Öl hervorbringen können, können durch ein Verfahren ausgewählt werden, dass a) das Auswählen einer Anzahl von Helianthus annuus-Pflanzen, das Sammeln ihrer Samen, wobei ihr Öl einen Stearinsäuregehalt von mindestens 12 Gew.-% und bevorzugt 18 Gew.-%, auf Basis des Gesamtfettsäuregehaltes, aufweist; b) das Auswählen einer Anzahl von Helianthus annuus-Pflanzen, das Sammeln der Samen davon, die einen Oleinsäuregehalt von mindestens 40 Gew.-%, auf Basis des im Samen vorhandene Öles, und eine Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Stearoyl-ACP, die mindestens 10% der Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Oleoyl-ACP entspricht, exprimieren; c) das Kreuzen der aus den Samen von (a) und (b) herangezogenen Pflanzen; und das Ernten der F1-Samen-nachkommenschaft umfasst.

[0040] Zusätzliche Schritte schließen die Schritte ein: (d) Pflanzen der Samen oder Keimrettung (engl. embryo rescue) der Keime der F1-Nachkommenschaft, die erhalten wurden, um F2-aufgespaltene Samen zu bilden; (e) Auswählen solcher Pflanzen aus den F2-Samen, die Pflanzen entwickelten, die Samen mit einem Oleinsäuregehalt von mehr als 40 Gew.-% und einem Stearinsäuregehalt von mehr als 12 Gew.-%, auf Basis des Gesamtfettsäuregehaltes des Öls, hervorbringen, wahlweise verselbsten der ausgewählten Pflanzen, um reinrassige Inzuchtungen zu bilden.

[0041] F1-Hybridsamen können durch ein Verfahren erhalten werden, dass a) das Pflanzen von Samen aus zwei Inzuchten mit hohem Oleinsäuregehalt von mindestens 40 Gew.-% und einer Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Stearoyl-ACP, die mindestens 10% der Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Oleoyl-ACP beträgt, wobei eine von ihnen pollensteril sein kann, b) das Kreuzen der zwei Inzuchtungen und c) das Ernten der F1-Samen, die einen F2-Samen mit einem mindestens 40 Gew.-% Oleinsäuregehalt und einem mindestens 12 Gew.-% Stearinsäuregehalt hervorbringen können, umfasst.

[0042] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Pflanzenöl mit einer neuen und einzigartigen Fettsäurezusammensetzung, das in einfach heranzuziehenden anbaubaren Sonnenblumenpflanzen erzeugt wird. Jedoch können andere anbaubare Pflanzen mindestens Brassicaceen, Erdnüsse, Palmen und andere Öl erzeugende Pflanzen einschließen. Wenn die Mutation ausgenutzt wird, um einen oder beide der Eltern herzustellen, sollte die Pflanze für mutagenisch induzierte Veränderungen im Öl empfänglich sein. Die Rapssaat erfüllt, wie auch die Sonnenblume, all diese Anforderungen, diese Anbaupflanzen sind derzeit einige der am besten verwendbaren Anbaupflanzen für die Erzeugung dieser neuen und einzigartigen Fettsäurezusammensetzung im Öl ihrer Samen.

[0043] In dieser Anmeldung wird auf die folgenden Figuren Bezug genommen:

[0044] [Fig. 1](#): Hydrolyse von Triacylglycerolen durch Lipase;

[0045] [Fig. 2](#): Plastid, das die Fettsäurebiosynthese in Ölsamen zeigt;

[0046] [Fig. 3](#): Gesteigerte Thioesterase-Aktivität dargestellt als relative Aktivität der Thioesterase gegenüber dem Stearoyl-ACP und dem Oleoyl-ACP von HOHT und HOLT;

[0047] [Fig. 4](#): Die F2-Segregation für Stearin- und Oleinsäuren aus der Kreuzung zwischen einer oleinsäurereichen mit hoher Thioesterase-Aktivität gegenüber einer Stearoyl-ACP-Linie (HOHT) und einer stearinsäurereichen Linie (CAS-3);

[0048] [Fig. 5](#): Die F2-Segregation für Stearin- und Oleinsäuren aus der Kreuzung zwischen einer oleinsäurereichen mit niedriger Thioesterase-Aktivität gegenüber einer Stearoyl-ACP-Linie (HOLT) und einer stearinsäurereichen Linie (CAS-3).

Definitionen

„SONNENBLUME“ soll Helianthus annuus bedeuten.

„PFLANZE“ soll die gesamte Pflanze und alle Pflanzen und Zellteile, einschließlich Pollen, Kern, Öl, Keim, Stängel, Kopf, Wurzeln, Zellen, Meristeme, Ovarium, Antheren, Mikrosporen, Embryonen, DNA, RNA, Blütenblätter, Samen und ähnliches, und Protoplasten, Callus oder Suspensionen von irgendetwas des oben genannten, einschließen.

„15DAF“ soll 15 Tagen nach dem Aufblühen bedeuten.

„GESAMTFETTSÄUREGEHALT“ des Sonnenblumenöls bezieht sich auf die Summe an C16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 20:0, 22:0 und die Spuren von anderen ähnlichen Fettsäuren, die gleichzeitig im Öl des Samens bestimmt werden.

„HOLT“ soll bedeuten, dass im Vergleich zum normalen Wildtyp-Sonnenblumensamen (Oleinsäuremengen von 17%-20%) hohe bis mittelhohe (40%-90%) Oleinsäuremengen im Öl vorliegen, wobei dabei „NIEDRIGE THIOESTERASE-AKTIVITÄTSNIVEAUS“ vorliegen. Eine „HOLT-LINIE“ ist eine Linie, insbesondere eine Sonnenblumenlinie, mit dem HOLT-Merkmal.

„HOHT“ soll bedeuten, dass im Vergleich zu normalen Wildtyp-Sonnenblumenöl (Oleinsäuremengen von 17%-20%) hohe bis mittelhohe (40%-90%) Oleinsäuremengen im Öl vorliegen, wobei dabei „HOHE THIOESTERASE-AKTIVITÄTSNIVEAUS“ vorliegen. Eine „HOHT-LINIE“ ist eine Linie, insbesondere eine Sonnenblumenlinie, mit dem HOHT-Merkmal.

„HOHE THIOESTERASE-AKTIVITÄTSNIVEAUS“ soll Thioesterase-Aktivitätsniveaus (15DAF) gegenüber dem Stearoyl-ACP bedeuten, die mindestens 10% der Thioesterase-Aktivität gegenüber dem Oleoyl-ACP ausmachen. Demzufolge sollen „NIEDRIGE THIOESTERASE-AKTIVITÄTSNIVEAUS“ Niveaus bedeuten, die unter den „HOHEN THIOESTERASE-AKTIVITÄTSNIVEAUS“ liegen.

In „HS“ soll bedeuten, dass Stearinsäuremengen im Öl von mindestens 12 Gew.-%, und bevorzugt mindestens 15 Gew.-%, oder noch bevorzugter mindestens 18 Gew.-% oder sogar mindestens 20 Gew.-%, auf Basis des Gesamtfettsäuregehaltes, vorliegen. „STEARINSÄUREREICHE LINE“ oder „HS-LINIE“ bedeutet eine Linie, insbesondere eine Sonnenblumenlinie, mit dem HS-Merkmal.

„HOHS“ soll bedeuten, dass Mengen von über 40% Oleinsäure und mindestens 12 Gew.-% Stearinsäure im Öl vorliegen und das bevorzugt Mengen von mindestens 15 Gew.-%, noch bevorzugter mindestens 18 Gew.-% oder sogar mindestens 20 Gew.-% Stearinsäure im Öl vorliegen. Eine „HOHS-LINIE“ bedeutet eine Linie mit dem HOHS-Merkmal.

BEISPIELE EINFÜHRUNG Herstellung von HS-Eltern

[0049] Um die HS-Eltern zu erhalten, kann ein Verfahren zum Herstellen von Sonnenblumensamen mit einem erhöhten Stearinsäure- und Oleinsäuregehalt im Vergleich zu Wildtypsamen verwendet werden. Dieses Verfahren schließt den Schritt des Behandelns von Elternsamen mit einem mutagenen Agens während eines Zeitraums und in einer Konzentration ein, die ausreichend ist, um eine oder mehrere Mutationen im genetischen Merkmal, das bei der Stearinsäure- oder Oleinsäure-Biosynthese beteiligt ist, zu induzieren. Dies führt zu einer erhöhten Produktion von Stearinsäure- und/oder einer erhöhten Menge an Oleinsäure. Diese mutagenen Agenzien schließen Agenzien, wie zum Beispiel Natriumazid oder ein alkylierendes Agens, wie Ethylmethansulfonat, ein, selbstverständlich kann irgendein anderes mutagenes Agens mit gleichen oder ähnlichen Wirkungen ebenfalls verwendet werden. Die behandelten Samen werden vererbare genetische Veränderungen enthalten. Diese mutierten Samen werden dann zum Keimen gebracht und Pflanzennachkommen werden daraus entwickelt. Um die Merkmale in den Linien zu erhöhen, kann die Nachkommenschaft gekreuzt oder geselbstet werden. Die Samen der Nachkommenschaft werden gesammelt und analysiert.

[0050] Natriumazid und Ethylmethansulfonat wurden als mutagene Agenzien in Beispiel 1 verwendet. Mehrere Sonnenblumenlinien mit einem Stearinsäuregehalt zwischen 12 und 45% sind erhalten wurden. In all diesen Fällen war die ursprüngliche Sonnenblumenelternlinie, die für die Produktion der stearinsäurereichen Linien verwendet wurde, RDF-1-532 (Sonnenblumensammlung des Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Cordoba, Spanien), die einen Stearinsäuregehalt von 4 bis 7% im Samenöl aufweist.

Auswählen der HOHT-Eltern

[0051] Im Prinzip ist es ausreichend, Oleinsäure-Linien auf einen HOHT-Phenotyp zu screenen und diese Linie entweder für die Transformation oder für die Kreuzung mit einer stearinsäurereichen Linie zu verwenden, um eine HOHS-Linie zu entwickeln. Eine geeignete Linie ist zumindest die HOHT-Elternlinie, die am 7. September 1999 bei der American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, Va 20110-2209) hinterlegt wurde und mit der Nummer PTA-628 ausgewiesen wurde.

Herstellen der HOHS-Linie

[0052] Samen mit dem HOHT-Merkmal oder dem Stearinsäure-Merkmal können dann miteinander gekreuzt werden, um die HOHS-Linie zu bilden. Gegebenenfalls kann es zusätzliche Zyklen der Keimung, Kultivierung und des Selbstens geben, um die Homozygotie der Merkmale in den Linien zu festigen, und der Kreuzung und des Sammelns von Samen.

MATERIALIEN UND VERFAHREN

Pflanzenwachstumsbedingungen

[0053] Sonnenblumensamen (*Helianthus annuus* L.) aus oleinsäurereichen Linien mit verändertem Fettsäuregehalt im Samen wurden verwendet, um die Thioesterase-Aktivitäten gegenüber dem Stearoyl-ACP zu testen. Die Pflanzen wurden in Wachstumskammern bei einer Temperatur von 25/15°C (Tag/Nacht), einem Licht-Dunkel-Zyklus von 16 Stunden und einer Photonenflussdichte von 300 Mikromol m⁻²s⁻¹ kultiviert.

[0054] Die Samen für die Analysen wurden am 15. Tag nach dem Aufblühen geerntet und bei -20°C gelagert.

Radioaktive Reagenzien und Herstellung der Acyl-ACPs

[0055] 1-¹⁴C-Oleinsäure mit einer spezifischen Radioaktivität von 2, 1 GBq/mmol und [9,10 (n)-³H]-Stearinsäure mit einer spezifischen Radioaktivität von 1,9 GBq/mmol wurden von der American Radiolabeled Chemicals Inc. (St.Louis, Mo., USA) erhalten. Um das Fettsäurenatriumsalz herzustellen, wurde ein geeignetes Volumen an Fettsäurelösung in ein Glasröhrchen übertragen, das Lösungsmittel wurde unter einem Stickstofffluss entfernt und der Rückstand wurde in 10% Triton X-100, 0,6 mM NaOH aufgenommen. Diese Lösung wurde für eine Stunde bei 55°C erhitzt, um die Homogenität sicherzustellen.

[0056] Die Acyl-ACPs wurden mittels einer Modifikation des enzymatischen Syntheseverfahrens von Rock C.O. et al. (1981) *Method Enzymology* 72:397-403 hergestellt. Die Assays enthielten 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,4 M LiCl, 5 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 130 microM Fettsäurenatriumsalz, 0,27 mM ACP-SH und 1,8 mU Acyl-ACP-Synthetase (die letzten beiden Bestandteile wurden bei Sigma-Aldrich Quimica S.A. Madrid, Spanien, bezogen) in einem Endvolumen von 110 Mikrolitern. Die Reaktionsansätze wurden für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der pH durch Zugabe von 1 Mikroliter an 3,6 M HCl auf 6,0 angesäuert, und die Mischung wurde mittels einer Modifikation des Verfahrens, das von Mancha M. et al. ((1975) *Anal. Biochem.* 68:600-608) beschrieben wurde, von freien Fettsäuren gereinigt, wobei das Verfahren aus dem Zugeben eines gleichgroßen Volumens an Isopropanol und dreimaligem Waschen mit Hexan, das in Wasser/Isopropanol (1:1; v/v) abgesättigt wurde, besteht.

Herstellung von Rohextrakten für Enzym-Assays und die Proteinbestimmung

[0057] Gefrorene Samen wurden geschält und in einem Extraktionspuffer, der 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 2 mM DTT und 5% (v/v) Glycerol enthält (Dörmann P. et al. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1212:134-136), bei 1 g an Gewebe/10 ml Puffer, zermahlen. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels eines Protein-Assay-Kits (Bio-Rad) entsprechend den Empfehlungen der Hersteller mit BSA als Standard gemessen.

Enzym-Assays

[0058] Die Acyl-ACP-Thioesterase-Aktivität wurde in einem Endvolumen von 170 Mikrolitern unter Verwendung von 130 Mikrolitern Rohextrakt untersucht. In Kontroll-Assays wurde das Rohextrakt weggelassen. Die Reaktionsmischungen enthielten 20 mM Tris-HCl (pH 8,5), 5% Glycerol und 2 mM Dithiothreitol (DTT) und unterschiedliche Konzentrationen an Substraten (Stearoyl-ACP und Oleoyl-ACP). Die Inkubationen wurden bei 25°C für 20 Minuten durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 170 Mikrolitern an 1M Essigsäure in Isopropanol, das 1 mM Oleinsäure enthielt, gestoppt. Die Mischungen wurden dann dreimal mit Hexan, das in Wasser/Isopropanol (1:1, v/v) abgesättigt wurde, gewaschen.

[0059] Die Acyl-ACP-Thioesterase-Aktivität wurde durch Messen der Radioaktivität der wässrigen Phase, die die nicht hydrolysierten Substrate enthielt, bestimmt. Dann wurden 3 mm flüssiger Szintillationssubstanz (bezogen bei National Diagnostics, Hesse, England) zugegeben und die Radioaktivität wurde mittels eines Szintillationszählers (Rackbeta II; LKB, Schweden) gemessen. Die Daten der Acyl-ACP-Thioesterase-Assays wurden der Michaelis-Menten-Gleichung durch nichtlineare kleinste-Quadrate-Regressionsanalyse unter Verwendung von Microcal Origin 4.1 angepasst und auf $P < 0,05$ korreliert, wie durch den angepassten Studententest bestimmt wurde. V_{max} und K_m wurden aus diesen Kurven abgeleitet.

BEISPIEL 1

Herstellung einer HS-Linie

1. Mutation mit EMS

[0060] Die Samen wurden mit einer Lösung aus 70 mM Ethylmethansulfonat (EMS) in Wasser mutagenisiert. Die Behandlung wurde bei Raumtemperatur für 2 Stunden unter Schütteln (60 rpm) durchgeführt. Nach der Mutagenese wurde die EMS-Lösung verworfen und die Samen wurden für 16 Stunden unter Leitungswasser gewaschen.

[0061] Die behandelten Samen wurden im Feld zum Keimen gebracht, und die Pflanzen wurden selbstbestäubt. Die von diesen Pflanzen gesammelten Samen wurden verwendet, um neue Sonnenblumen-Linien mit Modifikationen in der Fettsäurezusammensetzung auszuwählen. Durch Verwendung des Verfahrens von Garcés, R. und Mancha M. ((1993) Anal. Biochem. 211, 139-143) wurde die Fettsäurezusammensetzung im Samen durch eine Gas-Flüssigkeits-Chromatographie bestimmt, nachdem die Fettsäuren in ihre entsprechenden Methylester umgewandelt wurden.

[0062] Eine erste Pflanze mit einem Stearinsäuregehalt im Öl von 9 bis 17% wurde ausgewählt. Die Nachkommen wurden für fünf Generationen, in denen der Stearinsäuregehalt zunahm und das neue genetische Merkmal im genetischen Material des Samens stabil gefestigt wurde, kultiviert. Diese Linie wird CAS-3 genannt. Der minimale und der maximale Stearinsäuregehalt der Linie lag bei 19 beziehungsweise 35%. Der Stearinsäuregehalt von Öl, das aus Samen aus dieser Zelllinie extrahiert wurde, dürfte daher zwischen 19 und 35% liegen.

2. Mutation mit Natriumazid

[0063] Sonnenblumensamen wurden mit Natriumazid bei einer Konzentration von 2 mM in Wasser mutagenisiert. Die Behandlung wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden unter Schütteln (60 rpm) durchgeführt. Dann wurde die Mutageneselösung verworfen und die Samen wurden für 16 Stunden mit Leitungswasser gewaschen.

[0064] Die Samen wurden im Feld ausgepflanzt und die Pflanzen wurden selbstbestäubt. Die Samen aus diesen Pflanzen wurden gesammelt, und die Fettsäurezusammensetzung wurde durch Gas-Flüssigkeits-Chromatographie bestimmt, nachdem die Fettsäuren unter Verwendung des in Beispiel 1 beschriebenen Verfahrens in ihre entsprechenden Methylester konvertiert wurden.

[0065] Die Samen aus einer Pflanze mit etwa 10% Stearinsäure im Öl wurden ausgewählt und für fünf Generationen kultiviert. Während dieses Verfahrens wurde der Stearinsäuregehalt erhöht und das neue genetische Merkmal gefestigt. Diese Linie wird CAS-4 genannt. Eine ausgewählte Probe dieser Linie wurde analysiert, was einen Stearinsäuregehalt von 16,1% ergab. Die minimalen und die maximalen Werte lagen bei 12 beziehungsweise bei 19%.

Tabelle 6

Prozentsatz an Fettsäure

Linie	Palmitinsäure	Stearinsäure	Oleinsäure	Linolsäure
CAS-3	5,1	26,0	13,8	55,1
CAS-4	5,5	16,1	24,3	54,1

[0066] CAS-3 und CAS-4 sind bei der American Type Culture Collection mit den ATCC-Nummern 75968 beziehungsweise 75969 hinterlegt.

BEISPIEL 2

Herstellung einer HSHO-Linie

1. Allgemeines

[0067] Sonnenblumenpflanzen wurden aus den Sonnenblumensamen der HOHT-Linie, Samen davon sind unter ATCC (PTA-628) hinterlegt, herangezogen. Sonnenblumenpflanzen wurden auch aus den Sonnenblumensamen von CAS-3 herangezogen. Die Linien wurden gekreuzt. Den Pflanzen wurde durch künstliche Bestäubung geholfen, um das Auftreten einer angemessenen Samenherstellung sicherzustellen. Der F1-Samen wurde aus der HOHT-Linie oder umgekehrt erzeugt und geerntet. Die F2-Samen mit mehr als 20% Stearat und mehr als 40% Oleat wurden ausgewählt. Obwohl dies das Öl der vorliegenden Erfindung erzeugt, ist die Produktionsmenge begrenzt.

[0068] Deshalb sind gefestigte Inzuchtlinien, die Belege für Samen mit diesem Ölprofil darstellen, wünschenswert. Diese homozygoten gefestigten Inzucht-HSHO-Linien können dann gekreuzt werden, um Hybrid-samen zu bilden, die F2-Samen hervorbringen werden, die die gewünschten Ölmerkmale der vorliegenden Erfindung belegen.

[0069] Gegen Ende wurden die F1-Samen ausgepflanzt und die erzeugten Pflanzen wurden unter isolierten Bedingungen geselbstet und der F2-Samen wurde hergestellt. Der F2-Samen wurde auf die drei Merkmale, hohe Stearinsäure-, hohe Oleinsäuremengen und hohe Thioesterase-Aktivitätsniveaus getestet. Der verbleibende Teil der Samen, die Belege für diese Merkmale darstellen, wurde verwendet, um Pflanzen heranzuziehen, um F3-Samen zu bilden. Das Selbstungs-, und Untersuchungs- und Auswahlverfahren wird wiederholt, um die gefestigte homozygote HSHO-Linie mit dem folgenden Fettsäureprofil C:16 5,4, C:18.0 24,8, C:18.1 58,5, C:18.2 7,2 zu entwickeln. Sobald das Merkmal gefestigt ist, können ähnliche HSHO-Linien gekreuzt werden, um Hybridsamen mit beiden Merkmalen zu bilden.

[0070] Gemäß der Erfindung wurden Sonnenblumenpflanzen und -Samen, aus denen das Öl extrahiert werden kann, mittels eines biotechnologischen Verfahrens erhalten. Dieser hohe Stearinsäuregehalt ist ein vererbbares Merkmal und ist ganz unabhängig von den Wachstumsbedingungen.

2. Erste Kreuzung

[0071] Eine Sonnenblumenpflanze wurde aus einem Sonnenblumensamen einer HOHT-Linie mit einem Stearinsäuregehalt 10,7 Gew.-% und einem Oleinsäuregehalt von 74,6 Gew.-% herangezogen. Eine Sonnenblumenpflanze wurde auch aus einem CAS-3 Sonnenblumensamen herangezogen. Die Pflanzen wurden gekreuzt. Den Pflanzen wurde durch künstliche Bestäubung geholfen, um das Auftreten einer angemessenen Samenherstellung sicherzustellen. Der F1-Samen wurde aus der HOHT-Linie oder umgekehrt erzeugt und geerntet.

[0072] Ein F1-Samen mit einem Stearinsäuregehalt von 9,8 Gew.-% und einem Oleinsäuregehalt von 80,7 Gew.-% wurde ausgewählt. Dieser F1-Samen wurde ausgepflanzt und erzeugte eine Pflanze, die unter isolierten Bedingungen geselbstet wurde und F2-Samen wurden erzeugt. Diese F2-Samen wurden auf ihre Olein- und Stearinsäuregehalte getestet. Ein Samen, der 23,6 Gew.-% Stearinsäure und 65,5 Gew.-% Oleinsäure enthält, wurde ausgewählt.

[0073] Dieser F2-Samen wurde ausgepflanzt und erzeugte eine Pflanze, die unter isolierten Bedingungen geselbstet wurde und am 15DAF wurden verschiedene Samen gesammelt und auf ihre Stearoyl-ACP-Thioesterase-Aktivität analysiert. Pflanzen mit Samen, die mehr als 10% Stearoyl-ACP-Thioesterase in Bezug auf die Oleoyl-ACP-Thioesterase-Aktivität der gleichen Pflanze erbrachten, wurden ausgewählt.

[0074] Ausgereifte Samen aus Pflanzen, die im vorherigen Schritt ausgewählt wurden, und einen Stearinsäuregehalt von mehr als 20 Gew.-% und einen Oleinsäuregehalt von mehr als 40 Gew.-% aufweisen, durchliefen wiederholt das Selbstungs-, das Screening- und das Selektionsverfahren, um die gefestigte homozygote stearinsäurereiche, oleinsäurereiche Linie mit dem folgenden Fettsäureprofil im Öl zu entwickeln:

Palmitinsäure 7,8 Gew.-%;
 Stearinsäure 24 Gew.-%;
 Oleinsäure 57,7 Gew.-%;
 Linolsäure 5,9 Gew.-%;
 Arachinsäure 1,9 Gew.-%;
 Behensäure 2,7 Gew.-%.

[0075] Sobald das Merkmal einmal gefestigt ist, können ähnliche stearinsäurereiche, oleinsäurereiche Linien gekreuzt werden, um Hybridsamen mit den oben ausgewählten Merkmalen zu bilden.

[0076] Eine Analyse der sn-2-Position und der sn-1,3-Positionen der TAG-Moleküle dieses Öls, zeigt die folgende Verteilung an Fettsäuren (in Gew.-%) an:

sn-2:

Palmitinsäure 3,3%;
 Stearinsäure 3,4%;
 Oleinsäure 88,8%;
 Linolsäure 4,5%;
 Arachinsäure 0%;
 Behensäure 0%

sn-1,3:

Palmitinsäure 9%;
 Stearinsäure 29,9%;
 Oleinsäure 51,1%;
 Linolsäure 4,7%;
 Arachinsäure 2,3%;
 Behensäure 3%.

[0077] Daher liegt die Gesamtmenge an gesättigten Fettsäuregruppen in der sn-2-Position der TAG-Moleküle dieses Öls bei 6,7 Gew.-%.

3. Zweite Kreuzung

[0078] Eine Sonnenblumenpflanze wurde aus einem Sonnenblumensamen einer HOHT-Linie mit einem Stearinsäuregehalt von 8,4 Gew.-% und einem Oleinsäuregehalt von 78,5 Gew.-% herangezogen. Eine Sonnenblumenpflanze wurde auch aus einem CAS-3 Sonnenblumensamen herangezogen. Die Pflanzen wurden gekreuzt. Den Pflanzen wurde durch künstliche Bestäubung geholfen, um das Auftreten einer angemessenen Samenherstellung sicherzustellen. Der F1-Samen wurde aus der HOHT-Linie oder umgekehrt erzeugt und geerntet. Ein F1-Samen mit einem Stearinsäuregehalt von 7,1 Gew.-% und einem Oleinsäuregehalt von 84,6 Gew.-% wurde ausgewählt. Dieser F1-Samen wurde ausgepflanzt und erzeugte eine Pflanze, die unter isolierten Bedingungen geselbstet wurde und F2-Samen wurden erzeugt. Diese F2-Samen wurden auf ihren Oleinsäure- und Stearinsäuregehalt getestet. Ein Samen, der 22,8 Gew.-% Stearinsäure und 64,8 Gew.-% Oleinsäure enthält, wurde ausgewählt.

[0079] Dieser F2-Samen wurde ausgepflanzt und erzeugte eine Pflanze, die unter isolierten Bedingungen geselbstet wurde und am 15DAF wurden verschiedene Samen gesammelt und auf ihre Stearoyl-ACP-Thioesterase-Aktivität analysiert. Pflanzen mit Samen, die mehr als 10% Stearoyl-ACP-Thioesterase in Bezug auf die Oleoyl-ACP-Thioesterase-Aktivität der gleichen Pflanzen erbrachten, wurden ausgewählt. Ausgereifte Samen

der Pflanzen, die im vorherigen Schritt ausgewählt wurden, und einen Stearinsäuregehalt von mehr als 20 Gew.-% und einen Oleinsäuregehalt von mehr als 40 Gew.-% aufweisen, durchliefen wiederholt das Selbstungs-, das Screening und das Auswahlverfahren, um die gefestigte, homozygote, stearinsäurereiche, oleinsäurereiche Linie mit dem folgenden Fettsäureprofil im Öl zu entwickeln:

Palmitinsäure 5,8 Gew.-%;
 Stearinsäure 24,7 Gew.-%;
 Oleinsäure 57,6 Gew.-%;
 Linolsäure 8,2 Gew.-%;
 Arachinsäure 1,8 Gew.-%;
 Behensäure 1,9 Gew.-%.

[0080] Sobald das Merkmal einmal gefestigt ist, können ähnliche stearinsäurereiche, oleinsäurereiche Linien gekreuzt werden, um einen Hybridsamen mit den oben ausgewählten Merkmalen zu bilden.

[0081] Eine Analyse der sn-2-Position und der sn-1,3-Positionen der TAG-Moleküle dieses Öls, zeigt die folgende Verteilung an Fettsäuren (in Gew.-%) an:

sn-2:

Palmitinsäure 1,7%;
 Stearinsäure 1,9%;
 Oleinsäure 87,5%;
 Linolsäure 8,9%;
 Arachinsäure 0%;
 Behensäure 0%

sn-1,3:

Palmitinsäure 7,2%;
 Stearinsäure 33,2%;
 Oleinsäure 46,9%;
 Linolsäure 7,3%;
 Arachinsäure 2,6%;
 Behensäure 2,8%.

[0082] Daher liegt die Gesamtmenge an gesättigten Fettsäuregruppen in der sn-2-Position der TAG-Moleküle dieses Öls bei 3,6 Gew.-%.

4. Dritte Kreuzung

[0083] Eine Sonnenblumenpflanze wurde aus einem Sonnenblumensamen einer HOHT-Linie mit einem Stearinsäuregehalt von 9,9 Gew.-% und einem Oleinsäuregehalt von 81,2 Gew.-% herangezogen. Eine Sonnenblumenpflanze wurde auch aus einem CAS-3-Sonnenblumensamen herangezogen. Die Pflanzen wurden gekreuzt. Den Pflanzen wurde durch künstliche Bestäubung geholfen, um das Auftreten einer angemessenen Samenherstellung sicherzustellen. Der F1-Samen wurde aus der HOHT-Linie oder umgekehrt erzeugt und geerntet.

[0084] Ein F1-Samen mit einem Stearinsäuregehalt von 8,9 Gew.-% und einem Oleinsäuregehalt von 82,3 Gew.-% wurde ausgewählt. Dieser F1-Samen wurde ausgepflanzt und erzeugte eine Pflanze, die unter isolierten Bedingungen selbstet wurde und F2-Samen wurden erzeugt. Diese F2-Samen wurden auf ihren Oleinsäure- und Stearinsäuregehalt getestet. Ein Samen, der 23,9 Gew.-% Stearinsäure und 64,0 Gew.-% Oleinsäure enthält, wurde ausgewählt.

[0085] Dieser F2-Samen wurde ausgepflanzt und erzeugte eine Pflanze, die unter isolierten Bedingungen selbstet wurde und am 15DAF wurden verschiedene Samen gesammelt und auf ihre Stearoyl-ACP-Thioesterase-Aktivität analysiert. Pflanzen mit Samen, die mehr als 10% Stearoyl-ACP-Thioesterase in Bezug auf die Oleoyl-ACP-Thioesterase-Aktivität der gleichen Pflanze erbrachten, wurden ausgewählt. Ausgereifte Samen der Pflanzen, die im vorherigen Schritt ausgewählt wurden, und die einen Stearinsäuregehalt von mehr als 20 Gew.-% und einen Oleinsäuregehalt von mehr als 40 Gew.-% aufweisen, durchliefen wiederholt das Selbstungs-, das Screening- und das Auswahlverfahren, um die gefestigte, homozygote, stearinsäurereiche, olein-

säurereiche Linie mit dem folgenden Fettsäureprofil im Öl zu entwickeln:

Palmitinsäure 5,4 Gew.-%;
Stearinsäure 24,2 Gew.-%;
Oleinsäure 62,1 Gew.-%;
Linolsäure 4,7 Gew.-%;
Arachinsäure 1,6 Gew.-%;
Behensäure 2,0 Gew.-%.

[0086] Sobald das Merkmal einmal gefestigt ist können ähnliche, stearinsäurereiche, oleinsäurereiche Linien gekreuzt werden, um Hybridsamen zu bilden, welche die oben ausgewählten Merkmale aufweisen.

[0087] Eine Analyse der sn-2-Position und der sn-1,3-Positionen der TAG-Moleküle dieses Öls, zeigt die folgende Verteilung an Fettsäuren (in Gew.-%) an:

sn-2:

Palmitinsäure 1,8%;
Stearinsäure 3,3%;
Oleinsäure 89,6%;
Linolsäure 5,3%;
Arachinsäure 0%;
Behensäure 0%

sn-1,3:

Palmitinsäure 9,5%;
Stearinsäure 33,5%;
Oleinsäure 48,2%;
Linolsäure 4,3%;
Arachinsäure 2,2%;
Behensäure 2,3%

[0088] Daher liegt die Gesamtmenge an gesättigten Fettsäuregruppen in der sn-2-Position der TAG-Moleküle dieses Öls bei 5,1 Gew.-%.

[0089] Die vorliegende Anmeldung betrifft genetisches Material, das Pflanzensamen umfasst, die das darin enthaltende Öl, Mehl und zerkleinerte Samen einschließen, als auch das Verfahren zum Heranziehen der Samen und der Pflanzen, die das Ergebnis des Heranziehens der Samen sind, und Pflanzen, die die Samen hervorbringen.

Patentansprüche

1. Sonnenblumensamen, die ein Öl mit einem Ölsäuregehalt von mehr als 40 Gew.-% und einen Stearinsäuregehalt von mehr als 12 Gew.-% auf Basis des Gesamtfettsäuregehaltes des Öls enthalten, und wobei ein Maximum von 10 Gew.-% der Fettsäuregruppen in der sn-2 Position der TAG-Moleküle, die das Öl bilden, gesättigte Fettsäuregruppen sind.

2. Samen gemäß Anspruch 1, wobei die Samen ein Öl enthalten, das in der sn-2 Position der TAG-Moleküle, die da Öl bilden, ein Maximum von 8 Gew.-% an gesättigten Fettsäuregruppen aufweist.

3. Samen gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, wobei die Samen ein Öl enthalten, das in der sn-2 Position der TAG-Moleküle, die das Öl bilden, ein Maximum von 5 Gew.-% an gesättigten Fettsäuregruppen aufweisen.

4. Samen gemäß den Ansprüchen 1-3, wobei der Ölsäuregehalt bei 55 bis 75 Gew.-% liegt.

5. Samen gemäß den Ansprüchen 1-4, wobei der Stearinsäuregehalt bei 15 bis 50 Gew.-% liegt.

6. Samen gemäß Anspruch 5, wobei der Stearinsäuregehalt bei 20 bis 40 Gew.-% liegt.

7. Samen gemäß den Ansprüchen 1-6, wobei das Öl ein Gesamtniveau an gesättigten Fettsäuren von min-

destens 20 Gew.-% hat.

8. Samen gemäß den Ansprüchen 1-7, wobei das Öl einen Linolsäuregehalt von weniger als 20 Gew.-% hat.

9. Sonnenblumenöl mit einem Ölsäuregehalt von mehr als 40 Gew.-% und einem Stearinsäuregehalt von mehr als 12 Gew.-% auf Basis des Gesamtfettsäuregehaltes des Öls, und wobei ein Maximum von 10 Gew.-% der Fettsäuregruppen in der sn-2 Position der TAG-Moleküle, die das Öl bilden, gesättigte Fettsäuregruppen sind.

10. Öl wie in Anspruch 9 beansprucht, wie es in Sonnenblumensamen, wie in den Ansprüchen 1-8 beansprucht, enthalten ist,

11. Sonnenblumenpflanzen, herangezogen aus Sonnenblumensamen gemäß den Ansprüchen 1-8.

12. Sonnenblumenpflanzen, die Sonnenblumensamen gemäß den Ansprüchen 1-8 hervorbringen.

13. Verfahren zum Hervorbringen von Sonnenblumenpflanzen, die Samen wie in den Ansprüchen 1-8 beansprucht bilden, wobei das Verfahren umfasst:

a) Bereitstellen von Samen, die ein Öl mit einem Stearinsäuregehalt von mindestens 12 Gew.-% enthalten durch:

i) mutagenische Behandlung der Sonnenblumensamen mit einem Stearinsäuregehalt von weniger als 12%,
ii) Hervorbringen von Sonnenblumenpflanzen daraus, die bestäubt worden sind, um Samen hervorzubringen,
iii) Testen der Samen auf der gewünschter. Stearinsäuregehalt und
iv) wahlweises Wiederholen der Schritte b) und c);

b) Bereitstellen von Samen, die ein Öl mit einem Ölsäuregehalt von mindestens 40 Gew.-% und einer Thioesterase-Aktivität gegenüber Stearoyl-ACP von mindestens 10% der Thioesterase-Aktivität gegenüber Oleoyl-ACP enthalten;

c) Kreuzen von Pflanzen, herangezogen aus den in Schritt (a) und (b) bereitgestellten Samen;

d) Ernten der F1-Samen Nachkommenschaft.

14. Verfahren wie in Anspruch 13 beansprucht, das weiterhin die Schritte umfasst:

e) Pflanzen der Samen der F1-Nachkommenschaft, um Sonnenblumenpflanzen heranzuziehen;

f) Selbstbestäuben der dadurch herangezogenen Sonnenblumenpflanzen, um F2-Samen hervorzubringen;

g) Testen der Samen auf das Vorhandensein eines Stearinsäuregehalts von mindestens 12 Gew.-%, eines Ölsäuregehaltes von mindestens 40 Gew.-% und einer Thioesterase-Aktivität gegenüber Stearoyl-ACP von mindestens 10% der Thioesterase-Aktivität gegenüber Oleoyl-ACP;

h) Pflanzen von Sonnenblumensamen mit den gewünschten Niveaus des Stearinsäuregehaltes, Ölsäuregehaltes und Thioesterase-Aktivität, um Sonnenblumenpflanzen heranzuziehen;

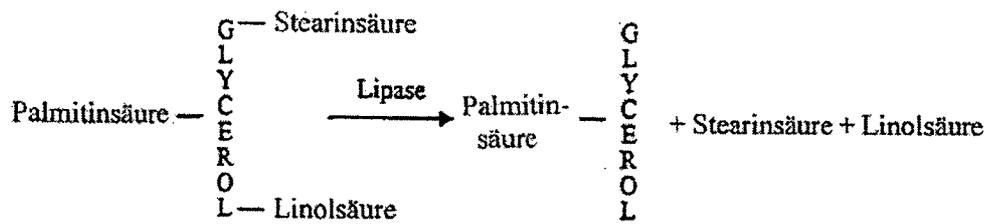
i) Selbstbestäuben der dadurch herangezogenen Sonnenblumenpflanzen, um F3-Samen hervorzubringen; und

j) wahlweises Wiederholen der Schritte g), h) und i), bis die gewünschten Niveaus des Stearinsäuregehaltes und Ölsäuregehaltes und der hohen Thioesterase-Aktivität gefestigt sind.

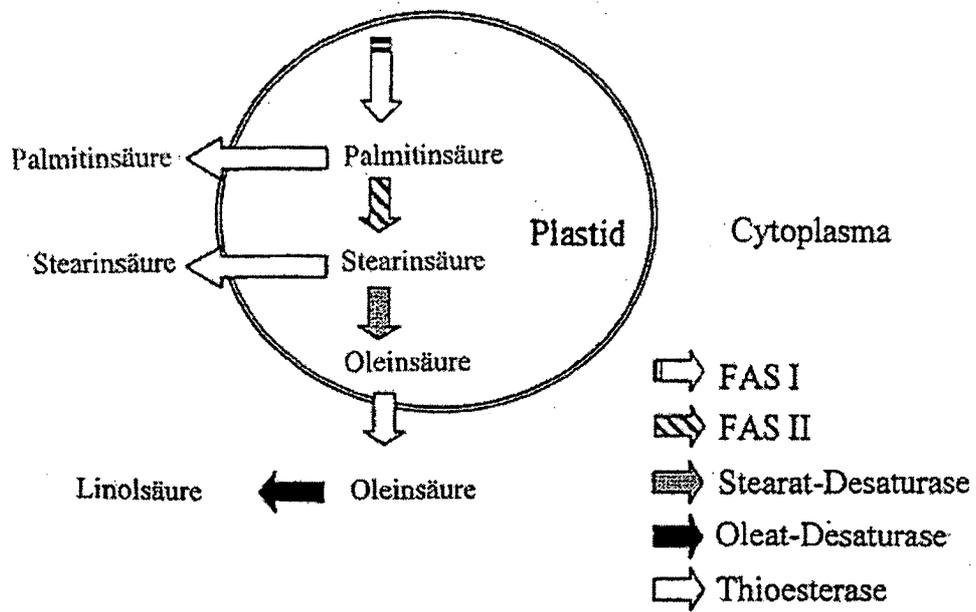
15. Mehl oder zerkleinerte Samen, die von Samen gemäß den Ansprüchen 1-6 stammen.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

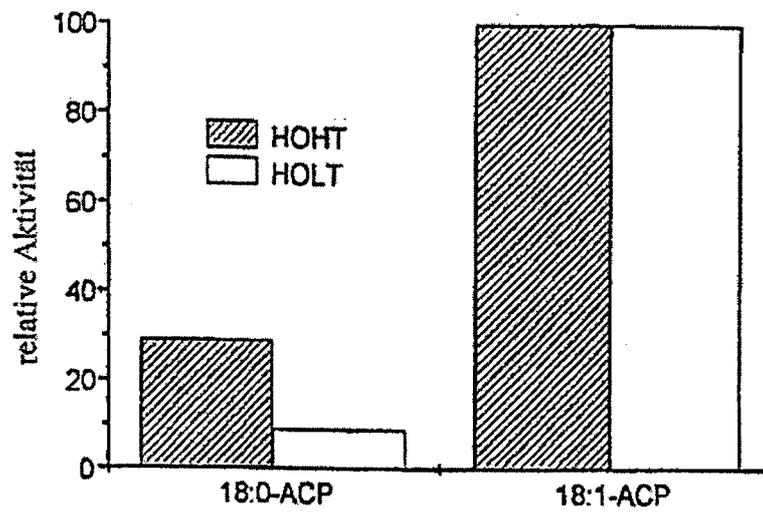
Anhängende Zeichnungen



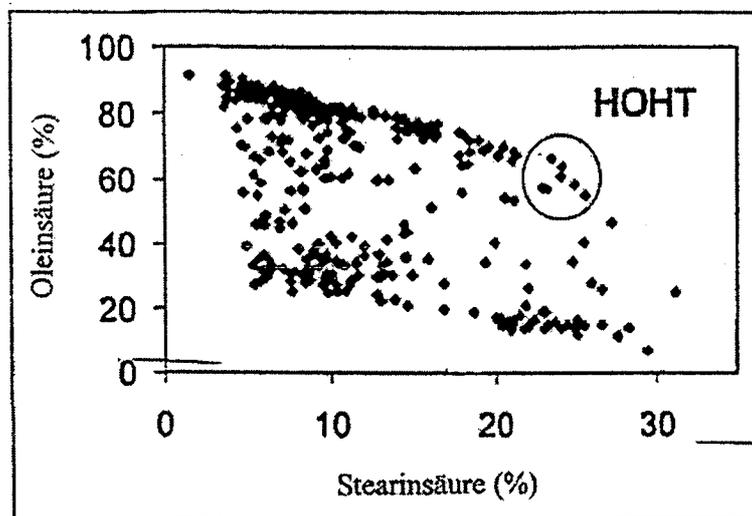
Figur 1



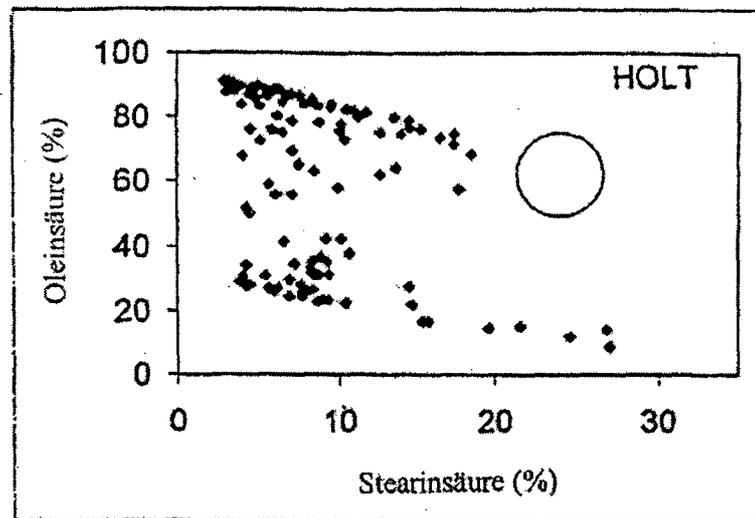
Figur 2



Figur 3



Figur 4



Figur 5