

**Olievorming en oliekwaliteit
bij koolzaad
een literatuurstudie**

J. Jaarsma

**CABO-verslag nr. 105
1989**

ISBN 269 459

Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek
Postbus 14, 6700 AA Wageningen

Inhoudsopgave

	Blz.
Samenvatting	1
Summary	3
1 Inleiding	5
1.1 Het gewas koolzaad	5
1.2 Bemesting van koolzaad	6
1.3 De ontwikkeling van het zaad	7
1.4 Verwerking	8
2 Kwaliteit en samenstelling van de olie	10
2.1 Oliesamenstelling bij verschillende oliegewassen	10
2.2 Oliesamenstelling en kwaliteitseisen bij koolzaad	10
2.3 Beïnvloeding van de oliesamenstelling door externe factoren	12
2.4 Oliesamenstelling gedurende de ontwikkeling van het zaad	13
3 Vetzuur en lipidebiosynthese	15
3.1 Algemeen	15
3.2 Prokariote en eukariote route voor glycerolipidesynthese	15
3.3 De rol van chloroplasten in het zaad van koolzaad	17
3.3.1 De rol van chloroplasten bij de zaadvulling	17
3.3.2 Betrokkenheid van de chloroplast bij de vorming van linoleenzuur	17
3.3.3 Zuurstofvoorziening in het zaad	19
3.3.4 Synthese van vetzuren in het zaad	20
4 Meervoudig onverzadigde vetzuren	22
4.1 16:3 en 18:3 planten	22
4.2 Vorming van meervoudig onverzadigde vetzuren buiten de plastiden	23
4.3 Een alternatieve route voor de synthese van linoleenzuur	26
4.4 De vorming van meervoudig onverzadigde vetzuren bij enkele Cruciferen	27
4.5 De rol van chloroplasten bij de vorming van meervoudig onverzadigde vetzuren	28
4.6 Veredeling en vererving van linol- en linoleenzuurgehalten	29

5	Zeer langketenige vetzuren	32
5.1	Vererving van erucazuur	32
5.2	Consequenties van het wegvallen van de erucazuursynthese	35
5.3	De biosynthese van erucazuur	35
5.4	Mogelijk een tweede locatie voor de oliezuursynthese	36
5.5	Enkele hypothesen over vorming van erucazuurrijke triacylglycerolen	36
6	Conclusies	38
	LITERATUUR	40

Figuren en tabellen	Blz.
Figuur 1: Vetzuursamenstelling in oliën van de vijf basistypen oliezaadproducerende gewassen. Naar Thies 1968.	11
Figuur 2: Effect van de temperatuur op oliesamenstelling van een klassiek koolzaadras. Naar Calvin 1965.	14
Figuur 3: De belangrijkste routes voor vetzuur-biosynthese in de plantecel. Naar Harwood 1988.	16
Figuur 4: Biosynthese van triacylglycerolen in oliehoudende zaden.	18
Figuur 5: Een schematische weergave van de desaturatie van C18 vetzuren, zoals deze wordt verondersteld plaats te vinden in de microsomale fractie van oliehoudende zaden. Naar Roughan 1982.	24
Figuur 6: Homozygoot verervende niveaus voor eicoseenzuur en erucazuur in koolzaad. Naar Jönsson 1977.	33
Tabel 1: De samenstelling van membraanlipiden uit blad van koolzaad opgekweekt bij 25 °C (boven) en bij 15 °C (onder). Naar Appelqvist 1971.	25

Samenvatting

Winterkoolzaad is het belangrijkste oliegewas in Nederland. Opbrengsten van dit gewas liggen rond 3,5 t/ha. De ontwikkeling van het zaad kent drie stadia: houwvorming, zaadvulling en afrijping. De houwvormingsfase is van groot belang voor de opbrengst omdat tijdens deze fase het aantal hauen per plant en het aantal zaden per houw worden vastgelegd.

Tijdens de zaadvulling vindt de vorming van olie en reserve-eiwit plaats. De synthese van palmitinezuur en oliezuur vindt waarschijnlijk plaats in chloroplasten in het zaad. De overige in de olie aanwezige vetzuren worden gevormd door modificatie van palmitinezuur en oliezuur. Het is nog onduidelijk in hoeverre de plastiden bij dergelijke modificaties betrokken zijn. De chloroplasten in het zaad van koolzaad zijn niet in kwantitatieve zin bij de zaadvulling betrokken. De voor de zaadvulling benodigde assimilaten worden geïmporteerd vanuit blad, stengel en hauen.

De triacylglycerolen waaruit koolzaadolie is opgebouwd worden waarschijnlijk gevormd in het cytoplasma. Gedurende de zaadvulling accumuleert de olie in oleosomen in de cellen van de cotylen van het embryo.

De kwaliteitseisen voor koolzaadolie zijn sterk afhankelijk van het doel waar de olie voor gebruikt wordt. Voor gebruik in de voedingsindustrie is een olie gewenst zonder erucazuur, met een linolzuurgehalte van 60 % of meer en een linoleenzuurgehalte van minder dan 2 %. Vanuit de chemische industrie is er een stijgende belangstelling voor een olie met een zo hoog mogelijk gehalte aan erucazuur.

De koolzaadolie die momenteel in Nederland geproduceerd wordt heeft een erucazuurgehalte van minder dan 2 %, een linolzuurgehalte van 15-25 % en een linoleenzuurgehalte van 10-15 %. Op grond van het gehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren in diverse soorten in het geslacht *Brassica* en op grond van enkele recente veredelingsresultaten bij zomerkoolzaadrassen, lijkt een linolzuurgehalte van 45 % in combinatie met een linoleenzuurgehalte van minder dan 5 % haalbaar. Er is nog te weinig duidelijkheid in de biosyntheseroutes van linol- en linoleenzuur om uitspraken te doen over de haalbaarheid van nog hogere gehalten aan meervoudig onverzadigde vetzuren.

Voor het gehalte aan erucazuur in koolzaadolie is er een duidelijke grens, van 66 %. De oorzaak is dat de 2-positie in de triacylglycerolen hoofdzakelijk wordt bezet door C18-vetzuren. De 2-positie speelt waarschijnlijk een belangrijke rol bij de desaturatie van oliezuur tot linolzuur en linoleenzuur.

De samenstelling van de olie in koolzaad wordt nauwelijks beïnvloed door externe factoren zoals bemesting, vochtvoorziening of daglengte. Er lijkt dan ook weinig perspectief te zitten in teeltmaatregelen met betrekking tot oliekwaliteit.

Een externe factor die wel invloed heeft op de oliesamenstelling, in het bijzonder bij rassen met een hoog erucazuurgehalte, is temperatuur. Bij erucazuurrijke rassen beïnvloedt de temperatuur sterk de verhouding van erucazuur ten opzichte van de directe precursors van dit vetzuur: oliezuur en eicoseenzuur. Bij een temperatuur van 15 °C gedurende ontwikkeling van het zaad bereikt het gehalte van erucazuur een optimum.

Summary

Winter rape is the most important oilseed in the Netherlands. The yield of this crop is approximately 3.5 t/ha. Three phases can be distinguished in the seed development of rape:

- (1) a phase of rapid silique growth;
- (2) seed filling;
- (3) maturing.

The first phase is important in yield formation. During this phase, the number of siliques per plant, and the number of seeds per silique are determined.

The synthesis of seed oil, and seed protein occurs during the second and the beginning of the third phase of seed development. The synthesis of palmitic- and oleic acid probably takes place in seed chloroplasts. Other fatty acids which are found in rapeseed oil are formed by modification of palmitic- and oleic acid. It is still unclear whether and how plastids are involved in such modifications. The seed chloroplasts are not involved in seed filling in a quantitative sense. The assimilates needed for seed filling are imported from leaves, stems and siliques.

Seed oil mainly consists of triacylglycerols. In rapeseed, triacylglycerols are formed in the cytoplasm of cells from the developing cotyledons. The oil accumulates in special oil bodies, called oleosomes.

Quality demands for rapeseed oil strongly depend on its use. For food purposes an oil with high linoleic- and low linolenic acid contents is required. In industry however there is an increasing demand for high erucic acid oils.

Rapeseed oil currently produced in most countries of the EC, has an erucic acid level of less than 2 %, a linoleic acid contents of approximately 20 %, and a linolenic contents of about 10 %. From the level of polyunsaturated fatty acid in most *Brassica* species, and from recent breeding results, a linoleic acid level of 45 % and linolenic acid level of less than 5 % seems feasible.

The erucic acid level of rape seed oil is (for the moment) limited to approximately 66 %. This is due to the fact that in most cases the position 2 of the glycerol backbone in triacylglycerols, is occupied by C18 fatty acids. The 2 position probably plays a major role in the desaturation of C18 fatty acids.

Oil composition in rapeseed is hardly influenced by external factors like: day length; the use of fertilizers; the amount of water per plant.

A factor that does influence oil composition is temperature. In "high erucic acid" rape the effect is more pronounced than in "low erucic acid" rape, since temperature strongly influences the ratio of erucic acid to its precursors oleic- and eicosenoic acid. At a temperature of 15 °C during seed development, the erucic acid level reaches an optimum.

1 Inleiding

1.1 Het gewas koolzaad

Het belangrijkste oliegewas in Nederland is koolzaad (*Brassica napus*). Op wereldschaal komen koolzaadachtige gewassen als plantaardige oliebron op de vijfde plaats. In Europa wordt hoofdzakelijk *B. napus* (koolzaad) en *B. campestris* (raapzaad) verbouwd.

Er bestaan van koolzaad zogenaamde zomertypen en wintertypen. In Nederland wordt hoofdzakelijk winterkoolzaad verbouwd. Winterkoolzaad wordt in het vroege najaar (augustus, begin september) gezaaid en vroeg in de zomer geoogst. De plantjes overwinteren als bladrozet. Met winterkoolzaad worden opbrengsten gehaald tussen 2,5 en 3,5 ton zaad/ha. De zaaidatum is voor dit gewas van groot belang. Wordt er te vroeg gezaaid, dan treedt er voor de winter enige strekking op van de planten. Een te late zaai leidt tot plantjes met een drooggewicht beneden de 2 gram. Beide gevallen leiden tot een verminderde winterhardheid. Voor de opbrengst hoeft dit geen directe gevolgen te hebben, koolzaad heeft als gewas een groot compensatievermogen, bij sterke uitwintering treedt er een sterke uitgroei van zijassen bij de resterende planten op. Plantdichtheden van 40 tot 120/m² leveren zodoende een gelijke zaadopbrengst (Vreeke, 1987).

Zomerkoolzaad wordt zo vroeg mogelijk in het voorjaar gezaaid en in de nazomer van hetzelfde jaar geoogst. De opbrengsten van dit gewas liggen rond de 2 ton zaad/ha. Bij zomerkoolzaad ontbreekt het ruststadium als bladrozet, er is bovendien geen vernalisatie nodig. Ook qua oliesamenstelling zijn er kleine verschillen tussen zomer- en winterkoolzaadrassen. Bij de klassieke rassen, dat wil zeggen rassen met een hoog erucazuurgehalte, bevatten de zomertypen vaak rond 10 % minder erucazuur dan de wintertypen (Appelqvist, 1970; Van Hee, 1975).

Voor koolzaad worden in Europa grofweg twee plantstrategieën gebruikt; in Duitsland en Frankrijk wordt koolzaad precisie-gezaaid op een grondig voorbereekt zaaibed met rijafstanden van ongeveer 40 cm. Er wordt 2-5 kg zaad/ha gezaaid. Dit levert een uniform gewas, dat goed bestand is tegen uitwintering. Een nadeel is de hoge energie-investering. In Engeland en ook in Nederland wordt minder energie geïnvesteerd in het zaaibed en de zaai-techniek. Er wordt 5-9 kg zaad/ha gezaaid, met kleinere rijafstanden. Deze aanpak levert een gewas van 50 tot 80 planten/m² na uitwintering. De nadelen van deze methode zijn een minder uniform gewas, hogere percentages uitwintering en grotere ziektekansen (Daniels et al., 1986).

1.2 Bemesting van koolzaad

Stikstofbemesting leidt tot een daling van het oliegehalte in het zaad ten gunste van een stijging van het eiwitgehalte. Deze daling van de verhouding wordt ruimschoots gecompenseerd door de opbrengsttoename per hectare (Allen & Morgan, 1972; Weiss, 1983). Stikstof heeft weinig effect op de kwalitatieve samenstelling van de olie (Appelqvist, 1968). Er zijn enige aanwijzingen, dat stikstofgift bij laag erucazuur cultivars de verhouding C18/C22-vetzuren enigszins verhoogt (Forster, 1977; Weiss, 1983; Nordestgaard et al., 1984).

Winterkoolzaad wordt op twee tijdstippen bemest, in de herfst en in het voorjaar. De voorjaarsgift is zeer belangrijk, omdat deze de snelle hergroei van het gewas na de winter stimuleert. Het positieve effect van deze gift is in ieder geval het grootst wanneer deze tenminste voor een deel aan het begin van de hergroei wordt gegeven. Spreiding van de voorjaarsgift heeft verder weinig effect (Van Roon, 1959; Bernelot Moens, 1975).

De herfstgift is een wat omstreden begrip. Bij een optimale bemesting, dat is tussen 200 en 240 kg stikstof/ha. kan men de herfstgift volledig in mindering brengen op de voorjaarsgift. Een herfstgift kan zelfs aanleiding geven tot problemen, een vroege herfstgift in een dicht gewas kan enige strekking van de planten tot gevolg hebben, dit leidt tot een verminderde winterhardheid. Over het algemeen leidt een herfstgift tot de vorming van wat steviger plantjes voor de winter. Zo kan schade aan het gewas door bijvoorbeeld een extreem droog voorjaar beperkt blijven (Vreeke, 1987). Een herfstgift is in eerste instantie een maatregel die de oogstzekerheid vergroot.

Stikstofbemesting leidt vooral tot een sterke toename van de hoeveelheid blad voor de bloei en tot grotere planten. Het opbrengsteffect is gelegen in de vorming van meer hawen per plant en meer zaden per haw (Allen & Morgan, 1972). Het 1000-korrelgewicht (bij koolzaad meestal 4-6,5 g) blijft gemiddeld constant (Vreeke, 1987; Brune et al., 1987). Bij bemeste planten is de bladfotosynthese op oppervlaktebasis kleiner dan bij onbemeste planten (Allen & Morgan, 1972).

Vanaf het begin van de bloei begint het bladoppervlak af te nemen en stagneert de opname van stikstof uit de bodem (Vreeke, 1987). Er is tegelijkertijd sprake van een sterke opname van stikstof door de hawen (Diepenbrock & Geisler, 1979). Mogelijk hangt de afname van het bladoppervlak dus samen met stikstoftranslocatie naar de hawen. Mogelijk speelt

bij de afname van het bladoppervlak ook de verandering van lichtkwaliteit veroorzaakt door de petalen een rol (Daniels et al., 1986). In Australië zijn sinds kort petaallose rassen beschikbaar, maar effecten op het bladoppervlak zijn nog niet onderzocht.

Voor bemesting met fosfaat en kalium geldt, dat er aan een basisbehoefte moet worden voldaan, daarboven leveren ze geen positief effect meer op (Weiss, 1983). Bij een normale fosfaat en kalitoestand van de grond komt dit neer op een gift van 30-75 kg/ha P_2O_5 (of vergelijkbare hoeveelheid van een andere fosfaatbron) en 40-80 kg/ha K_2O (Bernelot Moens & Wolfert, 1975). De effecten op de oliesamenstelling zijn zeer gering (Appelqvist, 1968). Kalium is nodig voor een goede fosfaatopname (Weiss, 1983).

Ook voor zwavelbemesting geldt, dat er voldaan moet worden aan een minimumbehoefte. Gebeurt dit niet dan komt het gewas niet in bloei (Nuttall et al., 1987). Zwavelbemesting leidt tot een hoger eiwitgehalte en een hoger glucosinolaatgehalte in het zaad (Nuttall et al., 1987). Er is geen duidelijk effect op de oliesamenstelling (Appelqvist, 1968).

1.3 De ontwikkeling van het zaad

De ontwikkeling van de hauwen en zaden bij koolzaad is grofweg in drie fasen te verdelen: een hauwvormingsfase, een zaadvullingsfase en een afrijpingsfase (Norton & Harris, 1975; Diepenbrock & Geisler, 1979). Gedurende de eerste fase treedt er een snelle groei van de hauwen op, terwijl de zaadvulling traag verloopt. In het zaad is het meeste drooggewicht aanwezig in de testa en de aleuronlaag, tot twee weken na bloei is het embryo nog nauwelijks waarneembaar (Fowler & Downey, 1970). Tijdens deze beginfase is er in het hauwweefsel vooral sprake van ophoping van wateroplosbare stoffen en eiwit (Norton & Harris, 1975; Diepenbrock & Geisler, 1979). Het wateroplosbare materiaal bestaat voor meer dan 50 % uit suikers vooral glucose, fructose en daarnaast ook sacharose. Ook in het zaad vormen glucose en fructose de hoofdcomponenten. Aan het begin van de tweede ontwikkelingsfase daalt in het zaad het gehalte aan glucose en fructose sterk (Norton & Harris 1975). Daarnaast komen achtereenvolgens de oliesynthese en de eiwitsynthese in het zaad op gang. De gevormde olie wordt geaccumuleerd in speciale olielichaampjes, ook wel oleosomen genaamd (Thies, 1970; Gurr et al., 1974; Röbbelen & Thies 1980).

De synthese-activiteit in het zaad gaat gepaard met een daling van het eiwit en stikstofgehalte in de hauw. Het stikstofgehalte in de hauw is negatief gecorreleerd met de eiwitsynthese in het zaad (Diepenbrock &

Geisler, 1978). Het sacharosegehalte stijgt in deze fase in het zaad tot een maximum en zakt daarna terug tot een constant niveau. Ook het chlorofylgehalte bereikt gedurende deze periode een maximum (Rakow & McGregor, 1975; Norton & Harris, 1975; Nitsch, 1976). In de derde periode stagneert de droge stof-toename in het zaad. De chloroplasten in de houw verouderen, dit gaat gepaard met een daling van het gehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren in de houw en stijging van het gehalte aan palmitinezuur. Ook in het zaad zijn de chloroplasten nu verdwenen (Norton & Harris, 1975; Rakow & McGregor, 1975; Nitsch, 1976; Diepenbrock, 1983; 1984). Een opmerkelijk verschijnsel is dat gedurende deze afrijpingsfase pas de synthese van het meest voorkomende eiwit uit de membranen van de olielichaampjes op gang komt (Murphy et al., 1989). Dit zogenaamde fytolëin heeft een apolipoproteïne achtige structuur.

De drie bovenbeschreven fasen hebben bij zomer en winterkoolzaad verschillende lengtes. Voor fase 1 is dit bij zomerkoolzaad 2 tot 3 weken (na bloei) en voor winterkoolzaad 4 weken. Fase 2 duurt bij zomerkoolzaad van ongeveer 2 tot 3 weken na bloei tot ongeveer 5 weken na bloei, bij winterkoolzaad van 4 tot 5 weken na bloei tot ongeveer 8 weken na bloei. Een opvallend verschijnsel is dat tijdens de eerste ontwikkelingsfase abortie optreedt van een aantal zaden per houw. Aan het einde van deze fase neemt ook het aantal houwen per plant niet verder toe (Norton & Harris, 1975).

1.4 Verwerking

Het hoofdprodukt uit koolzaad is de olie. De winning hiervan bestaat grofweg uit 4 stappen. Eerst wordt het zaad uitgeperst tot een restoliegehalte van ongeveer 18 %. Daarna wordt het schroot geëxtraheerd met technisch hexaan tot een restoliegehalte van ongeveer 2 %. De olie heeft een slijmerig karakter vanwege de hierin aanwezige fosfolipiden (bij sojaolie ongeveer 0,08 % van de olie; zie Nash & Frankel, 1986). Voor de "ontslijming" wordt er gebruik gemaakt van het zelfraffinerend vermogen van de olie (Rynja, 1987). Na extractie wordt er aan de olie 1 tot 1,5 % water toegevoegd, dit geeft aanleiding tot micelvorming door de fosfolipiden. Naast fosfolipiden worden allerlei polaire ongerechtigheden in de micellen ingesloten. Door de micellen af te centrifugeren houdt men een ontslijmde olie over (Teasdale & Mag, 1983; Rynja, 1987). Er wordt gewerkt aan verbetering van het ontslijmingsproces. Door het zaad voor de extractie te verhitten (pretoasting) kunnen fosfolipases worden uitgeschakeld, de originele fosfolipidesamenstelling blijft hierdoor beter bewaard. Hierdoor verloopt ook de

ontslijming van de olie veel beter. Er wordt ook gezocht naar mogelijkheden om het ontslijmen overbodig te maken. Het gebruik van technisch hexaan is er al op gericht om zo min mogelijk fosfolipiden te extraheren. Mogelijk zal men in de toekomst gebruik gaan maken van extractie in supercritische CO₂, waarbij het fosfolipidegehalte van de geëxtraheerde olie lager ligt dan bij de ontslijmde olie van nu (Fattori et al., 1987).

De laatste processtap is de fysische raffinage van de olie. Hierbij wordt de olie gebleekt en verder gezuiverd door middel van stoomdestillatie. Bij de verwerking van koolzaad ontstaan twee bijprodukten; het eiwitrijke koolzaadschroot, dat vooral in de veevoederindustrie gebruikt wordt, en ruw lecithine.

2 Kwaliteit en samenstelling van de olie

2.1 Oliesamenstelling bij verschillende oliegewassen

Gewassen die verbouwd worden voor de produktie van oliehoudende zaden deelt men grofweg in 5 typen (zie Figuur 1). Het meest complexe type is het *Brassicatype* waartoe ook het klassieke koolzaad behoort. Bij dit type treedt bij de vetzuursynthese zowel ketenverlenging als onverzadiging op vanuit oliezuur (18:1). De hoofdcomponent in de olie is erucazuur (22:1).

Bij het *Linumtype* vindt bij de vetzuursynthese onverzadiging plaats vanuit oliezuur tot linoleenzuur. Er is geen sprake van ketenverlenging. Tot deze groep behoren lijnzaad en soja.

Bij zonnebloem, maïs, maanzaad, katoen, saffloer (*Carthamus tinctorius*) en bij enkele recente lijnzaadcultivars vinden we het zogenaamde *Carthamustype*. Hier treedt vooral onverzadiging op vanuit oliezuur tot linolzuur (18:2). Het linolzuur-desaturasesysteem is bij dit type weggeval-
len.

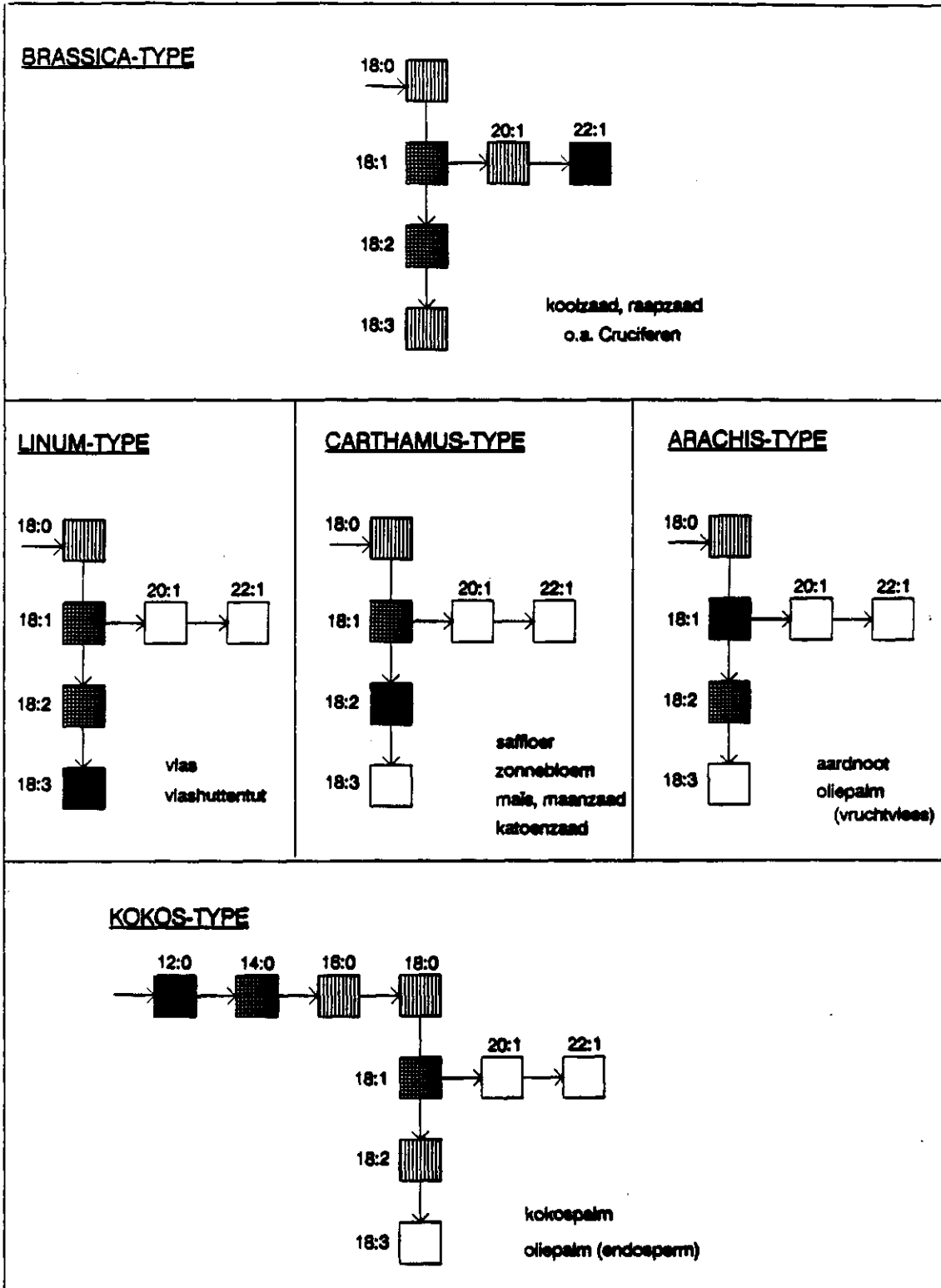
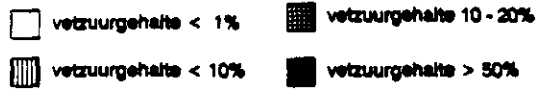
Het *Arachistype*, dat we vinden bij onder andere de pinda, is gestoord in het oliezuur-desaturasesysteem, de hoofdcomponent in de olie is oliezuur.

Het *Cocostype* vinden we bij enkele palmsoorten, hier vindt in verminderde mate ketenverlenging tot C18 in de olie plaats. De hoofdcomponent in deze oliën is laurinezuur (C12:0) (Thies, 1968; Figuur 1).

De olie van erucazuur-arme rassen ligt qua samenstelling in tussen het *Arachistype* en tussen het *Linumtype*, oliezuur is de hoofdcomponent en zowel linolzuur als linoleenzuur kunnen in gehalten boven de 10 % voorkomen.

2.2 Oliesamenstelling en kwaliteitseisen bij koolzaad

Klassieke koolzaadrassen leveren een olie met een hoog erucazuurgehalte (25-55 %). Dit vetzuur is een geschikte industriële grondstof, die gebruikt kan worden voor de bereiding van onder andere boenwassen, schoensmeer, smeerolie, plasticweekmakers enzovoorts. Het kan ook gebruikt worden voor de winning van enkele andere vetzuren, zoals pelargonzuur (C9:0) en brassicazuur (C13:0), die in de nylonindustrie kunnen worden gebruikt. Uit brassicazuur kan men waarschijnlijk ook laurinezuur (C12:0) synthetiseren, dit is een vetzuur waar in Europa een structureel tekort aan bestaat (Vertregt mondeling).



Figuur 1: Vetzuursamenstelling in oliën van de vijf basistypen oliezaadproducerende gewassen. Naar Thies 1968.

In Europa richt de produktie van koolzaadolie zich hoofdzakelijk op de voedingsmiddelenindustrie. Erucazuur leidt tot vetaanzet in hartspierweefsel en is daarmee ongeschikt voor gebruik in voedingsmiddelen (Corner, 1983). In Canada is men er in de jaren zestig in geslaagd, uit het zomerkoolzaadras Liho, erucazuur-arme lijnen te veredelen. De eerste erucazuur-arme rassen kwamen ongeveer tien jaar later op de markt. Inkruising van het erucazuur-arme zomerkoolzaadras Oro met Europese winterkoolzaadrassen heeft geleid tot een aantal succesvolle erucazuur-arme rassen, waaronder bijvoorbeeld Jet Neuf (Van Hee, 1975 & 1981). Deze rassen bevatten minder dan 2 % erucazuur. Met het wegvallen van erucazuur is vooral het gehalte van oliezuur sterk toegenomen. De olie bevat ongeveer 20 % linolzuur, hetgeen laag is in verhouding tot bijvoorbeeld sojaolie of zonnebloemolie. Een hoger linolzuurgehalte is in koolzaadolie gewenst, omdat dit vetzuur gewenst is in de menselijke voeding. Het linoleenzuurgehalte in de koolzaadolie is ongeveer 10 %, dit vetzuur is gevoelig voor oxydatie. Een linoleenzuurgehalte van 2 % of nog lager is daarom noodzakelijk, zowel bij toepassing in de industrie als bij toepassing in voedingsmiddelen.

Gebruik van koolzaadolie in de voedingsmiddelenindustrie, vereist een hoog linolzuurgehalte en een laag linoleenzuurgehalte. Het is dus van belang te weten in hoeverre men het gehalte van linolzuur ten opzichte van en ten koste van linoleenzuur kan laten stijgen. Voor industriële toepassing is het vooral van belang een olie te produceren met een zo hoog mogelijk gehalte aan nuttige vetzuren zoals erucazuur of oliezuur. Uitspraken over de haalbaarheid van deze kwaliteitseisen zijn alleen mogelijk bij een voldoende inzicht in de olie- en de vetzuursynthese, en in de mogelijkheden beide te beïnvloeden.

2.3 Beïnvloeding van de oliesamenstelling door externe factoren

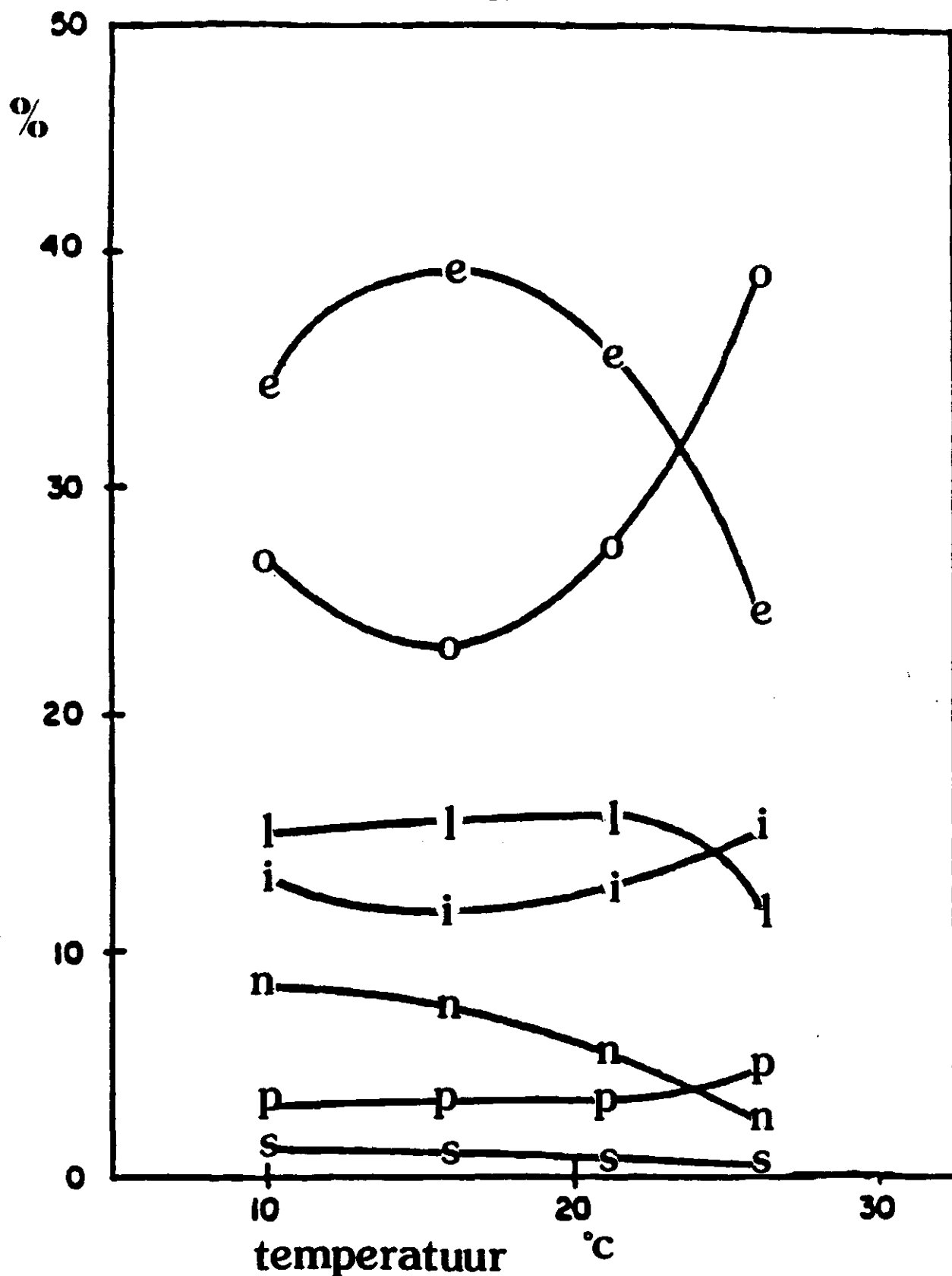
De kwaliteit (samenstelling) van koolzaadolie wordt slechts in geringe mate beïnvloed door teeltmaatregelen zoals bemesting of irrigatie (Weiss, 1983). Ook daglengte en locatie van de hawen aan de plant hebben slechts een geringe invloed op de oliesamenstelling (Bechyne & Kondra, 1970; Diepenbrock en Geisler, 1979; Pleines et al., 1987; Pleines, 1988). Deze factoren hebben meestal wel invloed op de olieopbrengst. Temperatuur heeft zowel een duidelijk effect op de opbrengst als ook op de samenstelling van de olie. Bij klassieke rassen zien we dat het erucazuurgehalte van de olie rond 15 °C een optimum bereikt. Temperaturen hoger dan 15 °C leiden bij deze rassen tot een stijging van oliezuur en eicoseenzuur ten opzichte van de

overige vetzuren. Deze twee vetzuren zijn "precursors" van erucazuur (Canvin, 1965; zie Figuur 2). Bij rassen met een laag erucazuurgehalte is het temperatuureffect geringer dan bij de klassieke rassen. Dit ligt voor de hand omdat bij klassieke rassen vooral de biosynthese van erucazuur door de temperatuur wordt beïnvloed. Bij erucazuur-arme rassen is er bij hogere temperaturen juist sprake van een daling van het oliezuurgehalte ten opzichte van meervoudig onverzadigde vetzuren (Appelqvist, 1968; Pleines et al., 1987). Bij koolzaad leiden hogere temperaturen tot een daling van de opbrengst (Canvin, 1965).

2.4 Oliesamenstelling gedurende de ontwikkeling van het zaad

De ontwikkelingsfasen van het zaad zijn ook herkenbaar in de oliesamenstelling. Gedurende de houwvormingsfase vormen linol- en linoleenzuur en de onverzadigde vetzuren palmitinezuur en stearinezuur de belangrijkste vetzuren in de zaadlipiden. Vanaf het begin van de tweede ontwikkelingsfase, de zaadvulling, is er een sterke stijging in het absolute gehalte per zaad van alle vetzuren. Bij klassieke koolzaadrassen en verwanten van koolzaad, verschijnen nu voor het eerst de vetzuren eicoseenzuur en erucazuur in het zaad (Fowler & Downey, 1970; Mc Killican, 1966; Norton & Harris, 1975; Gurr et al., 1972). Ook in het houwweefsel is er sprake van enige erucazuursynthese. Dit is mogelijk een aanwijzing voor een transportabel, chemisch signaal dat verantwoordelijk is voor het inschakelen van de erucazuursynthese (Norton & Harris, 1975). Gedurende de tweede ontwikkelingsfase verloopt de synthese van erucazuur over het algemeen sneller dan die van de overige vetzuren, hoewel in het begin van deze fase de synthese van oliezuur nog sneller verloopt. Meestal is dit van korte duur, in sommige gevallen echter (zomerkoolzaadrassen) loopt de synthese van oliezuur en erucazuur gelijk op (Appelqvist, 1971; Fowler & Downey, 1970). Bij 0-rassen verloopt de synthese van oliezuur gedurende de gehele tweede ontwikkelingsfase sneller dan die van de overige vetzuren. Bij het wegvallen van de erucazuursynthese neemt vooral het gehalte aan oliezuur sterk toe.

Gedurende de derde ontwikkelingsfase, de afrijpingsfase blijft de oliesamenstelling ongewijzigd, ook het oliegehalte blijft ongeveer constant.



Figuur 2: Effect van de temperatuur op oliesamenstelling van een klassiek koolzaadras. Naar Canvin 1965. Palmitinezuur p, stearinezuur s, oliezuur o, linolzuur l, Linoleenzuur n, erucazuur e, eicoseenzuur i.

3 Vetzuur en lipidebiosynthese

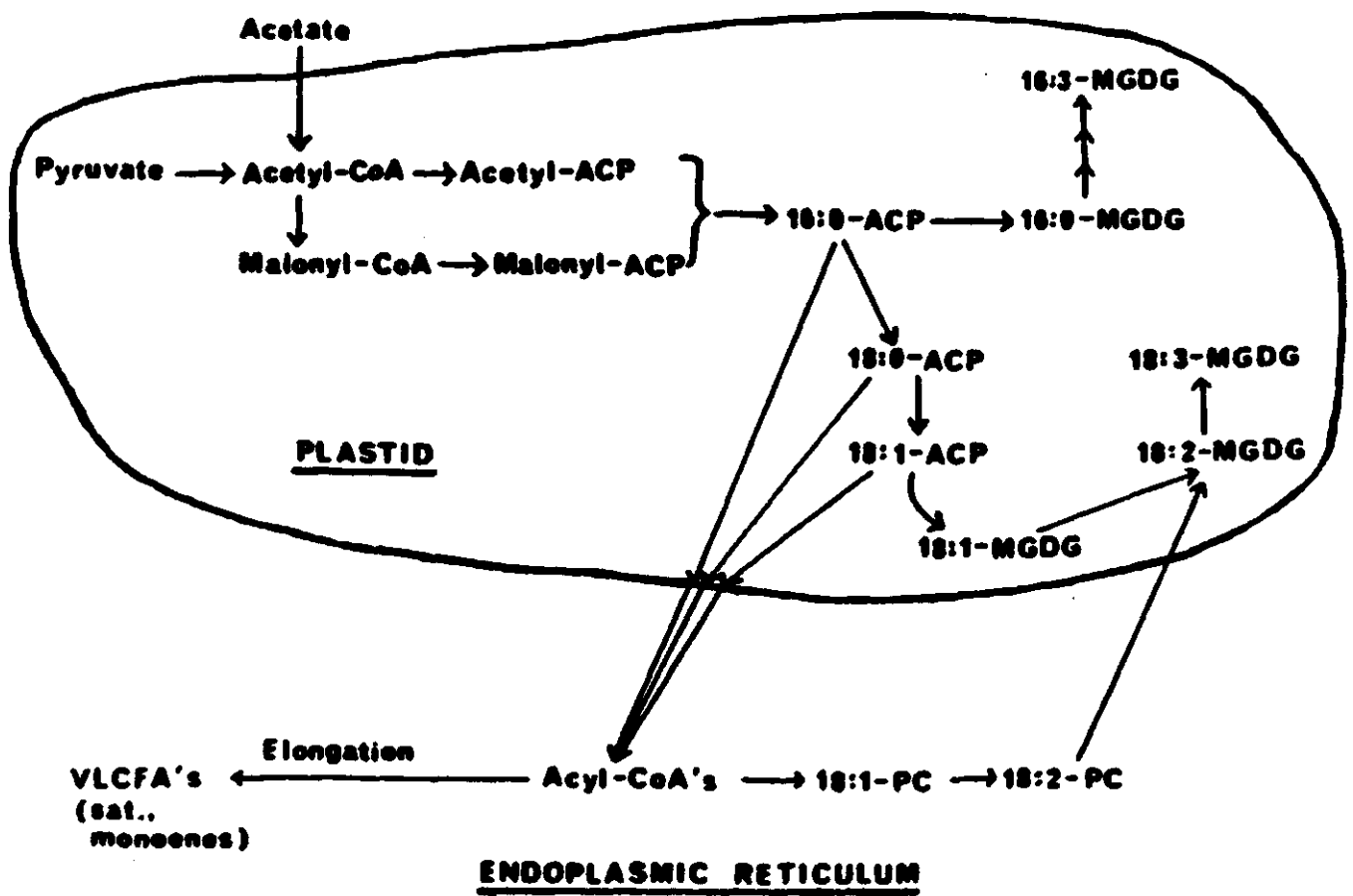
3.1 Algemeen

Koolzaadolie bestaat voor meer dan 90 % uit triacylglycerolen (triglyceriden). Een triacylglycerol is een glycerolskelet waaraan drie vetzuren veresterd zijn. Volgens recente literatuur is de vetzuursynthese, althans de vorming van palmitinezuur (C16:0) en oliezuur (C18:1), gelocaliseerd in de plastiden (Harwood, 1988) en niet zoals bij dieren en schimmels in het cytoplasma (Volpe & Vagelos, 1973; zie Figuur 3). De vetzuurskeletten zijn gedurende hun synthese veresterd aan een ACP (Acyl Carrier Protein). Dit ACP vertoont sterke overeenkomsten met het ACP dat bij bacteriën gevonden wordt. Net als bij bacteriën verloopt de vetzuursynthese in een reeks losse reacties die gekatalyseerd worden door verschillende enzymen en niet zoals bij schimmels en dieren aan een "Multi Enzyme Complex".

3.2 Prokariote en eukariote route voor glycerolipidesynthese

Eenmaal gesynthetiseerd hebben oleoyl- en palmitoyl-ACP twee opties. De eerste optie is, dat ze, in de plastiden, kunnen worden ingebouwd in lipiden. In plastiden zijn twee acyltransferasen aanwezig, die de acylgroepen van Acyl-ACP kunnen koppelen aan glycerol-3-fosfaat (G3P). Een van beide acyltransferases koppelt specifiek palmitinezuur aan de 2-hydroxylgroep van G3P terwijl het tweede acyltransferase specifiek oliezuur koppelt aan de 1-hydroxylgroep. De op deze wijze gevormde fosfatidylzuren kunnen worden omgezet naar andere glycerolipiden (Figuur 4). Deze syntheseroute in de plastiden is waarschijnlijk een overblijfsel van de prokariote lipidebiosynthese (endosymbiontentheorie) en wordt daarom prokariote route genoemd.

De tweede mogelijkheid is dat de acyl-ACP's worden gehydrolyseerd door een plastidair thioesterase, palmitinezuur en oliezuur komen hierbij vrij voor verdere verwerking buiten de plastiden. Deze vrije vetzuren worden in de plastide-envelop weer veresterd, dit maal met CoASH. Deze acyl-CoA's vormen het substraat voor een cytoplasmatische route voor de vorming van glycerolipiden (Figuur 4) Opvallend is dat bij deze route op de 2-positie van G3P altijd een C-18 vetzuur wordt ingebouwd. Deze cytoplasmatische route wordt eukariote route genoemd. Uit de verdeling van vetzuren over de



Figuur 3: De belangrijkste routes voor vetzuur-biosynthese in de plantecel. Afkortingen: ACP = Acyl Carrier Protein, PC = fosfatidylcholine, MGDG = monogalactosyldiacylglycerol, VLCFA very long chain fatty acid. Naar Harwood 1988.

triacylglycerolen in koolzaadolie kan men afleiden, dat de eukariote lipidebiosyntheseroute een overheersende rol speelt bij de vorming hiervan (Heinz, 1977; Frentzen, 1986).

Bij alle planten worden fosfatidylglycerolen gesynthetiseerd via de prokariote route (16:0 op de 2-positie). De overige polaire lipideklassen kunnen langs zowel de prokariote als de eukariote route worden gesynthetiseerd. De verhouding waarin beide synthesesroutes worden gebruikt kan sterk variëren van soort tot soort.

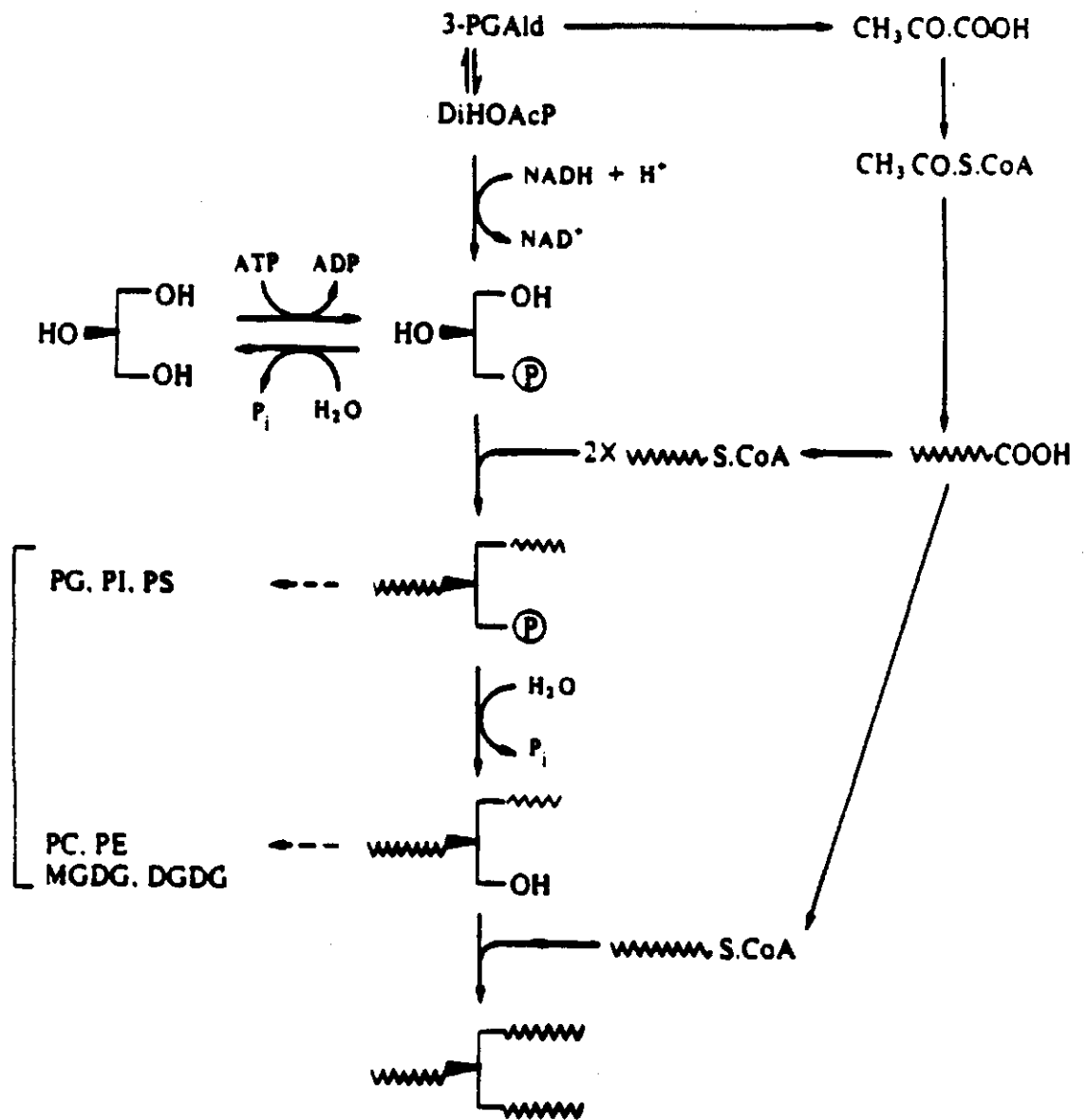
3.3 De rol van chloroplasten in het zaad van koolzaad

3.3.1 De rol van chloroplasten bij de zaadvulling

De rol van functionele chloroplasten in koolzaad is tot op heden een zeer omstreden zaak. De plastiden in het zaad spelen geen rol van betekenis bij de kwantiteit van de zaadvulling (Brar & Thies, 1976). Zowel het oliegehalte als ook het eiwitgehalte wordt volkomen door de moederplant bepaald (Grami & Stefansson, 1977). De assimilaten voor de zaadvulling worden hoofdzakelijk geleverd door import vanuit blad, stengel en hawen (Brar & Thies, 1976; Major et al., 1976 & 1978; Diepenbrock & Geisler, 1978 & 1979; Chapman et al., 1984).

3.3.2 Betrokkenheid van de chloroplast bij de vorming van linoleenzuur

Er is vastgesteld dat voor 539 verschillende soorten en variëteiten van Cruciferen zowel linolzuur als linoleenzuur in het zaad aanwezig zijn (Miller, 1965; Thies, 1971; Kumar & Tsunoda, 1980). Bij 204 onderzochte soorten en variëteiten van het geslacht Brassica ligt het linolzuurgehalte rond de 20 % en het linoleenzuurgehalte om en nabij de 10 %. Er is dus sprake van een sterke conservering van deze eigenschappen. Volgens Thies (1971) hangt dit samen met de aanwezigheid van functionele chloroplasten in het zaad. De meest karakteristieke structurele lipiden in plastiden zijn de galactosyldiacylglycerolen. Het belangrijkste vetzuur in deze galactosyldiacylglycerolen van chloroplasten is linoleenzuur. Juist bij plantenfamilies waar de zaadhuid doorzichtig is, zoals de Cruciferen, de Linaceëen, Gramineëen en de Leguminosen, en waar functionele chloroplasten in het zaad aanwezig zijn, daar bevatten zaden veel linoleenzuur. In wortels of geëtiolerde spruiten is linoleenzuur nagenoeg afwezig. Laat men



Figuur 4: Biosynthese van triacylglycerolen in oliehoudende zaden. Afkortingen: 3PGald = 3 fosfoglyceraldehyde, DiHOAcP = dihydroxy-acetonfosfaat, PG = fosfatidylglycerol, PI = fosfatidylinositol, PS = fosfatidylserine, PC = fosfatidylcholine, PE = fosfatidylethanolamine, MGDG = monogalactosyldiacylglycerol, DGDG = digalactosyldiacylglycerol.

geëtioloerde planten groen worden, dan blijkt er een correlatie te bestaan tussen het linoleenzuurgehalte en het chlorofylgehalte. Zo blijkt er ook een verband te zijn tussen het chlorofylgehalte en het linoleenzuurgehalte van kiemen van verschillende grassoorten. Aan de hand van deze gegevens betwijfelt Thies of het mogelijk zal zijn linoleenzuur volledig uit planten als koolzaad weg te veredelen (Thies, 1971).

Er kan echter de kanttekening gemaakt worden, dat er noch in het geval van na etioleren belichte planten, noch in het geval van de verschillende grassoorten sprake is van triacylglycerolaccumulatie zoals we dat vinden in koolzaad. In koolzaad wordt meer dan honderdmaal de voor de plastiden noodzakelijke hoeveelheid linoleenzuur geproduceerd (Nitsch, 1976). Het meeste linoleenzuur is geïncorporeerd in de reservelipiden.

Opmerkelijk is dat de mutant M364 van het zomerkoolzaadras Oro, die een verhoogd linoleenzuurgehalte in de zaadolie heeft, juist een lager chlorofylgehalte heeft in het zaad dan het ras Oro (Nitsch, 1976). Bij een andere mutant van Oro, M11, vinden we echter in het zaad zowel een verlaagd chlorofylgehalte als een verlaagd linoleenzuurgehalte (Bij M11 worden in alle andere plantendelen wel verhoogde chlorofylgehaltenes gevonden ten opzichte van het ras Oro) (Brar & Thies; 1976).

3.3.3 Zuurstofvoorziening in het zaad

Een derde rol die aan functionele chloroplasten wordt toegeschreven is de zuurstofvoorziening, die nodig is voor de desaturatie van vetzuren (Harris & James, 1969; Thies, 1971). Hoewel het is aangetoond dat zuurstof nodig is voor de desaturatie van vetzuren in cotylen van diverse oliehoudende zaden (Pollard & Stumpf 1980a & b), is daarmee niet gezegd, dat deze zuurstof daadwerkelijk afkomstig is van de chloroplasten in het zaad. Zo vindt Nitsch (1976) dat de oliesamenstelling nagenoeg niet wordt beïnvloed door verduistering van de hauwen gedurende periodes van 1 tot 6 weken. (verduistering van de hauwen vond plaats door een lichtdichte zak over de hauwen aan een plant te trekken, dit had een aanzienlijke remming van de fotosynthese van de hauwen tot gevolg maar of het consequenties had voor de vorming van chloroplasten in het zaad werd niet nagegaan). Klaarblijkelijk is er voldoende zuurstof aanwezig voor de desaturatie van vetzuren in het zaad ook zonder bijdrage van deze zaadplastiden. Bovendien is volgens sommige auteurs de oliesynthese nog aan de gang terwijl er geen chlorofyl meer in het zaad meetbaar is, dit terwijl de oliesamenstelling constant blijft

(Nitsch, 1976; Rakow & McGregor, 1975; Diepenbrock et al., 1979, 1983 & 1984).

3.3.4 Synthese van vetzuren in het zaad

De chloroplasten in het zaad van Cruciferen, dienen waarschijnlijk voor de verwerking van assimilaten, die uit andere plantendelen worden geïmporteerd, tot onder andere de vetzuren die nodig zijn bij de synthese van triacylglycerolen. Zo blijkt er bijvoorbeeld een correlatie te bestaan tussen de activiteit van acetyl-CoA carboxylase, een enzym uit de vetzuursynthese, dat bij planten alleen uit plastiden is geïsoleerd, en de lipideaccumulatie in het zaad van onder andere koolzaad (Harwood, 1988). Het is bij koolzaad omstreden of alleen de chloroplasten, dan wel andere plastiden betrokken zijn bij de synthese van de vetzuren die nodig zijn voor de oliëvorming. Er zijn zelfs aanwijzingen dat de vetzuursynthese deels buiten de plastiden zou kunnen plaatsvinden (zie 5.4).

De mutanten M57 en M364 van het zomerkoolzaadras Oro hebben respectievelijk een verlaagd en verhoogd linoleenzuurgehalte in de zaadolie. In een onderzoek door Rakow en McGregor (1975) aan deze mutanten blijkt dat het maximale chlorofylgehalte in het zaad samenvalt met de maximale oliësynthese. Voor het dalen van het chlorofylgehalte is reeds 80 % van de olie gevormd is en er vindt geen lipidebiosynthese meer plaats als er geen chlorofyl meer aantoonbaar is (Rakow & McGregor, 1975). Een dergelijk patroon van vetzuurbiosynthese in het zaad is ook gevonden bij het zomerkoolzaadras Erglu (Diepenbrock & Geisler, 1979).

In het zaad van het zomerkoolzaadras Oro bereiken het linoleenzuurgehalte in de galactosyldiacylglycerolen en het chlorofylgehalte een maximum gedurende de derde week na bloei. Volgens Nitsch (1976) neemt het chlorofylgehalte daarna snel af tot minder dan 25 % van de maximale concentratie per zaad in de vijfde week na bloei. Een soortgelijke afname wordt geschetst voor het gehalte aan linoleenzuur in de galactolipiden (Diepenbrock, 1983 & 1984). Zes weken na de bloei is geen chlorofyl meer waarneembaar in het zaad, toch ligt volgens Nitsch de oliësynthesesnelheid per zaad nog op 50 % van het maximale niveau.

Ondanks het feit dat de bovenstaande onderzoeken hebben plaatsgevonden aan nauw verwante cultivars en voor een deel zelfs aan isogene lijnen van 1 ras zijn de bovenstaande onderzoeken moeilijk vergelijkbaar. Volgens een onderzoek van Diepenbrock (1984) aan het zomerkoolzaadras Oro en aan de linoleenzuur-mutanten M57 en M364 wordt gevonden dat de accumulatie van

linoleenzuur in de galactosyldiacylglycerolen in plastiden uit het zaad van M364 volledig synchroon loopt aan Oro. Volgens een eerder onderzoek zou M364 zijn maximale chlorofylgehalte pas 2 weken na Oro bereiken (Nitsch, 1976). Volgens Rakow en McGregor (1975) loopt het chlorofylgehalte in M57 en M364 synchroon gedurende de zaadontwikkeling, voor dezelfde mutante lijnen toont Diepenbrock echter aan dat de accumulatie van chloroplastlipiden in M57 trager verloopt.

4 Meervoudig onverzadigde vetzuren

4.1 16:3 en 18:3 planten

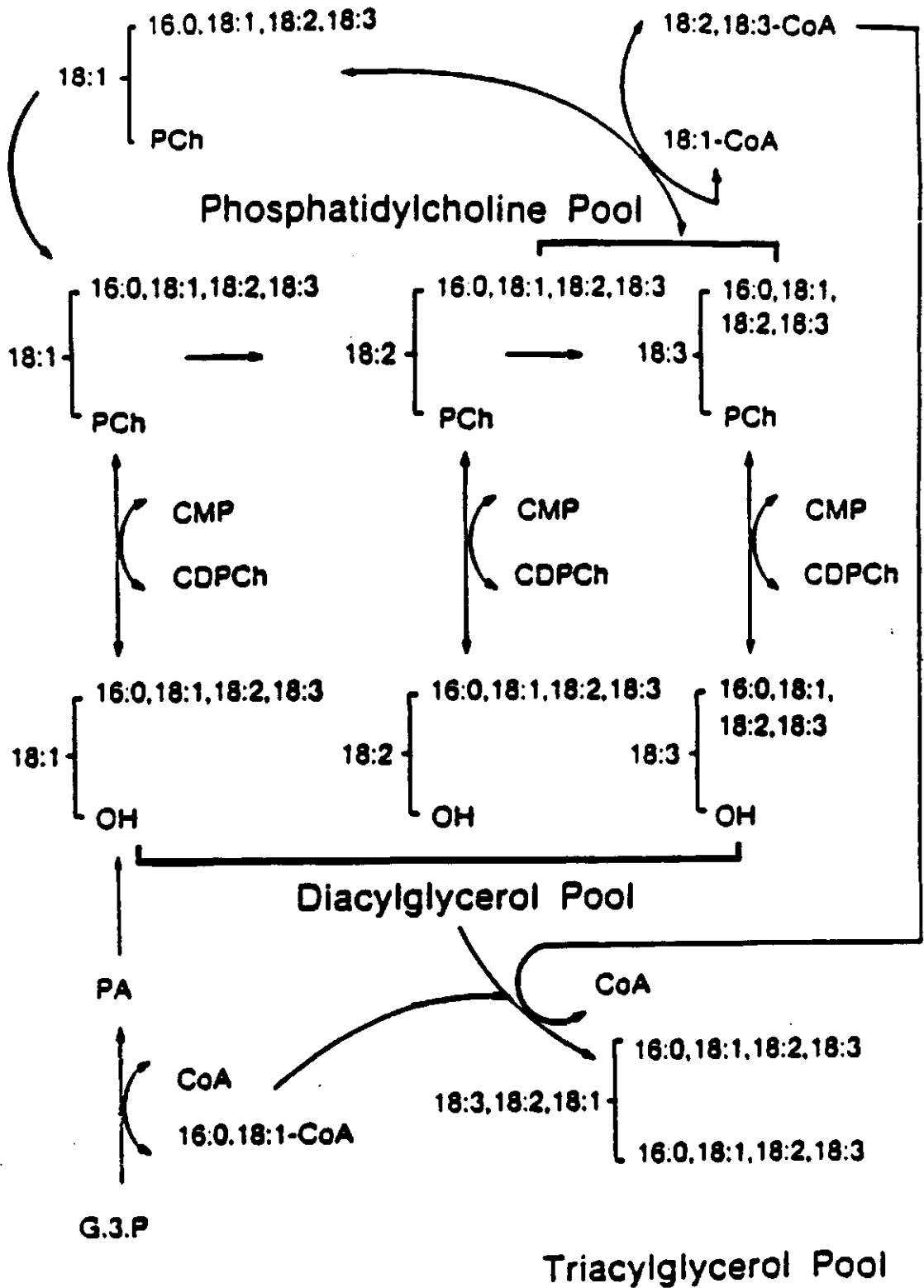
Bij enkele plantenfamilies, waaronder de Cruciferen, komt naast linoleenzuur ook hexadecatrieenzuur voor in de galactolipiden. Bij deze zogenaamde 16:3 planten loopt de synthese van de galactolipiden in ieder geval voor een deel over de prokariote route. Hexadecatrieenzuur wordt alleen maar op de 2-positie van galactolipiden gevonden. In de plastiden vinden we een desaturatiesysteem, dat onder andere verantwoordelijk is voor de vorming van het hexadecatrieenzuur. Het blijkt dat hetzelfde systeem ook verantwoordelijk is voor de vorming van linolzuur en linoleenzuur uit oliezuur. Het gaat hier waarschijnlijk om een groep desaturasen die zowel vetzuren met ketenlengtes van 16 als 18 koolstofatomen als substraat kan gebruiken. De desaturatie vindt plaats vanaf de n-zijde (het CH₃ uiteinde) van het vetzuur en wel in de volgorde n-9, n-6 en n-3 (Browse et al., 1984 & 1985; Frentzen 1986). Naast 16:3 planten zijn er ook 18:3 planten, bij deze laatste groep verloopt over het algemeen hoofdzakelijk de synthese van fosfatidylglycerolen over de prokariote route, hexadecatrieenzuur komt hier niet voor. Ook in plastiden van 18:3 planten is desaturatie van oliezuur tot linoleenzuur mogelijk, dit vermogen is echter veel geringer dan bij plastiden uit 16:3 planten. Dit blijkt uit experimenten met geïsoleerde plastiden uit verschillende 16:3 en 18:3 planten (Heinz & Roughan, 1982; Andrews & Heinz, 1987). Plastiden uit 18:3 planten zijn niet in staat tot desaturatie van C16-vetzuren (Andrews & Heinz, 1987). Naast het ontbreken van het vermogen om C16-vetzuren te desatureren is er nog een opvallend verschil tussen plastiden uit 16:3 planten en die uit 18:3 planten. De plastiden uit 18:3 planten zijn minder goed in staat fosfatidylzuren te vormen en deze fosfatidylzuren te verwerken tot andere lipiden, dan plastiden uit 16:3 planten. Aan de hand van studies aan geïsoleerde plastiden (Heinz & Roughan, 1982; Andrews & Heinz, 1987) en aan een groot aantal in vivo labelings-studies (Williams et al., 1975; Williams, 1980; Roughan & Slack, 1982; Murphy et al., 1985; Frentzen, 1986; Harwood, 1988) lijkt het er op dat plastiden uit 18:3 planten voor de synthese van galactolipiden zijn aangewezen op import van diacylglycerolskeletten vanuit het cytoplasma. Het gaat hierbij vooral om diacylglycerol-typen met een hoog gehalte aan linolzuur. Desaturatie van linolzuur vindt dan plaats aan de galactolipiden (Williams et al., 1975; Williams, 1980). Bij de 16:3-planten *Arabidopsis thaliana* en *Sinapis alba*, beide nauwe verwanten van koolzaad, zijn er aan-

wijzingen dat de synthese van galactolipiden, met een eukariote vetzuursamenstelling (C18-vetzuur op de 2-positie van het glycerolskelet), verloopt zoals de bovenbeschreven weg voor synthese van galactolipiden bij 18:3-planten. Bij 16:3 planten ligt de verhouding tussen prokariote en eukariote lipiden over het algemeen hoger dan bij 18:3 planten (Heinz, 1977; Frentzen, 1986).

4.2 Vorming van meervoudig onverzadigde vetzuren buiten de plastiden

Bij diacylglycerolen die buiten de plastiden zijn gevormd, is op de 2-positie van het glycerolskelet een C18-vetzuur ingebouwd. Diacylglycerolen van dit type zijn bij de oliesyntese in diverse oliehoudende zaden (Slack et al., 1978; Stymne & Glad, 1980; Stobart et al., 1982; Stymne et al., 1985; Roughan & Slack, 1982; Frentzen, 1986; Harwood 1988) en bij de lipidesynthese in het blad (Roughan, 1975; Williams et al., 1975; Williams, 1980; Roughan & Slack, 1982; Murphy et al., 1985; Browse et al., 1985, 1986; Norman en St. John, 1986; Frentzen, 1986; Harwood, 1988) van diverse plantensoorten, nauw betrokken bij de desaturatie van oliezuur tot linolzuur. Deze diacylglycerolen staan in een dynamisch evenwicht met een groep fosfolipiden, de fosfatidylcholines. Oliezuur gebonden aan fosfatidylcholine, bij voorkeur op positie 2 maar mogelijk in mindere mate ook op positie 1 (Murphy et al., 1985), kan als substraat dienen voor een microsomaal desaturase, dat het oliezuur omzet naar linolzuur en mogelijk zelfs naar linoleenzuur. De op deze wijze gevormde meervoudig onverzadigde vetzuren kunnen door een acyltransferase worden uitgewisseld tegen oliezuur uit oleoyl-CoA. Op deze wijze wordt er een pool met C18:2CoASH en C18:3CoASH gevormd die kan dienen als substraat voor lipidebiosynthese. Het gedesatureerde fosfatidylcholine kan ook direct dienen voor de synthese van andere lipiden zoals triacylglycerolen (Slack et al., 1978; Stymne & Glad, 1980; Stobart et al., 1982; Roughan & Slack, 1982; Stymne et al., 1985; zie Figuur 5). Of een dergelijk systeem in koolzaad ook aanwezig is, is nog onduidelijk. Voor enkele aan koolzaad verwante planten zijn echter duidelijke aanwijzingen gevonden dat fosfatidylcholine bij deze desaturatiereacties betrokken is in het cytoplasma (Mukherjee, 1982; Browse et al., 1986; Norman & St. John, 1986).

Bij de lipidesynthese in het blad van veel planten zijn er aanwijzingen dat de synthese van linolzuur vooral verloopt langs het bovenbeschreven cytoplasmatische systeem, terwijl de synthese van linoleenzuur uit linolzuur vooral in de chloroplasten zou plaatsvinden. Bij 16:3 planten verloopt



Figuur 5: Een schematische weergave van de desaturatie van C18 vetzuren, zoals deze wordt verondersteld plaats te vinden in de microsomale fractie van oliehoudende zaden. Naar Roughan 1982.

Tabel 1. De samenstelling van membraanlipiden uit blad van koolzaad opgekweekt bij 25 °C (boven) en bij 15 °C (onder). Naar Appelqvist, 1971.

Lipide klassen	Vetzuren mg/g vers gewicht	Vetzuursamenstelling %							Andere vetzuren	
		12 : 0	14 : 0	16 : 0	16 : 3	18 : 0	18 : 1	18 : 2		
PC + PI + PE	0,57	Tr	Tr	21,2	-	3,5	6,1	20,3	44,6	4,3
PG + SQDG	0,67	Tr	Tr	31,5	Tr	2,3	3,5	16,7	34,0	12,0
DGDC	1,24	Tr	Tr	12,6	2,0	1,8	2,3	7,8	70,1	3,4
MGDC	2,36	1,0	1,0	17,4	24,2	4,0	4,8	2,5	44,7	0,4
Neutrale lipiden	0,74	1,3	1,3	35,1	6,3	2,5	4,0	9,7	27,5	12,3

Lipide klassen	Vetzuren mg/g vers gewicht	Vetzuursamenstelling %							Andere vetzuren	
		12 : 0	14 : 0	16 : 0	16 : 3	18 : 0	18 : 1	18 : 2		
PC + PI + PE	0,67	Tr	Tr	19,1	Tr	3,2	3,7	21,7	47,8	4,5
PG + SQDG	0,77	Tr	Tr	30,0	Tr	1,6	2,1	15,3	41,3	9,7
DGDC	1,18	Tr	Tr	13,2	2,0	1,0	1,2	6,9	72,3	4,4
MGDC	2,53	1,2	1,1	13,1	27,8	2,9	3,1	1,4	49,1	0,3
Neutrale lipiden	0,70	0,7	1,1	28,9	2,3	2,4	3,0	12,0	36,0	13,6

Afkortingen: PG = fosfatidylglycerol, PI = fosfatidylinositol, SQDG = sulfolipide, PC = fosfatidylcholine,

PE = fosfatidylethanolamine, MGDC = monogalactosyl-diacylglycerol, DGDC = digalactosyldiacylglycerol.

de synthese van linolzuur echter ook voor een deel in de plastiden. Bij de oliesynthese in het zaad van lijnzaad (*Linum usitatissimum*) zijn er daarentegen duidelijke aanwijzingen dat de synthese van zowel linol- als linoleenzuur volledig plaatsvindt in het cytoplasma (Slack et al., 1978; Stymne & Stobart, 1985).

4.3 Een alternatieve route voor de synthese van linoleenzuur

Er is nog een derde weg waarlangs linoleenzuur gevormd kan worden, namelijk door synthese vanuit hexadecatrieenzuur. Deze route is voor het eerst aangetoond bij gehomogeniseerde chloroplasten van spinazie (16:3 plant) (Jacobson et al., 1973). Later onderzoek heeft aangetoond dat het hier waarschijnlijk gaat om een minder belangrijke syntheseroute (Murphy & Stumpf, 1979). Vergelijking van de samenstelling van monogalactosyldiacylglycerolen en digalactosyldiacylglycerolen in blad van koolzaad geeft echter een indicatie dat deze route in koolzaad mogelijk ook functioneert (Appelqvist, 1971; zie Tabel 1). Opmerkelijk in dit geval zijn ook de bevindingen in een onderzoek van Williams (1982). In dit onderzoek toont hij aan dat bij koolzaad de synthese van de meervoudig onverzadigde vetzuren in de galactolipiden waarschijnlijk niet verloopt over fosfatidylcholine (in het cytoplasma), maar volledig over de galactolipiden zelf. De synthese van de meervoudig onverzadigde vetzuren zou dus alleen in de plastiden plaatsvinden terwijl de digalactosyldiacylglycerolen een (mogelijk schijnbaar) eukariote vetzuursamenstelling hebben en dus uit het cytoplasma afkomstig lijken te zijn.

Ook in het werk van Norman en St. John (1986) aan *A.thaliana* zijn enkele aanwijzingen voor deze route te vinden. In de mutant JBl die onder andere gestoord is in de biosynthese van hexadecatrieenzuur treedt een daling in het gehalte aan digalactosyldiacylglycerolen op, terwijl er vanwege een verschuiving in de locatie van de linoleenzuursynthese vanuit C18 vetzuren en het grotere aandeel langs de eukariote route gevormde 18/18 monogalactosyldiacylglycerolen, eerder een stijging van het gehalte van de digalactosyldiacylglycerolen te verwachten zou zijn. Het meest voorkomende type digalactosyldiacylglycerolen is 18:3/18:3. De daling wordt mijns inziens veroorzaakt door de vertraagde synthese van hexadecatrieenzuur.

4.4 De vorming van meervoudig onverzadigde vetzuren bij enkele Cruciferen

In hoeverre bij koolzaad de synthese van linolzuur en linoleenzuur verloopt in de plastiden of in het cytoplasma is vooralsnog onduidelijk. Uit proeven met blad van koolzaad (*B. napus*) en tuinboon (*Vicia faba*, een 18:3 plant) blijkt dat bij koolzaad waarschijnlijk alleen de prokariote route voor de synthese van galactolipiden wordt gebruikt. Dit in tegenstelling tot de situatie bij *V. faba* waarbij sterk onverzadigd 18/18fosfatidylcholine als substraat voor de galactolipidesynthese lijkt te dienen (Williams et al., 1976; Williams, 1980; Williams et al., 1982).

Uit onderzoek aan mutanten van *B. napus*, die gestoord zijn in de biosynthese van linoleenzuur, blijkt dat de vererving van het linoleenzuurgehalte in de galactolipiden uit het zaad volledig matернаal verloopt. Ook dit is een sterke indicatie dat de synthese van galactolipiden volledig plaatsvindt in de plastiden (Diepenbrock, 1984 & 1987). Bij incorporatieproeven met ^{14}C linolzuur en linoleenzuur in zaad van witte mosterd (*Sinapis alba*, een nauwe verwant van koolzaad) blijkt dat de label hoofdzakelijk wordt ingebouwd in galactolipiden. Er is nauwelijks sprake van inbouw in de reservelipiden die absoluut gezien toch verreweg het meeste linoleenzuur bevatten. Inbouw van linoleenzuur in triacylglycerolen vindt dus kennelijk plaats via een ander systeem dat ontoegankelijk is voor externe labeling met [$1\text{-}^{14}\text{C}$] linoleenzuur (Mukherjee, 1982).

Bij *Arabidopsis thaliana* (zandraket een verwant van koolzaad) zijn mutanten geïsoleerd die gestoord zijn in de biosynthese van linolzuur en linoleenzuur in de plastiden (Browse et al., 1984 & 1985). Jb1 is een mutant, die gestoord is in 1 kerngen dat verantwoordelijk is voor de werking van het n-3 desaturase (omzetting van 16:2 en 18:2 tot 16:3 en 18:3) uit de plastiden. Het gevolg is dat dit desaturase vooral bij temperaturen boven de 18 graden minder goed functioneert. In het zaad verloopt de desaturatie tot linoleenzuur kennelijk niet over de plastiden omdat hier, in tegenstelling tot het blad, geen duidelijke verschillen in lipidesamenstelling worden gevonden tussen de Jb1-mutant en het wildtype (Browse et al., 1986). Voor alle (polaire) lipideklassen in het blad, ook buiten de plastiden geldt dat het linoleenzuurgehalte in gelijke mate is afgenomen ten opzichte van het wildtype (WT). De afname in het linoleenzuurgehalte is echter minder sterk dan de afname in het gehalte aan hexadecatrieenzuur (27 % en 57 % t.o.v. het WT bij 28°C). In het blad van Jb1 is er ondanks de algemene daling in het linoleenzuurgehalte een stijging opgetreden in het gehalte 18:3(1) 18:3(2) galactolipiden. Uit labelingsexperimenten aan blad van Jb1

en het wildtype van *A. thaliana* blijkt dat fosfatidylcholine als substraat voor oliezuurdesaturatie en linolzuurdesaturatie dient. Als ^{14}C oliezuur wordt geïnjecteerd in bladeren van *A. thaliana* WT of JBl blijkt desaturatie van ^{14}C oliezuur vooral te verlopen langs de cytoplasmatische route met fosfatidylcholine als substraat. De label wordt vooral gevonden op de 2-positie van fosfatidylcholine. Bij zowel het wildtype als bij JBl worden monogalactodiacylglycerolen gevonden met ^{14}C 18 vetzuren op de 2-positie, dat wil zeggen gevormd langs de eukariote route. Dit is strijdig met de gegevens gevonden door Williams voor koolzaad (Williams et al., 1982). Bij de experimenten met incorporatie van ^{14}C oliezuur waren de sterkst gelabelde soorten monogalactosyldiacylglycerolen 18:2/18:3 en 18:3/18:3 bij het wildtype en 18:2/18:2 en 18:2/18:3 bij JBl. Deze zijn dus gevormd via de eukariote route. Linolzuur dat gevormd is in het cytoplasma, wordt ook geïncorporeerd in monogalactosyldiacylglycerolen die langs de prokariote route gevormd zijn, dit blijkt uit het feit dat aan blad toegediend ^{14}C linolzuur ook in deze lipiden wordt geïncorporeerd. Deze inbouw van geïmporteerd linolzuur wordt vooral in het wildtype gevonden. Er vindt dan geen desaturatie van het palmitinezuur op de 2-positie plaats (Norman & St. John 1986). Misschien vormt deze route "precursors" voor 18:3/16:0 digalactosyldiacylglycerolen. Bij gebruik van ^{14}C laurinezuur(C12:0) als "precursor" vindt er incorporatie van de label plaats in 18:3/16:3, 18:3/16:2, 18:2/16:2 en in 18/18 typen monogalactosyldiacylglycerolen.

4.5 De rol van chloroplasten bij de vorming van meervoudig onverzadigde vetzuren

Bij de synthese van galactolipiden in blad van koolzaad zijn er aanwijzingen dat het benodigde linolzuur volledig in de plastiden wordt gevormd, terwijl er bij *Arabidopsis thaliana* duidelijke aanwijzingen zijn voor een deels cytoplasmatische synthese van dit linolzuur (Williams, 1982; Norman & St John, 1986). In het blad bij *A. thaliana* is ook aangetoond dat er sprake is van transport van linoleenzuur dat in de plastiden gevormd is naar lipiden in het cytoplasma en vice versa (Browse et al., 1986; Norman & St. John, 1986).

In het zaad van *Sinapis alba* zien we dat ^{14}C gelabeld linolzuur of linoleenzuur wordt ingebouwd in de galactolipiden. Deze label komt echter nauwelijks terecht in de reserve-triacylglycerolen van de mosterdolie. (Muhkerjee, 1982).

Ook de vererving van het linoleenzuurgehalte in de galactolipiden en in triacylglycerolen is zeer verschillend. Het linoleenzuurgehalte in de chloroplasten van het zaad vererft matернаal, terwijl het linoleenzuurgehalte in de triacylglycerolen grotendeels onder controle staat van kerngenen. Toch zien we bij de linoleenzuur-mutanten van koolzaad, M43 en M364 in zowel de zaadolie als in de membranen van de chloroplasten in het zaad, een verlaagd respectievelijk verhoogd linoleenzuurgehalte (Diepenbrock, 1987). Er is dus klaarblijkelijk toch uitwisseling van linoleenzuur tussen cytoplasma en plastiden mogelijk.

Bij mutanten van *A. thaliana*, die gestoord zijn in de plastideroute voor biosynthese van linoleenzuur, is de samenstelling van de zaadolie ongewijzigd ten opzichte van het wildtype. Al deze aanwijzingen bij elkaar genomen ontstaat het beeld dat chloroplasten wel in staat zijn linoleenzuur te vormen, maar dat dit linoleenzuur niet wordt gebruikt bij de synthese van reserve-triacylglycerolen in de zaadolie.

Dit staat lijnrecht tegenover de hypothese van Thies (1971) dat de chloroplasten in het zaad verantwoordelijk zouden zijn voor de synthese van linoleenzuur in de reservelipiden van het zaad (zie 3.3.2). Hierbij kan worden opgemerkt dat er bij lijnzaad, een plant met een doorzichtige zaadhuid, chloroplasten in het zaad en een zeer hoog linoleenzuurgehalte, ook sterke aanwijzingen zijn dat de linoleenzuursynthese voor de olie in het cytoplasma plaatsvindt (Stack et al., 1978; Stymne & Stobart, 1985).

4.6 Veredeling en vererving van linol- en linoleenzuurgehaltenes

De genetische regulatie van de C18 vetzuren is onduidelijk. Als laag erucazuur rassen met hoge respectievelijk lage linolzuur of linoleenzuurgehaltenes, reciproom met elkaar worden gekruist, bereikt het gehalte aan linolzuur of linoleenzuur van het F1 zaad niet de gemiddelde waarde tussen beide ouders. Er is duidelijk sprake van een matернаal effect in de F1 (Kondra & Stefansson, 1970; Thomas & Kondra, 1973; Kondra & Thomas, 1975; Diepenbrock 1983, 1984, 1987; Diepenbrock en Wilson, 1987; Pleines et al., 1987). In het zaad van de F2 en de reciproke F2 is dit effect verdwenen. Het gehalte aan linolzuur of linoleenzuur van deze beide nakomelingschappen is niet significant verschillend. De waarden die in de F2 voor linolzuur of linoleenzuur gevonden worden zijn niet in alle gevallen gelijk aan de gemiddelde waarde van de oorspronkelijke kruisingsouders, er is soms sprake van een relatief verhoogd oliezuurgehalte.

Bij terugkruising van de F1 met kruisingsouders worden zeer verschillende resultaten geboekt. Terugkruising van F1 uit M364 x M43 en M43 x M364 op de beide ouders wordt gevonden dat het linoleenzuurgehalte grotendeels door kerngenen wordt bepaald (Diepenbrock & Wilson, 1987). In een andere kruising tussen hoog en laag linoleenzuur lijnen van zomerkoolzaad wordt echter gevonden dat het sterke maternale effect gehandhaaft blijft bij kruising van planten met gelijk cytoplasma (Pleines mondeling).

Bij al dit soort kruisingsexperimenten wordt gevonden dat schommelingen in de gehalten van linolzuur of linoleenzuur gepaard gaan met een tegengestelde schommeling in het oliezuurgehalte. Dit hoeft echter niet te betekenen dat er een causaal verband tussen beide bestaat, gezien het geringe aantal componenten in de olie op zich al leidt tot negatieve correlaties tussen deze componenten (Stefansson & Storgaard, 1969).

Uit het werk van Thies (1971) blijkt dat het linolzuur- en het linoleenzuurgehalte in de zaadolie van *Brassica* binnen nauwe grenzen variëren. Het totaalgehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren in de olie ligt tussen 25 en 45 %. Het blijkt dat de meervoudig onverzadigde vetzuren in het geslacht *Brassica* een sterke voorkeur hebben voor de 2-positie in de triacylglycerolen waar de olie grotendeels uit bestaat. Bij *Crambe abyssinica* een verwant van het geslacht *Brassica* vindt men meervoudig onverzadigde vetzuren zelfs uitsluitend op de 2-positie. Een hoog linoleenzuurgehalte in het zaad hoeft niet te betekenen dat dit in de rest van de plant ook het geval is. Appelqvist (1971) heeft uit een zomerkoolzaadras, met een laag erucazuurgehalte, twee inteeltlijnen gemaakt. Hij heeft deze lijnen geselecteerd op een verhoogd (15,6 %) respectievelijk verlaagd (6,1 %) linoleenzuurgehalte in de olie. De lijn, met het verlaagde linoleenzuurgehalte in de olie, heeft in het blad en in houwvanden juist een hoger linoleenzuurgehalte, dan vergelijkbaar weefsel van de "linoleenzuurrijke" lijn. De linoleenzuur-mutant M11, van het zomerkoolzaadras Oro, heeft zowel in het zaad als in het houwweefsel een verlaagd linoleenzuurgehalte (Brar & Thies, 1976). Bij de plastidelipiden in zaden van de mutanten M364 en M43 werd evenals bij de triacylglycerolen een verhoogd respectievelijk verlaagd linoleenzuurgehalte gevonden (Diepenbrock & Wilson, 1987).

De complexe genetica, van de meervoudig onverzadigde vetzuren maakt een gerichte selectie op hoog linolzuur en laag linoleenzuur in de olie tot een moeizame zaak. Veredeling op linoleenzuur wordt nog eens extra bemoeilijkt door het feit dat het gehalte van dit vetzuur erg sterk wordt beïnvloed door externe omstandigheden (Pleines et al., 1987). Bovendien is koolzaad een amphidiploid, zodat veel genen 2 maal aanwezig zijn. Desondanks worden

er toch vorderingen gemaakt op dit gebied. Een paar kruisingsprogramma's waarbij laag linoleen lijnen van *B. napus* en *B. napus* x *B. juncea* die verkregen zijn door klassieke veredeling, worden ingekruisd met laag linoleen EMS-mutanten van het zomerkoolzaadras Oro hebben nieuwe lijnen opgeleverd met linoleenzuurgehaltenes van minder 3 % en linolzuurgehaltenes van ongeveer 30 tot 40 % (Jönsson & Persson, 1983; Roy & Tarr, 1985, 1986, 1987; Scarth et al., 1988).

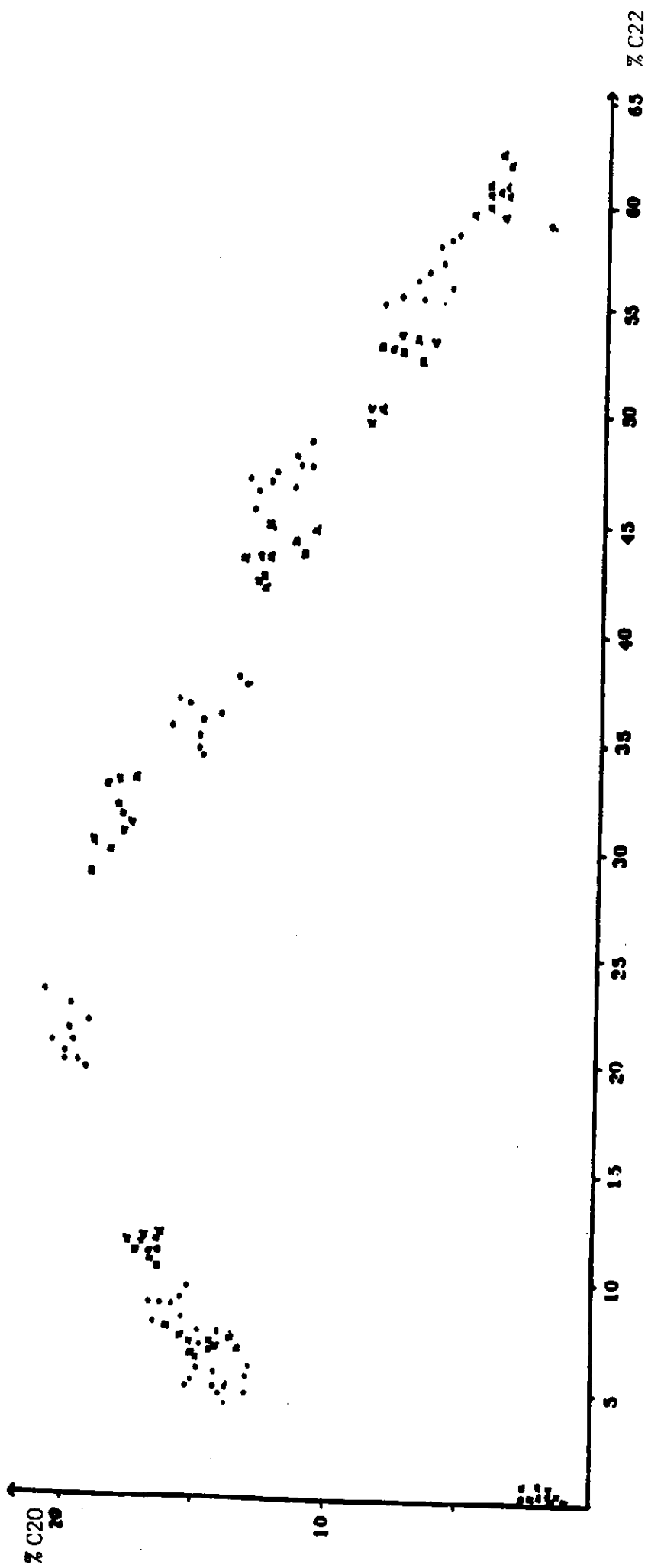
5 Zeer langketenige vetzuren

5.1 Vererving van erucazuur

Het meest kenmerkende vetzuur in het genus *Brassica* is erucazuur. De vererving van dit vetzuur lijkt veel minder complex dan die van de meervoudig onverzadigde vetzuren. Bij *B. campestris* is 1 embryonaal kerngen verantwoordelijk voor synthese van erucazuur; bij de amphidiploid *B. napus* zijn dit twee genen. Deze genen zijn naast de synthese van erucazuur ook verantwoordelijk voor de synthese van eicoseenzuur. Van het gen dat codeert voor erucazuur is een reeks allelen bekend, die coderen voor verschillende erucazuurgehaltes. Deze allelen heten additief te werken wat betreft de synthese van erucazuur en partieel dominant te zijn voor de synthese van eicoseenzuur (Downey & Craig, 1964; Harvey & Downey, 1964; Dorrell & Downey, 1965; Krymanski & Downey, 1969).

Dit is echter een te eenvoudige voorstelling van zake. Uit onderzoek van Jönsson (1977) blijkt dat er een reeks stabiel verervende gehalten van erucazuur tussen 0 en ongeveer 60 % wordt gevonden bij koolzaad. Stabiel verervend betekent homozygoot op de twee loci van de erucazuurgenen. Wordt het erucazuurgehalte voor deze homozygote combinaties uitgezet tegen het eicoseenzuurgehalte, dan ontstaat een curve met een optimum bij 25 % erucazuur en 20 % eicoseenzuur (Figuur 6). Dat wil zeggen bij erucazuurgehalten tot 25 % bestaat een positieve correlatie tussen erucazuur en eicoseenzuur, bij hogere erucazuurgehalten is er een negatieve correlatie tussen erucazuur en eicoseenzuur.

Bij diverse onderzoeken wordt de positieve correlatie tussen erucazuur en eicoseenzuur experimenteel gebruikt om uit het erucazuurgehalte het eicoseenzuurgehalte te schatten in geval men niet in staat is linoleenzuur en eicoseenzuur van elkaar te scheiden (Ackman, 1983), men gaat er daarbij vanuit dat ook erucazuur- en eicoseenzuurgehalten van heterozygote gencombinaties zich volgens hetzelfde verband gedragen als homozygote combinaties in het gebied van erucazuurgehalten tot 25 %. Bij veel zomerkoolzaadrassen ligt het erucazuurgehalte tussen 25 en 35 % van de olie, dat is dus in de buurt van het optimum van de erucazuur/eicoseenzuurcurve. Wanneer men een dergelijk ras kruist met een 0-ras, dan vindt men een erucazuurgehalte dat overeenkomt met het gemiddelde tussen beide ouders, maar voor eicoseenzuur ligt het gehalte boven het gemiddelde van beide ouders. Voor eicoseenzuur is er dus schijnbaar sprake van partiële dominantie. Bij



Figuur 6: Homozygoot verervende niveaus voor eicoseenzuur en erucazuur in koolzaad. Ieder niveau is weergegeven door de samenstelling van 10 individuele zaden uit ingeteelde planten. Naar Jönsson 1977.

een kruising van een zeer erucazuurrijk ras (60 % 22:1, 4 % 20:1) met een 0-ras, ontstaan F1-zaden met ongeveer 40 % erucazuur en 11-13 % eicoseenzuur. Dit laat duidelijk zien dat de partiële dominantie voor eicoseenzuur bij zomerkoolzaad een schijneffect is. De gevonden waarden voor erucazuur en eicoseenzuur passen perfect in de erucazuur/eicoseenzuurcurve van Jönsson. Tevens is duidelijk dat het schatten van eicoseenzuurgehaltenes uit erucazuurgehaltenes met een lineaire regressie lijn (Ackman, 1983) leidt tot fouten. Bij de bovenbeschreven kruising tussen een 0 ras en een zeer hoog erucazuurras zien we dat de genen voor hoog erucazuur in heterozygote combinatie coderen voor een hoger gehalte, dan op grond van additieve werking verwacht wordt. Wanneer we de curve van Jönsson extrapoleren naar een maximum vinden we een gehalte aan erucazuur van ongeveer 66 % bij 0 % eicoseenzuur.

Dit verschijnsel vindt waarschijnlijk zijn oorzaak in het feit dat de 2-positie in triacylglycerolen van koolzaad een sterke voorkeur heeft voor C18-vetzuren en meervoudig onverzadigde vetzuren in het bijzonder. Verzadigde vetzuren, in praktijk hoofdzakelijk palmitinezuur, hebben evenals erucazuur een preferentie voor de 1 en de 3 positie (Grynberg & Szczepanska, 1965; Appelqvist, 1970; Gurr et al., 1972; Calhoun; 1975 et al., Röbbelen & Thies, 1980; Ackman, 1983). Er is wel enige inbouw van erucazuur op de 2-positie, maar het is niet duidelijk of daarmee de grens bereikt is (Grynberg & Szczepanska, 1965). Bij mosterd en koolzaad worden op "single seed" niveau wel erucazuurgehaltenes van 70 % gevonden (Brune, Pleines mondeling) Het is in ieder geval nodig dat er meer inzicht komt in de rol van de 2-positie in de triacylglycerol-biosynthese en de functie van C18 vetzuren daarbij. Dit positieeffect kan immers ook een rol spelen bij de veredeling op olie met een hoog linol- en een laag linoleenzuurgehalte. Bij 0-rassen wordt gevonden dat de preferentie van meervoudig onverzadigde vetzuren, in verminderde mate, nog steeds aanwezig is (Ackman, 1983). Het lijkt daarnaast ook een zinnige zaak om genetische bronnen te zoeken waar meer erucazuur op de 2-positie wordt ingebouwd. Bij *Lunaria annua* (48 % 22:1, 2 % 20:1) wordt bijvoorbeeld gevonden dat alle eicoseenzuur op de 2-positie wordt ingebouwd. Mogelijk bestaan er zo ook bronnen voor inbouw van erucazuur op positie 2 (Grynberg & Szczepanska, 1965). Dit kan bij veredeling van koolzaad op erucazuurgehaltenes boven de 66 % van doorslaggevend belang blijken te zijn.

5.2 Consequenties van het wegvallen van de erucazuursynthese

Het is niet duidelijk in hoeverre het wegvallen van de mogelijkheid tot 22:1 synthese bij 0-rassen de synthese van andere vetzuren beïnvloed. Dit blijkt uit vergelijking van twee onderzoeken, waarbij klassieke rassen en hieruit veredelde lijnen met een laag erucazuurgehalte met elkaar werden vergeleken. Worden de hoeveelheden van de verschillende vetzuren (mg/zaad) van de klassieke en de erucazuur-arme lijn uitgedrukt als verhouding, dan levert dit, in 1 geval (Fowler & Downey, 1970) voor palmitinezuur, oliezuur, linolzuur en linoleenzuur een verhouding op van ongeveer 1:1.5 voor de klassieke respectievelijk de erucazuur-arme lijn. Bij het tweede onderzoek (Mc Killican, 1966) worden echter grote verschillen gevonden in de verhoudingen voor de diverse vetzuren. Het hoogste verhoudingsgetal wordt gevonden voor oliezuur (1:3.3), dit ligt een factor 2 tot 3 hoger dan voor de overige vetzuren. In beide onderzoeken vormt oliezuur de hoofdcomponent in de olie van de "laag erucazuurlijnen".

5.3 De biosynthese van erucazuur

De biosynthese van erucazuur verloopt door ketenverlenging van oliezuur, waarbij malonyl-CoA de C2-eenheden voor elongatie aanlevert en mogelijk NADPH dient als reductant (Ohlrogge et al., 1978; Pollard et al., 1979; Pollard & Stumpf, 1980a & b; Stumpf, 1983; Murphy & Mukherjee, 1988). Volgens Murphy en Mukherjee vormt oleoyl-CoA het substraat voor deze elongatie.

De lokalisatie van de elongases verantwoordelijk voor de ketenverlenging van oliezuur is nog niet opgehelderd. Volgens een onderzoek aan *Sinapis alba*, *Lunaria annua* en *Tropaeolum majus* bevindt de elongase-activiteit zich vooral in deeltjesfracties, die afcentrifugeren bij 15000 g (mitochondriën) en 2000 g (plastiden en kernen) en niet in de microsomale fractie of in de oleosomen (bij centrifugeren komen deze laatste als laag bovendrijven) (Murphy & Mukherjee, 1988). In een onderzoek aan *Crambe abyssinica* wordt de elongase-activiteit vooral aangetroffen in de oleosomen, maar daarnaast ook in deeltjesfracties die afcentrifugeren bij 800 g (plastiden en kernen) en 23000 g (mitochondriën) (Appleby et al., 1974). Volgens Appelqvist (1973) bevindt de elongase-activiteit zich in *B. campestris*, weliswaar deeltjesgebonden, in de microsomale fracties van cotylweefsel. Bij *Pisum sativum* is er ook een elongasesysteem aangetoond in microsomale

fracties. Dit systeem verlengt C18:0 tot C22:0 ook dit systeem gebruikt malonyl-CoA als C2 donor (Harwood, 1988) en NADPH als reductant.

5.4 Mogelijk een tweede locatie voor de oliezuursynthese

Bij *Limnanthes alba*, *Tropaeolum majus*, *Crambe abyssinica* en *Sinapis alba* is er bijna alleen sprake van labeling op het eerste en derde koolstofatoom van erucazuur, wanneer men gelabeld acetaat toedient aan cotylen uit onvolgroeid zaad. Labeling van het in erucazuur ingebouwde oliezuurskelet wordt nauwelijks gevonden. Wordt [1-¹⁴C] gelabeld oliezuur, aan onvolgroeid cotylweefsel van mosterd of crambe aangeboden, vindt men ook slechts geringe inbouw van de label in erucazuur (1,8 % en 2,7 % van de label in [5-¹⁴C] erucazuurbij mosterd en *Crambe*) (Appleby et al., 1974; Pollard & Stumpf, 1980a & b; Mukherjee, 1982).

Uit een onderzoek aan *Tropaeolum majus* (Oostindische kers), een plant die qua lipidebiosynthese sterk op koolzaad lijkt, kan men afleiden dat er twee verschillende locaties voor oliezuurbiosynthese in het zaad aanwezig zijn. Net als bij (klassiek) koolzaad dient oliezuur als "precursor" voor de synthese van erucazuur. Wanneer men ¹⁴C gelabeld acetaat toedient wordt er onder andere homogeen gelabeld oliezuur gevormd, er is dus sprake van een de-novo synthese van dit vetzuur. Dit ¹⁴C oliezuur wordt echter nauwelijks omgezet in erucazuur, Het komt alleen terecht in de polaire lipiden, die weinig erucazuur bevatten. Uit een pulse chase experiment blijkt bovendien dat er nauwelijks turnover van deze lipiden plaatsvindt. Als de biosynthese van 22:1 over deze polaire lipiden zou plaatsvinden zou alle 18:1 in de polaire lipiden in 2 dagen worden verbruikt. Hier is geen sprake van, er is dus mogelijk sprake van een tweede locatie, die ontoegankelijk is voor externe labeling via ¹⁴C acetaat, waar het oliezuur voor de erucazuur synthese wordt aangemaakt (Pollard & Stumpf, 1980a).

5.5 Enkele hypothesen over vorming van erucazuurrijke triacylglycerolen

Bij incorporatieproeven met ¹⁴C-acetaat in mosterd wordt gevonden dat de ¹⁴C-vetzuursamenstelling van fosfatidylzuur, fosfatidylcholine en diacylglycerolen sterke overeenkomst vertonen met elkaar. Dit is een aanwijzing dat deze drie lipideklassen gevormd worden volgens de Kennedyroute (G3P - PA - DG - PC; Kennedy, 1961, Mukherjee, 1982). De triacylglycerolen wijken af van de drie bovengenoemde lipiedklassen door een veel hoger gehalte aan

gelabeld erucazuur. Volgens Mukherjee zijn er twee schema's voor de vorming van triacylglycerolen in mosterdzaad (*S. alba*) mogelijk namelijk:

- 1) Verhoogde omzetting naar triacylglycerolen van diacylglycerolen waar al erucazuur is ingebouwd.
- 2) Versnelde vorming van triacylglycerolen uit diacylglycerolen in combinatie met erucazuur ten opzichte van combinaties met andere vetzuren.

Hiernaast zijn nog twee schema's mogelijk namelijk:

- 3) Uitwisseling van C18:1 aan triacylglycerolen tegen C22:1 uit bijvoorbeeld C22:1-CoA, waarbij C18:1CoA vrijkomt (voor C22:1 synthese?).
- 4) Ketenvlenging van C18:1 aan di/triacylglycerolen tot C22:1, mogelijk in combinatie met een acylexchange van C18:1 voor C22:1, dit naar analogie van recente modellen voor de desaturatie van oliezuur (Stymne & Glad, 1980 & 1982).

6 Conclusies

De kwaliteitseisen voor koolzaadolie zijn sterk afhankelijk van het doel waar de olie voor gebruikt wordt. Voor industrieel gebruik is een olie gewenst, met een hoog gehalte aan erucazuur. Deze markt is vooralsnog vrij klein, zodat meer aandacht wordt gegeven aan ontwikkeling van een erucazuurvrije olie met een hoog gehalte aan linolzuur, voor gebruik in voedingsmiddelen. Daar komt bij dat het gehalte aan linoleenzuur, sterk moet worden teruggedrongen.

Tot nu toe is er weliswaar koolzaadolie beschikbaar met een laag erucazuurgehalte, maar het linolzuurgehalte is slechts 20-25 % terwijl er in deze olie nog 10-15 % linoleenzuur aanwezig is, dit terwijl minder dan 2 % wenselijk is. Op grond van het totaalgehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren in de olie van diverse soorten uit het geslacht *Brassica* en enkele nauw verwante genera (Miller et al., 1965; Thies, 1971; Kumar & Tsunoda, 1980) en op grond van recente veredelingsresultaten (Jönsson & Persson, 1983; Roy & Tarr, 1984, 1986, 1987; Scarth et al., 1988) lijkt een linolzuurgehalte van 40-45 % in combinatie met een linoleenzuurgehalte van minder dan 5 % haalbaar, er is echter nog te weinig inzicht in de biosynthese van deze vetzuren, om uitspraken te doen over de haalbaarheid van nog hogere gehalten.

Voor het erucazuurgehalte lijkt een grens te bestaan, deze ligt rond de 66 % en wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat de 2-positie in triacylglycerolen uit koolzaadolie meestal bezet wordt door meervoudig onverzadigde vetzuren. Deze grens lijkt niet alleen te bestaan voor koolzaad maar ook voor andere Cruciferen met een hoog erucazuurgehalte. De rol van de 2-positie is een belangrijk punt voor onderzoek op korte termijn, temeer omdat deze waarschijnlijk ook een belangrijke rol speelt bij desaturatie van C18 vetzuren in de olie van koolzaad en verwante Cruciferen.

Er is nog veel onderzoek nodig voor dat de locatie en regulatie van linolzuur- en linoleenzuurbiosynthese in koolzaad en in planten in het algemeen zal zijn opgehelderd. Op korte termijn lijkt de rol van chloroplasten in het zaad van koolzaad een geschikte ingang voor onderzoek, dit om twee redenen. Ten eerste is het van belang te weten in hoeverre deze organellen in het zaad betrokken zijn bij de desaturatie van linolzuur naar linoleenzuur en wat voor invloed ze hebben op de oliekwaliteit. Daarnaast om te weten te komen of deze chloroplasten de vetzuursynthese in het zaad volledig dragen, of dat dit proces deels plaatsvindt in andere plastiden of misschien voor een deel zelfs buiten de plastiden.

Er lijkt weinig perspectief te zitten in teeltmaatregelen, met betrekking tot oliekwaliteit. Onderzoek in deze richting kan mogelijk wel van groot belang zijn voor optimalisering van de opbrengstvorming bij koolzaad, immers teeltmaatregelen zoals bemesting hebben hierop een grote invloed.

Een externe factor die een invloed heeft op de samenstelling van de olie is temperatuur. Het mechanisme achter dit effect is nog onbekend. Zo is het nog onduidelijk in welk stadium van de ontwikkeling van het zaad dit effect het sterkst aangrijpt. Wel duidelijk is dat bij klassieke rassen vooral de verhouding van erucazuur ten opzichte van de directe "precursors" van dit vetzuur wordt beïnvloed. De synthese van erucazuur bereikt een optimum rond 15 °C. gedurende de ontwikkeling van het zaad.

- Thomas, P.M. & Z.P. Kondra, 1973. Maternal effects on the oleic, linoleic, and linolenic acid content of rapeseed oil. *Canadian Journal of Plant Science* 53, 221-225.
- Volpe, J.J. & P.R. Vagelos, 1973. Saturated fatty acid biosynthesis and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology* 42, 21-60.
- Vreeke, S., 1987. Teeltmaatregelen en zaadproductie bij winterkoolzaad in Noord-Nederland. Verslag No. 63 PAGV, 36 pp.
- Weiss, A.E., 1983. *Oilseed Crops*. Longman London and Newyork 639 pp.
- Williams, J.P., G.R. Watson, S.P.K. Leung, 1976. Galactolipid Synthesis in *Vicia faba* Leaves II. Formation and Desaturation of Long Chain Fatty Acids in Phosphatidylcholine, Phosphatidylglycerol, and the Galactolipids. *Plant Physiology* 57, 179-184.
- Williams, J.P., 1980. Galactolipid synthesis in *Vicia faba* leaves. Redistribution of ^{14}C -labelling in the polar moieties and the ^{14}C -labelling kinetics of the fatty acids of the molecular species of mono- and digalactosyldiacylglycerols. *Biochimica et Biophysica Acta* 618, 461-472.
- Williams, J.P., M. Khan, K. Mitchell, 1982. Galactolipid biosynthesis in *Brassica napus* and *Vicia faba*; a comparison of lipid biosynthesis in 16:3 and 18:3-plants. In: Wintermans, J.F.G.M., P.J.C. Kuiper. *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*, 183-186.