

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12P 7/40
C12P 7/64
A01H 5/00
C12N 15/82
C12N 9/20



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 99810534.1

[45] 授权公告日 2005 年 8 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1213148C

[22] 申请日 1999.8.3 [21] 申请号 99810534.1
[30] 优先权
[32] 1998. 8. 3 [33] US [31] 09/127,743
[86] 国际申请 PCT/US1999/017569 1999.8.3
[87] 国际公布 WO2000/007432 英 2000.2.17
[85] 进入国家阶段日期 2001.2.28
[71] 专利权人 嘉吉有限公司
地址 美国明尼苏达州
[72] 发明人 D·R·科达利 樊哲工
L·R·德博内特
审查员 张秀丽

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 25 页 附图 1 页

[54] 发明名称 生物可降解的高度抗氧化油
[57] 摘要

本文描述了一种含 1, 3 - 二芥酰基 - 2 - 油酰基甘油 (EOE) 含量至少为 50% 左右的油的三酰基甘油。 还描述了产含高 EOE 油的植物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种含三酰基甘油的油，其特征在于，所述的含三酰基甘油的油中 1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油的含量至少占总三酰基甘油组合物的 50%。
- 5 2. 如权利要求 1 所述的油，其特征在于，所述的 1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油的含量为 60%-95%。
3. 如权利要求 2 所述的油，其特征在于，所述的 1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油的含量为 75%-90%。
4. 如权利要求 1 所述的油，其特征在于，在不含附加的抗氧剂时，所述的油的
10 抗氧性为 80AOM 小时-300AOM 小时。
5. 如权利要求 4 所述的油，其特征在于，所述的油的抗氧性为 84AOM 小时-120AOM 小时。
6. 如权利要求 1 所述的油，其特征在于，所述的油的粘度指数大于 195。
7. 一种液压油组合物，其特征在于，所述的组合物包括 1,3-二芥酰基-2-油酰
15 基甘油含量至少占总三酰基甘油组合物 50%的油和添加剂。
8. 如权利要求 7 所述的液压油组合物，其特征在于，所述的添加剂选自：抗氧剂、防锈剂、抗磨剂、降凝剂、粘度指数改善剂和消泡剂。
9. 如权利要求 7 所述的液压油组合物，其特征在于，所述的添加剂的含量占总组合物重量的 0.01%-20%。
- 20 10. 一种润滑油添加剂，其特征在于，包括含三酰基甘油的油，其中 1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油的含量占总三酰基甘油组合物的至少 50%，当所述的添加剂在润滑油液体中以所述的润滑油重量的 2%-20%存在时，能有效降低摩擦系数。

生物可降解的高度抗氧化油

5 发明领域

本发明涉及在总三酰基甘油组合物中至少含有 50%的 1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油(EOE)的油及其工业上的应用。

发明背景

10 工业中所应用的油通常是烃类石油，它们破坏环境而且损害使用者的健康。除石油制品外，植物油不破坏环境，而且是一种可再生的自然资源。植物油的主要成分是三酰基甘油，它的三脂肪酸链可酯化成甘油分子。其极性甘油部分和非极性烃类部分在金属表面的边界上成一直线，因此比烃类石油具有更好的润滑剂特性。

15 但植物油的两个主要特性阻碍了它们在工业上的应用。大部分植物油不同时具备这两种特性。首先植物油必须是液态的，且低温时要具备适当的粘度。例如，高芥(erucic)纯菜籽油的凝固点为-16℃，但粘度随温度的降低显著增加。

其次，必须具备高度的抗氧化性。通常抗氧化性是与脂肪酸的未饱和度相关的。与氧气的反应将导致脂肪酸的聚合和交联并增加粘度。饱和的烃类油没有未
20 饱和的(脂肪酸)，因此具有高度的抗氧化性。

发明概述

本发明涉及富含 EOE 的油及其在工业上的应用。这种油可人工合成或由植物提取。

25 本发明一方面涉及含三酰基甘油的油，其在总三酰基甘油组合物中至少含有约 50%的 1,3-二芥酰基(erucoyl)-2-油酰基甘油。在一些实施例中，这种油含有约 60%到 90%(如约 60%-90%)或约 75%到 95%(如约 75%-90%)的 1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油。在不含附加的抗氧化剂时，本发明的油的抗氧化性为约 80AOM 小时-约 300AOM 小时。尤其是氧化稳定性为约 84AOM 小时-120AOM 小时。这种油的粘度指
30 数大于约 195。

另一方面，本发明涉及的植物的种子与相应的野生型植物的种子相比，种子

的 δ -12 去饱和酶的活性被特异性降低。适合的植物是那些天然产芥酸的品种。从如此改良的植物得到的种子，可得到含约 45%-70%的芥酸和约 22%-35%油酸的油。例如，这种油可含有约 48%-66%、约 50%-66%、或约 55%-66%芥酸，和约 25%-35%、约 28%-35%或约 30%-35%油酸。在一实施例中，与相应的野生型植物种子相比，这些植物种子中棕榈酰 ACP 硫酯酶(thioesterase)活性降低， δ -9 去饱和酶活性增加。而且与相应的野生型植物种子相比，这些植物种子中 δ -15 去饱和酶的活性也降低。

本发明还涉及天然产芥酸品种的转基因植物，所述的转基因植物至少具有一个核酸构建物。所述的核酸构建物包括一可操纵连接于 fad2 编码序列的调节序列。与相应的非转基因植物相比，转基因植物表现出 δ -12 去饱和酶活性的降低，且从产生的种子得到的油，含有约 45%-70%芥酸和约 22%-35%油酸(占总脂肪酸组合物)。从这种转基因植物的后代得到的种子，产生的油所含的芥酸与油酸含量与亲代相同。

本发明的转基因植物还有至少一个构建物，带有一可操纵连接于棕榈酰 ACP 硫酯酶编码序列的调节序列和一可操纵连接于 δ -9 去饱和酶编码序列的调节序列。与相应的非转基因植物相比，这种植物表现出 δ -9 去饱和酶活性的种子特异性上升和棕榈酰 ACP 硫酯酶活性的种子特异性降低。在一些实施例中，转基因植物还含有至少一个构建物，带有可操纵连接于 fad3 编码序列的调节序列，并且与相应的非转基因植物相比表现出 δ -15 去饱和酶活性的降低。

本发明还涉及制造内源性植物油的方法。这种方法包括碾碎本发明的植物种子，然后从中提取。

另一方面，描述了一种含有约 45%-70%芥酸和约 22%-35%油酸(占总脂肪酸组合物)的内源性油。这种油的三酰基甘油含有约 75%或更多的 1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油。在一些实施例中，这种油的三酰基甘油含有约 75%-90%的 1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油。一内源性芸苔油中 1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油的含量至少占总三酰基甘油组合物的约 38%。

本发明还涉及高度抗氧化的组合物，包括植物油和适量的 1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油，以有效地增加植物油的抗氧化性。

本发明还涉及液压油，包括含有至少 50%(占总三酰基甘油组合物)1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油的油和调节剂。所述的调节剂可以是，例如抗氧化剂、防锈剂、抗磨剂、降凝剂、粘度指数改善剂、消泡剂或上述的组合，且在组合物总重中所

占的量约为 0.01%–20%。

还公开了一种润滑油添加剂，所含的三酰基甘油含有占总三酰基甘油组合物至少 50%的 1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油的油。当以约 2%–20%(润滑液体重量)的量存在时，这种添加剂能有效减少摩擦。

5 除非特别指出，本文所用的所有技术和科学术语均为本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。以下公开了若干适合的方法和材料，但有许多与本文所公开的类似或相当的方法和材料可用于实现本发明。本文所引用的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献本文全部纳入作为参考。为避免冲突，本发明的说明书包括定义受限。另外，材料、方法和实施例仅起说明作用，无任何限制作用。

10 本发明的其它特性和益处以下的发明详述和权利要求中是显而易见的。

附图简述

图 1. EOE 的化学结构。

15 发明详述

本发明涉及含有特异性三酰基甘油组合物的油。具体地说，本发明涉及含三酰基甘油的油，其在甘油(1,3-二芥酰基-2-油酰基甘油，EOE)的 sn-1 和 sn-3 上带有芥酸部分，在 sn-2 上带有油酸部分。

一方面，本发明含三酰基甘油的油包括占油中总三酰基甘油(TAG)组合物约 20 50%或更多含量的 EOE。本文所用的“含三酰基甘油的油”是指主要由三酰基甘油组成的、合成的或天然的油。在一些实施例中，含三酰基甘油的油包括含量约为 60%到 95%(如约 60%–90%)的 EOE，较佳地是约 75%到 95%(如约 70%–90%)。本发明油中 TAGs 的比例(为 EOE)易由 AOCS Official Method Ce 5B-89 测得。可与外标和内标比较鉴定单个的 TAGs，并可用非线性二次拟合曲线定量。本发明的油可以 25 是人工合成的，也可是来自天然来源。

EOE 的合成

可用 1,3-二羟丙酮和游离的芥酸和油酸作为起始物，化学合成 EOE 含量至少为 50%(占总三酰基甘油组合物)的含三酰基甘油的油。本文所述的化学合成的油含有 80%或更多 EOE，较佳地为大于 90%。在第一个步骤中，在存在二环己基碳化 30 二亚胺和 4-二甲氨基吡啶时，将 1,3-二羟丙酮二聚物和芥酸反应，形成 1,3-二芥酰基丙酮。可用如硼氢化钠和水还原 1,3-芥酰基丙酮的酮基，得到 1,3-二芥酰

基丙醇。在存在二环己基碳化二亚胺和 4-二甲氨基吡啶时, 将 1, 3-二芥酰基丙醇与油酸反应, 形成 1, 3-二芥酰基 2-油酰基丙烷。

另外, 高芥酸菜籽油 (HEAR) 可从皱落假丝酵母的脂肪酶 (Sigma chemical Company, St. Louis, MO) 水解, 得到 1, 3 二芥精和游离的脂肪酸。在该步骤中, 5 将皱落假丝酵母脂肪酶的水溶液加到 HEAR 油中, 匀速搅拌并将温度维持于室温约 18 个小时。用相同比例的氯仿和水提取得到的被水解的油。回收氯仿层, 在硫酸镁上干燥, 过滤、蒸发得到油状残留物。用冷乙醇洗涤后, 过滤得到的固体, 以回收游离脂肪酸, 再用冷乙醇洗涤, 以收获 1, 3 二芥精。可用 CSC-Spherisorb-ODS3 柱, 以等比例的丙酮和乙腈为流动相, 作 HPLC 纯化二芥精。见 Trani, M., 1993, 10 J. Am. Oil Chem. Soc., 70(10):961-964。也可从 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) 购得二芥精。存在固化非特异性脂肪酶 (如 SP 382, Novo) 时, 将纯化的 1, 3 二芥精与游离油酸反应, 可制得含至少 50%EOE 的油。

从天然来源制备 EOE

EOE 可从内源性油纯化得到, 如从高芥酸菜籽油提取的油或各种两节芥属 15 (Crambe) 品种种子提取的油。从通常 HEAR 油提取的三酰基甘油的油主要含有在 sn-2 的油酸 (18:1)、亚油酸 (18:2) 或亚麻酸 (18:3), 及在 sn-2 位上由少于 0.5mol% 脂肪酸构成的芥酸 (22:1)。HEAR 类型的菜籽油和两节芥属的油分别含有约 17% 和 46%EOE。可按 AOCS Official Method Ce 5B-89, 用 HPLC 从 *C. abyssinica* 或 *C. hispanica* 分离 TAGs。用这种方法纯化的 EOE 的保持时间为约 17 分钟。另外, 可 20 用 ChromSphere Lipids 柱 (Chrompack, Raritan, NJ) 以 HPLC 纯化 EOE。可用由己烷: 甲苯: 甲苯: 乙酸乙酯、和甲苯: 99%甲酸构成的溶剂组合洗脱 TAGs。Lassner, M. W. 等人, 1995, Plant Physiol., 109:1389-1394。当用 Lassner 等人的方法纯化 EOE 时, EOE 的保持时间为约 13 分钟。

可用基因改造、诱变或它们的组合, 操纵天然产芥酸的植物来产出高水平的 25 EOE。碾碎这些改良植物的种子并从中提取, 可得到芥酸含量为约 45%-70%、油酸含量为约 22%-35% (占总脂肪酸组合物) 的内源性植物油。这种油的 EOE 含量较佳的是约 75%-90% (占总三酰基甘油的油组合物)。

天然产芥酸适合于这种操纵的植物包括芸苔属 (*Brassica*), 如油菜 (*B. napus*)、芥菜 (*B. juncea*) 和芜菁 (*B. rapa*), 两节芥属 (*Crambe*), 如 30 *C. abyssinica* 和 *C. hispanica* 和池花属 (*Limnanthes*), 如 *L. alba alba* 和 *L. douglasii* (meadowfoam)。通常改良植物的饱和及多不饱和脂肪酸的水平下降,

以增加油酸和芥酸的含量，从而提高 EOE 的含量。

可将至少一个核酸构建物引入上述的植物细胞中，以得到转基因植物。生长和自交(或异型杂交和自交)这种转基因植物的种子，得含构建物的纯合植物。分析种子以鉴定那些带所需构建表达的纯合子。可将转基因植物进行育种，如增加
5 种子、将新的构建基因渗入别的种系或属中、或进一步选择其它所需的性状。另外，可通过转化的植物细胞的营养繁殖得到转基因植物(对那些适用于这些方法的品种)。

本文所用的转基因植物也指初级转基因植物的后代。这种后代包括某一植物或植物品系的后代，如直接从植物得到的种子。植物的后代也包括形成为 F_1 、 F_2 、
10 F_3 的种子和及其后代或形成为 BC_1 、 BC_2 、 BC_3 的种子及其后代。

本发明所用的转基因方法包括，但并不限于，土壤杆菌属介导的转化、电穿孔法和基因枪转化。美国专利 5,204,253(基因枪)和美国专利 5,188,958(土壤杆菌属)中描述了转化方法的实例。用土壤杆菌亚类的 Ti 和 Ri 质粒的转化方法通常用双元载体。Walkerpeach, C 等人, Plant Molecular Biology Manual, S. Gelvin
15 和 R. Schilperoort 编辑, Kluwer Dordrecht, C1:1-19(1994)。若将细胞或组织培养物作为转化的受体，可用本领域技术人员已知的方法从转化的培养物中再生植物。

可产生 δ -12 脂肪酸去饱和酶活力种子-特异性降低的(与相应的非转基因植物相比)转基因芸苔或两节茅属植物。这些植物的种子油中 EOE 水平上升。从这些
20 种子得到的油包括约 45%-70%芥酸(如约 48%-66%或约 50%-66%)和约 22%-35%油酸(如约 25%-35%)(占总脂肪酸组合物)。通常碾碎大批种子样品(如 10 个种子)并从中提取脂肪酸来分析油组合物。水解种子中的脂肪酸甘油三酯，并将其转化成脂肪酸甲酯。可用技术人员已知的方法鉴定含变异脂肪酸组合物的那些种子，如气液层析(GLC)分析大量的种子样品、单个种子或半个种子。半个种子分析是本领域
25 熟知的，因为维持了种子胚胎的活力，因此可从新的后代中培养那些具备所需脂肪酸特性的种子。但大量种子分析通常得到更精确的给定基因型脂肪酸特性的表达。也可测定较多样品的脂肪酸组合物，如从中试或工业规模提炼、漂白和除臭种子内源性油时得到的油。

δ -12 脂肪酸去饱和酶(也称为油酸去饱和酶)参与油酸酶促转化成亚油酸。
30 已克隆了微粒体 δ -12 去饱和酶，并用 T-DNA 标签鉴定。Okuley 等人, Plant Cell 6:147-158(1994)。Lightner 等人在 W094/11516 中描述了高等植物中编码微粒体

δ -12 脂肪酸去饱和酶的基因的核苷酸序列。编码 δ -12 脂肪酸去饱和酶的基因在芸苔属和拟南芥属中也称为 fad2。

可用以下方法包括，但并不限制于，反义、核酶切割、显性失活抑制和共抑制，实现种子-特异性降低 δ -12 去饱和酶活力。这些方法明显降低天然基因的基因产物的表达。可从反应产物水平的降低(如降低的 18:2)和种子底物水平的增加(与相应非转基因植物的水平相比)推断 fad2 基因表达和 δ -12 去饱和酶活力的降低。

本发明的转基因植物还表现出棕榈酰 ACP 硫酯酶活性的种子-特异性降低和 δ -9 去饱和酶活性的种子-特异性升高(与相应的非转基因植物相比)。棕榈酰-ACP 去饱和酶或去饱和酶-2 将棕榈酰-ACP 水解成游离棕榈酸和 ACP。棕榈酰-ACP 去饱和酶活性的种子-特异性降低防止了 ACP 载体蛋白释放棕榈酸，从而使棕榈酰-ACP 延伸成硬脂酰-ACP。WO95/13390、WO96/06436 和美国专利 No. 5, 530, 186 中公开了植物棕榈酰-ACP 去饱和酶的序列。棕榈酰-ACP 去饱和酶活力的种子特异性降低可用以下方法实现，包括(但并不限制于)诱变、反义、核酶切割、显性失活抑制和共抑制。

δ -9 去饱和酶催化 Δ 9 位硬脂酰-ACP(18:0)的去饱和，得到油酰-ACP(18:1)，并且由于它对硬脂酸盐的强活性也被称为“硬脂酰-ACP 去饱和酶”。已有人描述了酵母、大鼠和小鼠的编码微粒体 δ -9 去饱和酶的核苷酸序列。Stukey 等人，J. Biol. Chem., 265:20144-20149, (1990); Thiede 等人，J. Biol. Chem., 261: 13230-13235, (1986); Kaestner 等人，J. Biol. Chem., 264:14755-14761, (1989)。也有人描述了高等植物编码可溶性 δ -9 去饱和酶的核苷酸序列。Thompson 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:2578-2582, (1991); Shanklin 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:2510-2514。用上述方法将 δ -9 去饱和酶编码序列可操作连接到定向中的种子-特异性调节元件，并将构建物引入到植物细胞，能过量表达 δ -9 去饱和酶。

3-酮酯酰-ACP 合成酶 II(KAS II)(将棕榈酰-ACP 延伸成硬脂酰-ACP)表达的增加也可用于降低棕榈酰-ACP 水平。也有人描述了植物 KAS II 的序列，如美国专利 No. 5, 500, 361。可产生仅过量表达 KAS II 的植物、或还组合有棕榈酰-ACP 去饱和酶活力降低或 δ -9 去饱和酶过量表达的植物、或还组合有棕榈酰-ACP 去饱和酶活力降低和 δ -9 去饱和酶活力过量表达的植物。

本发明的转基因植物也可表现出 δ -15 脂肪酸去饱和活性的种子-特异性降低

(与相应的非转基因植物相比)。 δ -15 脂肪酸去饱和酶(也称为亚油酸去饱和酶)参与亚油酸酶促转化成 α -亚油酸。编码 δ -15 脂肪酸去饱和酶的基因在芸苔属和拟南芥属中称为 *fad3*。Yadav, N 等人, *Plant Physiol.*, 103:467-476(1993), WO 93/11245 和 Arondel, V 等人, *Science*, 258:1353-1355(1992)中公开了高等植物编码微粒体和质体 *fad3* 去饱和酶的基因序列。 δ -15 去饱和酶活力的种子-特异性降低可用以下方法实现, 包括(但并不限于)上述的反义、核酶切割、显性失活抑制和共抑制。从这些植物后代产生的种子得到的油含有约 50%-70%芥酸和约 25%-35%油酸。

可用含有去饱和酶或硫酯酶转录序列的片段来制备用于抑制去饱和酶或硫酯酶活力的反义和共抑制构建物。适合的核酸构建物包括可操作连接于 *fad2* 编码序列的调节序列以降低 δ -15 去饱和酶的活力。适当的用于降低 δ -15 去饱和酶活力的核酸构建物包括可操作连接于 *fad3* 编码序列的调节序列。通常调节序列本身不编码基因产物, 但影响编码序列的表达水平。调节序列的例子是本领域已知的, 包括(但并不限于)胚胎发育过程中的基因表达的启动子, 如 *napin* 启动子、云扁豆储藏蛋白启动子、油质蛋白启动子、*cruciferin* 启动子和组成型启动子如花椰菜花叶病毒 35S 启动子。可用于本发明构建物的天然调节序列包括 δ -9、 δ -12 和 δ -15 脂肪酸去饱和酶基因的天然启动子。其它适合的调节序列例子包括增强子或类增强子元件、诱导元件、内含子和 3' 非编码区域(如多聚 A 序列)。用于适当表达 δ -9、 δ -12 或 δ -15 去饱和酶和棕榈酰-ACP 硫酯酶编码序列或其它参与饱和脂肪酸生物合成的基因的调节序列的其它例子是本领域已知的。

在优选实施例中, 调节序列是种子-特异性的, 即特定的基因产物优先在种子发育中表达, 在植物的其它组织表达的水平很低或根本没有。较佳地, 种子-特异性调节序列刺激或诱导重组去饱和酶编码序列片段的表达(在表达天然去饱和酶基因的同时或之前)。Murphy 等人, *J. Plant Physiol.*, 135:63-69(1989)。

已用反义 RNA 以组织-特异性方法来抑制植物靶基因。van der Krol 等人, *Biotechniques*, 6:958-976(1988)。已显示了用完整 cDNA 序列以及部分 cDNA 序列进行反义抑制。Sheehy 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8805-8809(1988); Cannon 等人, *Plant Mol. Biol.*, 15:39-47(1990)。也有证据表明 3' 非编码序列片段和 5' 编码序列片段在反义抑制中有重要作用。Ch'ng 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10006-10010(1989); Cannon 等人, 上述。反义核酸构建物包括可操作连接于至少一个适当的反向调节序列的部分或全长编码序列。

可用核酶对植物种子油中脂肪酸的水平进行理想的改变。可用设计来切割 δ -12 或 δ -15 去饱和酶或棕榈酰-ACP 硫酯酶 mRNA 转录物的核酶分子, 来防止 δ -12 或 δ -15 去饱和酶和棕榈酰-ACP 硫酯酶的表达。各种在位点-特异性识别序列切割 mRNA 的核酶可用于破坏去饱和酶 mRNA, 其中锤头核酶是特别有用的。锤头核酶切割由侧翼区域(与靶 mRNA 形成互补碱基对)指定位点上的 mRNA。唯一的要求就是靶 RNA 含有 5'-UG-3' 核苷酸序列。锤头核酶的构建和生成是本领域熟知的。见如美国专利 No. 5, 254, 678。可将锤头核酶包埋到稳定的 RNA(如转移 RNA, tRNA), 以增加体内切割的有效性。Perriman, R 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(13):6175-6179(1995); de Feyter, R. 和 Gaudron, J., Methods in Molecular Biology, Vol. 74, 第 43 章, “植物中核酶的表达”, Turner 编辑, P.C, Humana Press Inc., Totowa, NJ。也可用 RNA 内切核糖核酸酶, 如在嗜热梨状肌(*Tetrahymena thermophila*)中天然产生的, Cech 和其合作者对其进行了全面描述。见如美国专利 No. 4, 987, 071。

已有人描述了用共抑制现象以组织-特异性方法来抑制植物靶基因。已知用全长 cDNA 序列以及部分 cDNA 序列来共抑制内源性基因。Napoli 等人, The Plant Cell, 2:279-289(1990); van der Krol 等人, The Plant Cell, 2:291-299(1990); Smith 等人, Mol. Gen. genetics, 224:477-481(1990)。可用正向的完整或部分编码 fad2 或 fad3 基因的序列的表达实现共抑制(如植物的 δ -12 或 δ -15 去饱和酶活力)。见如 W094/11516 和美国专利 No. 5, 850, 026。

易于理解的是去饱和酶、硫酯酶或合成酶表达是非组织-特异性改变的植物也是有用的。可用组成型启动子(如诱导启动子和花椰菜花叶病毒 35S 启动子或上述的突变体)产生这些植物, 以表达适当酶的编码序列。

也可用诱变以非组织特异性形式来改变这些活性。例如, 可用编码 δ -12 去饱和酶、 δ -15 去饱和酶或棕榈酰硫酯酶的基因或其它参与饱和脂肪酸生物合成的基因的诱变来降低植物中饱和脂肪酸的水平。见如美国专利 No. 5, 668, 229。可用诱变剂来诱导大量种子或再生植物组织中随机的遗传突变。适合的诱变剂包括如乙基磺酸甲酯、甲基 N-亚硝基胍、溴化乙锭、双环氧丁烷、X 射线、UV 射线和其它本领域已知的诱变剂。筛选被处理的种群或该种群的后代, 以得到由诱变产生的降低的去饱和酶或硫酯酶活性。突变可在基因的任何一个部分, 包括编码序列、内含子序列和调节元件(反映得到的基因产生失活或活性降低)。适当的突变类型包括例如核苷酸的插入或缺失和野生型编码序列的转换或颠换。这些突变将

导致氨基酸的缺失或插入，和在相应基因产物中颠换或非颠换的氨基酸取代。

可在 W097/21340 中发现突变 $\delta-12$ 和 $\delta-15$ 去饱和酶基因的例子。可用表现出去饱和酶或硫酯酶活性降低的植物来产生植物系，该植物系产生的种子中 EOE 的含量至少为约 50% (用常规育种方法)。如上述，可用基因改造、诱变或它们的组合来提高油酸和芥酸的含量。例如，可将在 *fad2-d* 和 *fad2-f* 基因上突变的高油酸 Q4275 canola 植物系与高油酸低亚麻酸特性的植物系 (如美国专利 No. 5, 850, 026 中的植物) 杂交。然后可将这种杂交产生的植物与含高芥酸的植物系杂交。适合的高芥酸油菜籽系包括，例如 Hero (HE101、HEC01)、Mercury、Venus、Neptune、或 S89-3673，它们含有约 45% 或更多的芥酸。McVetty, P. B. E. 等人, Can. J. Plant Sci., 76(2):341-342 (1996); Scarth, R. 等人, Can. J. Plant Sci., 75(1):205-206 (1995); 和 McVetty, P. B. E. 等人, Can. J. Plant Sci., 76(2):343-344 (1996)。其它可用的高芥酸菜籽油系包括被命名为 Dwarf Essex、Bridger、Reston 和 R-500 的品系。适合的高油酸低亚麻酸品系包括，例如转基因品系 048X058 和 663-40。品系 663-40 是用转基因 (包括连接于亚麻酸去饱和酶基因的 *napin* 启动子) 共抑制的产物。品系 048X058 含有 663-40 转基因和将转基因 (包括连接于油酸去饱和酶基因的油质蛋白启动子) 引入产生的第二次共抑制。

EOE 含量至少为 50% 的油的特性

EOE 含量至少为 50% 的油是高抗氧化性的，且具有良好的低温特性。不束缚于特定的机制，认为大部分三酰基甘油中的高度单未饱和物和各种链长的脂肪酸阻止了三酰基甘油的顺次堆积。端点的甲基在分子体积失配，诱导了 Van der Waals 相互作用。芥酸和油酸单个双键位置的差异 (分别为 13-14 碳和 9-10 碳) 破坏了堆积，其认为诱导了相邻链间的 $\pi-\pi$ 相互作用。

EOE 含量至少为 50% 的油的抗氧化性比其它植物油高。抗氧化性是与油的未饱和程度相关的，其可测定，如按 AOCS Official Method Cd 12b-92 (1993 年颁布) 用 Oxidative Stability Index 装置 (Omnion, Inc., Rockland, MA)。抗氧化性也通常用 “AOM” 小时表达。例如，EOE 含量至少为 50% 的油的抗氧化性为 60 AOM 小时-120 AOM 小时 (未添加抗氧化剂)，或 80 AOM 小时-120 AOM 小时。在优先实施例 1 中，无抗氧化剂时，油的抗氧化性为约 84 AOM 小时。相反，无抗氧化剂时，HEAR 和豆油的抗氧化性分别为约 10 和 16 AOM 小时。合成的 EOE 不含植物原料中发现的天然生育酚其它抗氧化剂。根据植物油中 EOE 的百分比，植物产的 EOE 有较高的氧化稳定性。

- 含抗氧化剂时, EOE 含量为至少 50%的油的抗氧化性为约 250-600 AOM 小时。较佳地, 抗氧化性为约 380 AOM 小时-570 AOM 小时。可用的适合的抗氧化剂如二硫代磷酸锌、二硫代氨基甲酸甲酯、受阻酚、硫化酚、金属酚硫化物、水杨酸金属、芳香胺、磷-硫化脂肪和烯烃、硫化烯烃、硫化脂肪和脂肪衍生物、硫化煤油、硫化羧酸、双水杨醛(disalicylal)-1, 2-丙二酰胺、2, 4-二(烷基二硫代-1, 3, 4-thiadiazole)和二月桂基硒化物。抗氧化剂通常的量为约 0.001%-5%(组合物的重量)。在优先实施例中, 加入抗氧化剂如叔丁基氢醌(TBHQ)、Lubrizol 产品号 OS-121056F 或 Dover Chemical Corporation(Ohio)的 Dovernox 抗氧化剂, 加入的量为约 0.001%-3%。
- EOE 含量为至少 50%(TAG 组合物)的油具有优良的低温粘性。-5℃时粘度为 440 厘泊(cP), 可与三甲基丙烷三油酸(TMPTO)相比。相反, -5℃以产品号 66H 和 71S(Lubrizol, Wickliffe, OH)出售的石油基油的粘度在 660 和 1565 之间。-5℃Crambe 油的粘度约为 1300cP。EOE 含量至少为 50%的油的粘度指数值约为 208。粘度指数是表明润滑油粘度对温度变化的耐性的随机数, 可通过 American Society for Testing and Materials(ASTM)标准方法(D2270-91)测定。可从 40℃和 100℃观察到的润滑剂的运动粘度计算粘度指数; 粘度指数值的范围通常在 0-200 以上。可用 Test Methods D 445, IP71 或 ISO 3104 测定运动粘度值。较高的运动粘度值表明油的粘度随温度改变变化得较小。换言之, 粘度指数越大, 润滑剂对低温增稠和高温变稀的抗性也越好。通常三酰基甘油比其它烃类油粘度指数大, 即三酰基甘油的粘度随温度改变变化得较小。EOE 含量至少为 50%的油的粘度指数可与油(如 HEAR、IMC-6Q canola 和 TMPTO)相比, 明显比矿物油的粘度指数好。
- 在碘值上(IV), EOE 含量至少为 50%的油的凝固点比其它植物油低。凝固点是冷却时油流动的最低温度, 通常用 ASTM 标准方法 D97 测定。EOE 含量至少为 50%的油的凝固点为约 0℃到约-30℃。
- 令人惊讶的是, EOE 含量至少为 50%的油在室温时为液态, 熔点为 6℃或更低。EOE 在三酰基甘油中具有最低的脂肪酸未饱和度, 和最低的 IV(73.3)。EOE 含量至少为 50%的油在室温的流动性部分是由于上述的 TAG 的堆积。EOE 的脂肪酸分子的链长各不相同, 且在不同位置带有双键。与其相反, 三芥酰基甘油(EEE)的三个芥酸分子被酯化成甘油, 且双键在脂肪酸链的相同位置, 在室温时为固态(熔点约为 35℃)。

油组合物

本发明还涉及高抗氧性的油组合物。这种组合物含有植物油以及大量有效增加植物油抗氧性的 EOE。适合的植物油例子(非限制性)包括棕榈、椰子、玉米、大豆、向日葵和油菜籽(包括 canola)油。可在植物油中加入合成的 EOE 或 EOE 含量至少为 50%(总三酰基甘油组合物)的油。通常,添加约 10%-90%EOE 能增加植物油的抗氧性。较佳的是,在植物油中添加约 40%-60%EOE。例如,在 IMC130 油(一种半-油酸 canola 油)中添加 50%合成的 EOE,能使植物油的抗氧性从 38AOM 小时左右增加到 87AOM 小时左右。

本发明还涉及一种油组合物,其包括 EOE 含量至少为 50%(总三烯基组合物)的油和添加剂。例如,通过在 EOE 含量至少为 50%(总三酰基组合物)的油中加入一种或多种添加剂,可将本发明的油配制成用于工业应用的油,如发电机润滑油或液压油。例如可制造用于柴油机的传输液体,包括抗氧剂、消泡剂、抗磨剂、防腐剂、分散剂、脱垢剂、和酸中和剂,或上述组合。液压油组合物可包括抗氧剂、防锈剂、抗磨剂、降凝剂、粘度指数改善剂、和消泡剂,或上述组合。特殊的油配方可按该油的最终使用变化,并可用标准方法评估。通常,添加剂的总量约为 0.01%-20%(组合物重量)。

抗氧剂通常包括二硫代磷酸锌、二硫代氨基甲酸甲酯、受阻酚、硫化酚、金属酚硫化物、水杨酸金属、芳香胺、磷-硫化脂肪和烯烃、硫化烯烃、硫化脂肪和脂肪衍生物、硫化煤油、硫化羧酸、双水杨醛(disalicylal)-1, 2-丙二酰胺、2, 4-二(烷基二硫代-1,3, 4-thiadiazole)和二月桂基硒化物。TBHQ 和 Lubrizol 产品号 OS-121056F 是特别有用的抗氧剂,通常存在的量为约 0.01%- 5%(组合物重量)。具体地说,在本发明的油中加入约 0.01-3.0%抗氧剂。见美国专利 No. 5, 451, 334 中可添加的抗氧剂。

防锈剂保护表面抗锈,包括烷基丁二酸类型的有机酸及其衍生物、烷基硫代乙酸及其衍生物、有机胺、无机磷酸盐、多元醇、磺酸钠和磺酸钙。抗磨剂粘附在金属上,从而减少金属与金属的接触。通常,抗磨剂包括二烷基二硫代磷酸锌、磷酸三、二月桂基亚磷酸、硫化鲸油、硫化萘和二烷基二硫代氨基甲酸锌,使用的量为约 0.05%-4.5%。

防腐剂包括二硫代磷酸盐,具体地说是二硫代磷酸锌、金属磺酸盐、金属酚盐硫化物、脂肪酸、酸式磷酸脂和烷基丁二酸。

降凝剂使油组合物在低于原润滑油的凝固点流动。普通降凝剂包括聚甲基丙

烯酸酯、蜡烷基化萘聚合物、蜡烷基化酚聚合物和氯化聚合物，存在的量约为 1% 或更低。见如美国专利 No. 4, 451, 334 和 No. 5, 413, 725。加入如聚异丁烯、聚甲基丙烯酸酯、聚丙烯酸酯、乙烯-丙烯共聚物、苯乙烯-异戊二烯共聚物、苯乙烯-丁二烯共聚物和苯乙烯-马来酸酯共聚物，能增加粘度指数。

- 5 消泡剂减少或预防稳定表面泡沫的形成，通常存在的量约为 0.00003%-0.05%。消泡剂的非限制性例子为聚甲基硅氧烷、聚甲基丙烯酸酯、亚烷基二硫代磷酸盐、戊基丙烯酸酯调聚物、和聚(2-乙基己基丙烯酸酯)-丙烯酸乙酯共聚物。

脱垢剂和分散剂是提供清洗功能的极性物质。脱垢剂包括金属磺酸盐、金属水杨酸盐和金属硫代磷酸酯。分散剂包括聚胺琥珀酰亚胺、羟基苄基聚胺、聚胺琥珀酸胺、聚羟基琥珀酸酯和聚胺酰胺咪唑啉。

- 10

以下实施例进一步描述了本发明，但对本发明在权利要求书所定的本发明范围无任何限制。

实施例

- 15 实施例 1-EOE 的合成：从 Aldrich(Milwaukee, WI)购得 1,3-二羟基丙酮二聚物(97%)、4-二甲基氨基吡啶(99%)、二环己基碳化二亚胺(99%)、硼氢化钠(99%)和无水四氯化碳(CCl_4)，Gold 标签。从 Edenor(Hankel Corp., Dusseldorf, Germany)购得芥酸(86%)，然后将其纯化到 95%。油酸(97%)是从 Sigma Chemical Company(St.Louis, MO)购得的。从 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)购得蒸馏过的四氢呋喃(THF)。

在第一个步骤中，合成 1,3-二芥酰基丙酮。将约 0.141mol 1,3-二羟基丙酮(12.67g, 1 当量)加入到 300ml CCl_4 中，并与 0.282mol 4-二甲基氨基吡啶(34.35g, 2 当量)和 0.296mol 芥酸(100.21g, 2.1 当量)混合。缓慢加热该混合物到 50℃，并搅拌直至所有成分均溶解。

- 25 将 63.81gDCC(0.31mol, 2.2 当量)加入到 150ml CCl_4 中，制得 1,1'-二环己基碳化二亚胺(DCC)，并用附加的漏斗逐滴加入到上述反应液中，为时 30 分钟。用 Spectra-Tech 的附带有 60° ATR 附件的 Nicolet FT-IR 5DXC 分光光度计，以 IR 光谱学监测反应。将约 1ml 反应混合液加入到 ATR 元件中得到光谱。通常将平均 10 个扫描，与先前得到的背景光谱比较。当在酯羰基区域观察到没有变化时，
- 30 认为反应完全。

用真空过滤除去沉淀的二环己基脲。在旋转蒸发仪上蒸发掉 CCl_4 后，得到棕

褐色糊状物。加入约 1L 热异丙醇，搅拌溶解此糊状物。室温除异丙醇过夜结晶，得到 1,3-二芥酰基丙酮晶体，然后过滤，用冷(-5℃)异丙醇洗涤。在真空炉中干燥产物。得率范围约为 35%-60%，通常约为 44%或 43g。

在下一步中，通过将 10g 1,3-二芥酰基丙酮溶解在 150ml THF 和 10ml 水中，并冷却到 5℃，合成 1,3-二芥酰基丙醇。添加了 1g 硼氢化钠后，如上述以 IR 光谱监测反应。30 分钟后，逐滴加入醋酸使混合液的 pH 为 7(用 pH 试纸测定)，以破坏过量的硼氢化钠。然后将约 300ml 异丙醚加到混合液中，再用 50ml 水洗涤 3 次。将混合液在硫酸镁上干燥，然后过滤掉硫酸镁。蒸发溶剂得到 1,3-二芥酰基丙醇。得率约为 90%-95%。

10 用以下流程合成终产物 EOE。将 10g 1,3-二芥酰基丙醇(0.015mol, 1.1 当量)溶解在 150ml CCl_4 中，制备 1,3-二芥酰基丙醇溶液。在 1,3-二芥醇溶液中加入约 0.015ml 油酸(4.24g, 1.1 当量)和 1.65g 4-二甲基氨基吡啶(0.014mol, 1 当量)。将 6.16g DDC(0.03mol, 1.2 当量)加入到 15ml CCl_4 中，制备 DCC 溶液，然后逐滴加入到反应液中，为时 10 分钟。用 IR 光谱学监测反应，以羟基峰的消失判断
15 反应完全。反应结束后，过滤掉沉淀的二环己基脲，蒸发溶剂。用柱层析纯化终产物。用己烷和 Davisil 646 硅胶浆液填充玻璃柱(12in×2.25in, Ace Glass)。用柱顶带有的附加漏斗，加样约 20g 产物。用己烷洗脱样品，旋转蒸发干燥。最后一步的得率约为 80%。总得率约为 35%-40%。预计可用其它各种合成和生物合成方法增加总得率。

20

实施例 2-EOE 的特性：将合成的 EOE 的熔点、结晶点、抗氧化性和粘度与 IMC-130、IMC-6Q、酱油、66H 和 81S(石油基烃类油，从 Lubrizol(Natioanl Sun Industries, Cenderlin, ND)购得)、TMPTO(Mobil)、低芥酸油菜籽(LEAR)、两节芥属、IMC/EOE、酱油/EOE、三油酰基甘油(Sigma)、EEE 和 HEAR 油比较。从 Cargill,
25 Inc 购得 IMC-130、IMC-6Q、酱油(提炼、漂白、除臭的)、LEAR 和 HEAR 油。如以上对 EOE 的描述，存在 DMAP 和 DCC 时，将三分子的芥酸酯化成一分子的甘油，制得三油酰基甘油(000)，也可从 Sigma 购得 000。表 1 列出了这些油的脂肪酸成分。IMC130/EOE 和大豆/EOE 是 50%合成的 EOE 和 50%植物油混合物。

表 1
脂肪酸成分

样品	棕榈酸酯	硬脂酸	油酸	亚油酸	α -亚油酸	arachidate	二十烷酸	behanate	芥酸
IMC-130	3.6	2.9	75	11.8	3.1				0
IMC-6Q	3.4	1.9	80-87	2-5	1-4				0
酱油	11	4	22	53	7.5	<1	<1	<0.5	
TMPTO	4	1.5	73	10	0.5				
LEAR	4	2	56	26	10		2		<2
EOE			33						66
两节芥属	3.7		20.1	11.7	5.5		4.6	1.6	52.8
IMC130/EOE	1.8	1.4	54	5.9	1.5				33
大豆/EOE	5.5	2	27.5	26.5	3.8				33
HEAR	3	1	16	14	10	1	6		49

用 Perkin Elmer 型号 7 的差异扫描量热计以差异扫描量热法(DSC)测定结晶点。将 7-12mg 样品置于盘上,密封加样到自动取样器上。将样品从初始温度 30℃加热到终温度 75℃(以 50℃/分钟的速度),并维持此温度 10 分钟,使盘中的样品融化,均匀分散。将样品冷却到-30℃(以 5℃/分钟的速度)后,平衡 15 分钟,记录-30℃到 75℃(以 5℃/分钟的速度)终 DSC 扫描。

用 18 号轴的 Brookfield 型号 DV-II 粘度计和标准方法测定-5℃到 100℃的粘度。用 Fisher Scientific 循环式水浴锅型号 910 来控制测试油的温度。用粘度指数来表示粘度与温度的比例,用 ASTM 标准方法 D2270-91 的流程 B 来计算。

按 AOCS Official Method Cd 12b92(1993 公布),用抗氧化指数装置(Omnion, Inc., Rockland, MA)测定抗氧化性。这种方法是活性氧法(AOM)流程(AOCS Official Method Cd12-57)自动化的替代。测定有和无添加的抗氧化剂时的 AOM 小时数,用 OSI 软件(按制造商的说明书)计算。所用的抗氧化剂包括 THBQ(0.1-1%)和 3%Lubrizol 产品号 OS-121056F。

如表 2、3 和 6 所示,与所有其它类型作测试的油相比,合成的 EOE 具有高抗氧化性、高粘度指数值和低温粘度等综合优势。合成的 EOE 的抗氧化性约为 84AOM 小时,粘度指数值约为 208,而植物油如酱油和 HEAR 的粘度指数值与 EOE 类似,但抗氧化性明显低于 EOE。IMC-130 油的抗氧化性和粘度指数都低于合成的 EOE。两节芥属油的抗氧化性较低(约 78AOM 小时),粘度指数也较低(约 187)。另外,两节芥属油在-5℃和 0℃时粘度分别为 1,314 和 810 厘泊,而合成的 EOE 的粘度在-5℃和 0℃时分别为 440 和 360 厘泊。

合成的 EOE 的熔点约为 6℃。植物油和合成的 EOE 的混合物的熔点低于合成的 EOE 的熔点。例如,IMC 130 油和 EOE 混合物的熔点约为 3℃。豆油和合成的 EOE 的混合物的熔点约为-2℃。这些混合物的结晶点也降低到<-30℃。而合成的 EOE 的结晶点约为-19℃。

表 2
油的性状

样 品	MP (°C)	结晶度 (°C)	VI	粘度 40°	粘度 100°	% EOE	密度
IMC-130	-5.82	<-30	188	44.4	8.95	0	0.9
IMC-6Q	-2.11	<-30	207	45.3	9.72	0	0.9
SOY	-5	-14	221	34.1	8.03	0	0.91
66H	-5.81	-17	94	90.79	10.31	0	0.86
81S	-8	-20	115	51.2	7.68	0	0.86
TMPTO	-40	-60	211	55.3	11.61	0	0.90
LEAR	---	---	224	40.7	9.36	0	0.91
EOE	6.2	-19	208	59.5	12.2	91	0.89
Crambe	6.85	-25	187	63.66	11.95	46	0.90
IMC130/ EOE	3.05	<-30	206	52.49	10.94	45	0.90
酱油/EOE	-2.3	<-30	224	37.5	8.75	45	0.90
三油精	6.22	<-30	181	50.54	9.72	0	0.91
EEE	34.9	1.32		N/A	N/A	0	
HEAR	2.72	-30	213	53.52	11.37	14	0.90

表 3
粘度数据(厘泊)

温度 °C	IMC-130	EOE	MO 高	MO 轻	Crambe	HEAR
-5	330	440	1,565	660	1,314	380
0	242	360	1,216	487	810	312
5	185	287	822	343	555	245
10	142	222	553	256	300	191
15	110	171	393	190	199	142
20	83	131	272	124	140	115
25	68	107	193	98	109	93
30	56	83	137	77	87	71
35	47	68	101	62	70	58
40	39.5	53	78	44	57	48
45	30.4	43	60	38	49	40
50	26.4	36	46	31	38	33.5
55	23.5	30	38	27	32	29
60	20.8	26	31	24	28	25
65	18.3	23	25	15	23.6	22
70	16	20	21	13	20.6	19
75	14.4	17.8	17	11	18.2	17
80	13	15.8	15	10	16.1	15.1
85	11.6	14	13	8.8	14.4	13.7
90	10.3	12.9	11.3	8.1	12.9	12.5
95	9	11.9	9.95	7.3	11.8	11.1
100	8.3	10.9	8.85	6.6	10.7	10.2

用 Penn State 微量氧化测试, 将合成的 EOE 的氧化热和催化稳定性与 IMC 130、000(Pfaltz Baver Inc., Waterbury, CT)和配制好的商品润滑油作比较。Cvitkovic, E 等人, ASLE Trans, 22:395-399(1979)。用 20 μ l 未配制的油的样品, 在 190°C进行微量氧化测试, 测试时间持续 3 小时。表 4 显示了结果。低百分比的挥发度和沉淀是理想的结果。EOE 和 IMC 130 能够得到, 而配制好的商品润滑

油则不能。另外，例如抗氧剂和抗磨剂的添加将改良 EOE。

用微型四球磨损测试(在 75℃进行, 40kg), 评定合成的 EOE、IMC130 和 000 未配制的样品以及配制好的商品润滑油的抗磨性。该测试流程包括用 10ml 矿物油样品(白油, W0) 30 分钟, 然后用 6 μ l 待测试的油 30 分钟。表 5 列出了实验结果。

- 5 将测试产生的磨痕与那些用其它植物油或植物油基润滑油产生的磨痕作比较。平均摩擦系数与其它测试物质类似。

表 4
微量氧化

样品	%挥发性	%沉淀
IMC-130	27.4	69.8
EOE	25.1	71.8
000	25.9	75
配制好的商品润滑油	18.6	60.9

10

表 5
微型四球磨损测试

样品	W0 Δ 磨痕 (mm)	样品磨痕 (mm)	Δ 磨痕 ¹ (mm)	W0 平均摩 擦系数 ²	平均摩 擦系数 ²
IMC-130	0.182	0.556	0.070	0.057	0.050
EOE	0.200	0.580	0.080	0.060	0.046
000	0.200	0.594	0.090	0.064	0.052
配制好的商品润滑油	0.194	0.564	0.070	0.57	0.052

¹ Δ 磨痕是指与 Hertz 值或先前直径(D)值相比磨痕直径(D mm)的增加。

²是指平均摩擦系数

15

如表 6 所示, 将合成的 EOE 加到 IMC 130 或豆油后, 得到的植物油组合物的氧化稳定性增加。例如, IMC130/EOE 组合物的氧化稳定性约为 87AOM 小时, 比 IMC130 油高约 38AOM 小时。

- 20 添加抗氧剂将增加合成的 EOE 的氧化稳定性。例如, 添加 3%Lubrizol 产品号 OS-121056F, 能将合成的 EOE 的氧化稳定性从 84AOM 小时增加到 230AOM 小时(表

3)。添加 0.1%和 1.0%TBHQ, 将合成的 EOE 的氧化稳定性分别增加到 274 和 563AOM 小时。相比之下, 含 0.1%和 1.0%TBHQ 时, IMC130 的氧化稳定性分别约为 182 和 345AOM 小时。

表 6
氧化稳定性(含抗氧剂)

5

样 品	AOM 小时数 (无抗氧剂)	AOM 小时 (含抗氧剂)
IMC-130	38.3	51.7
IMC-6Q	N/A	N/A
SOY	15.7	25.9
66H	500+	500+
81S	500+	500+
TMPTO	0	97.28
LEAR	N/A	N/A
EOE	83.7	230
Crambe	77.53	226.65
IMC130/EOE	87	90.71
酱油/EOE	43	60
三油精	5.67	210
EEE	N/A	N/A

实施例 3-高水平芥酸和油酸的植物: 本实施例说明通过多不饱和酸含量的降低和总单不饱和酸含量的升高, 产生一系列增加芸苔种子油酸含量的杂交体(表 7)。所用的高芥酸系是以商品名 Hero(HE101)出售的, 由 University of Manitoba 开发。表 8 列出了 HE101 的脂肪酸组分性状。Q4275 系含约 82-85%油酸, 在 fad2-f 基因序列的核苷酸 908 上含有由 G 到 A 的单个碱基转化, 在 fad2-d 基因序列的核苷酸 316 上含有由 G 到 A 的单个碱基转化。用含有连接于 fad3(亚油酸去饱和酶)基因的 napin 启动子的转基因, 用共抑制产生 663-40 系。048X058 系含有 663-40 转基因, 和因转基因(包括连接于 fad2(油酸去饱和酶)基因的脂质蛋白)引起的第二共抑制。在环境控制在 16 小时光照、23/17℃ 白天/晚上温度的生长室培养植物。

在开花前将花朵去雄，并盖住花朵以防止授粉。第二天，去雄花朵的柱头用选定的花粉供体授粉。果实成熟后收获 F1 种子。

表 7

5

杂交模式

杂交编号	雌性亲株	雌性表型	雄性亲株	雄性表型	雄性表型的来源
HEHOA	HE101	高 22:1	048X058	高 18:1/低 18:3	转基因
HEHOB	HE101	高 22:1	Q4275x663-40	高 18:1/低 18:3	突变体/转基因
HEHOC	HE101	高 22:1	Q4275x663-40	高 18:1/低 18:3	突变体/转基因

表 8

HE101 的脂肪酸成分

脂肪酸	重量(%)
C _{14:0}	0.05
C _{16:0}	3.60
C _{16:1}	0.36
C _{18:0}	1.66
C _{18:1}	14.72
C _{18:2}	10.67
C _{18:3}	9.71
C _{20:0}	1.36
C _{20:1}	9.04
C _{20:2}	0.48
C _{22:0}	1.74
C _{22:1}	45.45
C _{24:0}	0.49
C _{24:1}	0.81

用表 7 杂交产生的 F1 种子在生长室中产生 F2 种子。每种杂交分别培养 10 个种子。用袋子盖住开花的植物，以确保自花授粉。成熟后收获 F2 种子。

室温暗室中将种子在滤纸上萌发。萌发后 18-24 小时，从每个种子摘取一个子叶，用于提取脂肪酸。用气相层析法测定脂肪酸成分。表 9 和 10 列出了选定的高芥酸含量的 F2 半亲代种子。

表 9

5 从 HEHOC[HE101X(04275X663-40)] F2 种子的半亲代种子选择

样品号	脂肪酸成份(%)										
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1	C24:0	C24:1
VL10186-5	2.61	1.07	29.14	5.81	2.42	0.71	14.99	0.31	40.90	0.93	0.60
VL10186-33	3.47	1.32	29.73	4.38	2.98	0.86	12.22	0.44	41.21	1.50	1.28
VL10186-67	3.90	1.29	29.10	3.65	2.89	0.88	13.79	0.52	40.96	1.31	1.09
VL10186-74	2.76	1.25	34.04	2.63	1.45	0.75	16.64	0.38	38.67	0.14	0.95

表 10

从 HEHOC[HE101X(04275X663-40)] F2 种子的半亲代种子选择

样品号	脂肪酸成份(%)										
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1	C24:0	C24:1
VL10200-214	2.24	0.74	31.66	3.01	6.24	0.46	11.79	0.41	40.60	0.86	1.57
VL10200-231	3.89	1.03	31.51	12.50	2.41	0.54	14.17	0.29	32.23	0	0.75
VL10200-238	3.36	0.95	33.19	8.99	1.66	0.55	14.35	0.21	33.61	0.83	1.02
VL10200-267	3.12	1.02	30.18	7.61	1.52	0.59	14.53	0.19	39.41	0.24	1.013
VL10201-50	2.63	0.97	31.79	8.47	1.99	0.58	14.58	0.25	37.41	0.13	0.59
VL10200-293	2.71	0.78	32.83	6.85	1.88	0.46	13.11	0.32	39.18	0.82	0.67

10

将选定的半亲代种子置于泥土中，在生长室培养，条件如上述。开花后，用袋子盖住植物以便自花授粉。成熟后，收获 F3 自交的种子，并进行脂肪酸成分分析。用 10-15 个种子的样品作种子的分析。表 11 和 12 列出了内源性油中高含量芥酸的 F3 系。比表 11 和 12 所示的品种的含量高的品种，可用较高芥酸含量的植物品系或突变体(如 Mercury、Venus、Neptune、Hero、Bridger 或 R-500)替换自交方案中的 HE101 得到。

15

表 11

从 HEHOA[HE101X(048X052)] 的 F₃ 系的脂肪酸成分

样品号	脂肪酸成份(%)										
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1	C24:0	C24:1
HEHOA-74	2.51	1.03	27.44	3.72	3.55	0.65	13.60	0.30	45.57	0.14	1.03
HEHOA-67	2.47	0.84	20.43	7.25	3.89	0.69	10.33	0.47	52.09	0.16	0.86
HEHOA-59	2.81	1.08	27.01	7.88	2.82	0.69	16.15	0.32	39.68	0.15	0.86
HEHOA-33	2.53	0.79	21.90	9.52	3.55	0.53	11.51	0.31	47.59	0.13	1.08
HEHOA-5	2.93	1.01	23.67	10.26	2.00	0.63	14.34	0.38	42.98	0.15	1.06

5

表 12

从 HEHOA[HE101X(04275X663-40)] 的 F₃ 系的脂肪酸成分

样品号	脂肪酸成份(%)										
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1	C24:0	C24:1
HEHOC-214	2.47	1.12	31.15	3.77	3.84	0.77	13.78	0.43	41.15	0.17	0.97
HEHOC-267	2.62	1.42	31.64	6.44	1.30	0.84	15.64	0.39	38.15	0.16	0.95
HEHOC-293	2.73	1.13	32.08	7.23	2.18	0.72	14.88	0.41	37.17	0.17	0.81
HEHOC-238	2.90	1.05	35.20	9.37	1.76	0.66	14.88	0.38	32.05	0.1	1.01
HEHOC(2)-50	2.60	0.93	31.16	5.66	2.09	0.61	14.93	0.31	40.30	0.11	0.88
HEHOC(2)-156	3.19	1.71	46.56	3.05	1.59	0.94	16.41	0.40	24.67	0.19	0.83

培养选定的 HEHOC-214F₃ 种子，在条件如上述控制的生长室中生长。开花后，收获 F₄ 自花授粉的种子，用 10-15 个种子分析脂肪酸成分。表 13 列出了选定的 F₄ 系的脂肪酸成分。样品 2 和 3 的芥酸含量约为 45%以上，油酸含量约为 22%以上。样品 1 的油酸含量约为 35%，芥酸含量约为 37%，多不饱和物含量约为 4.4%。影响脂肪酸成分的基因在 F₄ 物质中依旧是分离的。在其后代选择将固定遗传组成，得到 EOE 含量为 50%或以上的品系。

表 13

HEHOC214[HE101X(Q4275X663-40)]的 F4 系的脂肪酸成分

样品 编号	脂肪酸成份 (%)											
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1	C24:0	C24:1	Total Sats
1	1.91	1.33	35.9	3.17	1.21	0.97	16.57	0.52	37.1	0.23	0.76	4.9
2	1.86	0.87	24.26	8.49	1.01	0.7	12.41	0.4	48.56	0.18	0.90	4.0
3	1.94	0.83	26.67	8.31	1.02	0.64	14.17	0.34	44.71	0.14	0.82	3.9

实施例 4

- 5 将表 11 品系的种子植到两个苗圃中，自由授粉。从每个苗圃的自由授粉植株的种子中提取大量油样品。将含脂肪酸的油样品(表 14)提炼和漂白(高芥酸-1)提炼、漂白和除臭(高芥酸-2)。第一批油样品(高芥酸-1)的总饱和脂肪酸含量为 5.55%，总单未饱和脂肪酸含量为 85.23%，总聚未饱和脂肪酸含量为 6.80%。第二批油样品(高芥酸-2)的总饱和脂肪酸含量为 5.22%，总单未饱和脂肪酸含量为 82.90%，总聚未饱和脂肪酸含量为 9.56%。高芥酸-1 和-2 油的碘值分别为 79 和 81.7。未除臭的高芥酸-1 油样品含 420ppm 生育酚。高芥酸-2 油样品含 280ppm 生育酚。

表 14

高芥酸和油酸油菜籽的脂肪酸成分

样品编号	脂肪酸成份(%)								
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1
高芥酸 1	2.45	1.50	31.50	3.68	2.45	0.90	13.20	0.39	39.3
高芥酸 2	2.55	1.30	29.70	6.35	2.46	0.76	12.50	0.36	39.50

- 高芥酸-1 和-2 油样品的平均抗氧性分别为 70AOM 小时(n=2, 69 和 71AOM 小时)和 49.5AOM 小时(n=2, 48 和 51AOM 小时)。表 15 列出了用 DSC 测定的这些油的特性。将这些样品从初始温度(20℃，保持 1 分钟)降低到-30℃(以 50℃/分钟)。保持样品为-30℃10 分钟，然后以 5℃/分钟加热到 75℃，得到熔化曲线。保持样品 75℃10 分钟，然后冷却到-30℃(以 5℃/分钟)得到冷却曲线。

表 15
高芥酸油菜籽油的特性

样品	MP(°C)	结晶点	$\Delta H(j/g)$
高芥酸 1	3.2	-24	88.5
高芥酸 2	2.2	-27	92.6

以高压液相层析测定这些油的 TAG 特性, 用孔径为 $3\mu m$ 的 Spherisorb ODS-2 柱($150 \times 4.6mm$), $35^\circ C$ 以 2.2barr 压力进行。将样品(50mg)溶解在 5ml 氯化乙烯中, 用 70: 30 梯度的乙腈(ACN):二氯甲烷洗脱, 30 分钟后变为 30:70 二氯甲烷: ACN。使用蒸发光散射探测器(ELSD)Sedex55。表 16 列出了高芥酸品系 1 和 2 的 TAG 特性。表 15 中“O”是指油酸, C18: 1; “L”是指亚油酸, C18: 2; “Ln”是指亚麻酸, C18: 3; “P”是指棕榈酸, C16: 0; “S”是指硬脂酸, C18: 0; “A”是指花生酸, C20: 0; “G”是指二十酸, C20: 1; “E”是指芥酸, C22: 1; 和
10 “N”是指神经酸, C24: 1。

表 16
TAG 特性

TAG	高芥酸系 1(%)	高芥酸系 2(%)
OLO-OLnG	0.41	0.57
OLnE-OLG-000	0.70	1.22
P00	0.86	1.37
GLE-OLE	2.10	3.95
00G	1.89	2.48
ELnE-GLE	4.60	6.25
OOE	9.52	10.82
POE	3.00	3.02
ELE	2.29	6.47
GOE	26.54	22.03
SOE	1.59	shoulder
EOE	45.00	38.88
AOE	0.62	0.49
EON	0.40	0.22

实施例 5

如 W098/56239 所述, 用 MNNG 诱变油菜的种子。如 W098/56239 所述培养处理过的种子, 在 M3 后代进行硬脂酸或棕榈酸含量降低的种子的筛选。将这两个选定的品系命名为 ZW1441(降低的棕榈酸)和 Y30137(降低的硬脂酸), 并与 HE101 杂交。选出棕榈酸含量降低、芥酸含量升高的 ZW1441HE101 后代产的种子。表 17 列出了代表性 F_4 后代种子的脂肪酸成分。结果显示: 实现了总饱和含量小于 4%(如约 2.0-4.0%)和芥酸含量升高的种子。这些结果表明将决定低总饱和含量的基因引入品系(如实施例 4 中所述的那些品系), 能够进一步增加上述品系的 EOE 含量。

表 17

10

自交 F_4 品系的脂肪酸成分

样品编号	脂肪酸成份(%)								
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1
ZW1441	2.73	1.74	73.46	11.46	7.52	0.67	1.47	0.34	0
ZW1441 x HE101									
1	1.99	0.97	14.89	10.66	6.77	0.97	8.57	0.78	52.4
2	2.15	0.90	14.89	12.09	7.01	0.80	8.84	0.58	50.7
3	2.18	1.02	13.86	11.24	6.64	0.97	8.89	0.65	52.33
Y30137	3.44	1.14	78.08	7.41	6.23	0.71	1.70	0.46	0.04
HE101 x Y30137									
1	2.26	0.77	17.17	9.31	6.32	0.69	10.44	0.50	50.99
2	1.99	0.75	26.42	8.48	7.47	0.58	12.97	0.39	39.5
3	1.99	0.79	24.62	5.22	6.32	0.64	13.84	0.35	44.86

其它实施例

易于理解已用详述实施例联合描述了的本发明, 上述描述仅起说明作用, 对本发明的范围无任何限制作用, 本发明的范围由权利要求书限制。本发明的其它方面、优点和改进都在权利要求书的范围之内。

15

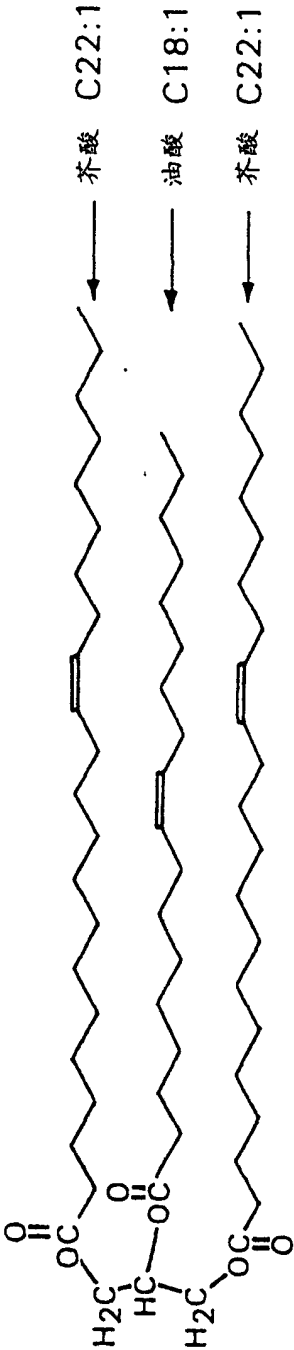


图 1