

Kemien bag blomsters farvestoffer

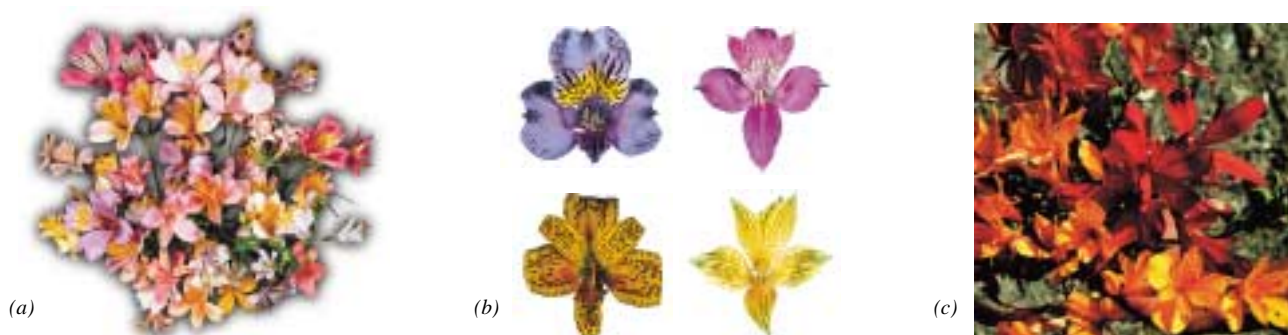
Blomsternes farve spiller en væsentlig rolle i naturen. De tiltrækker insekter til bestøvning, og for mennesker har de betydning i produktionen af prydplanter. Hvordan kan man forudsige blomsterfarver, og hvad er kemien bag?

Af Rikke Nørbæk, Lars Porskjær Christensen, og Kirsten Brandt, Danmarks JordbrugsForskning, Forskningscenter Årsløv

Planternes evne til at syntetisere en bestemt gruppe naturstoffer, de såkaldte anthocyaniner, er baggrunden for forskellige farver og nuancer i blomster, der går fra orange, rød, rød-violet til blå (figur 1). Gule og orange farver skyldes derimod ofte carotenoider, der tilhører en anden gruppe af naturstoffer, der også optræder som farvestoffer i bl.a. frugt og grøntsager.

phenoler [1,2]. Anthocyaninerne består af et aglycon, et såkaldt anthocyanidin, der er glycosyleret med forskellige sukkerarter. De enkelte glycosider kan så igen være acyleret med aromatiske syrer som f.eks. ferulasyre og kaffesyre og/eller mindre organiske syrer såsom malonsyre.

Grundfarven af det enkelte anthocyanin bestemmes af dets



Figur 1. Blomster forekommer i forskellige nuancer og farver her illustreret ved Alstroemeria-blomster. Den gule farve i blomsterne skyldes tilstedeværelsen af carotenoider. (a) Buket af Alstroemeria-arter og -hybrider, (b) Blomster fra Alstroemeria-hybrider, (c) Variation af blomsterfarver hos Alstroemeria aurea Graham.

Eksempelvis er pigmenterne i gule og orange liljer og morgenfruer carotenoider. Anthocyaniner hører til flavonoiderne, der er den største stofgruppe blandt naturligt forekommende

anthocyanidin, der typisk har absorbans mellem 500-650 nm.

De mest almindelige anthocyanidiner i blomster er pelargonidin, cyanidin, peonidin, delphinidin, petunidin og malvidin, og de mest udbredte anthocyaniner er anthocyanidin 3-glucosider og 3,5-diglucosider (figur 2). [1,2,3].

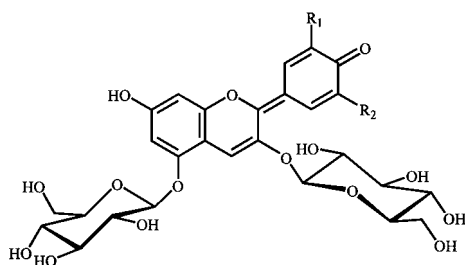
Forædling af blomsterfarver er foregået intensivt i årtier, men ofte ved tilfældige krydsningsforsøg. Kendskab til indhold og nedrivning af anthocyaninerne synes at kunne målrette forædlingen af nye blomsterfarver.

Anthocyaniner omdannes let til farveløse forbindelser i plantecellernes pH-område, og de burde derfor ikke spille nogen rolle som farvestoffer. At anthocyaniner alligevel udgør den vigtigste gruppe af naturlige farvestoffer skyldes forskellige stabiliseringsmekanismer, der bl.a. involverer kopigmenter og anthocyanineres acylgrupper.

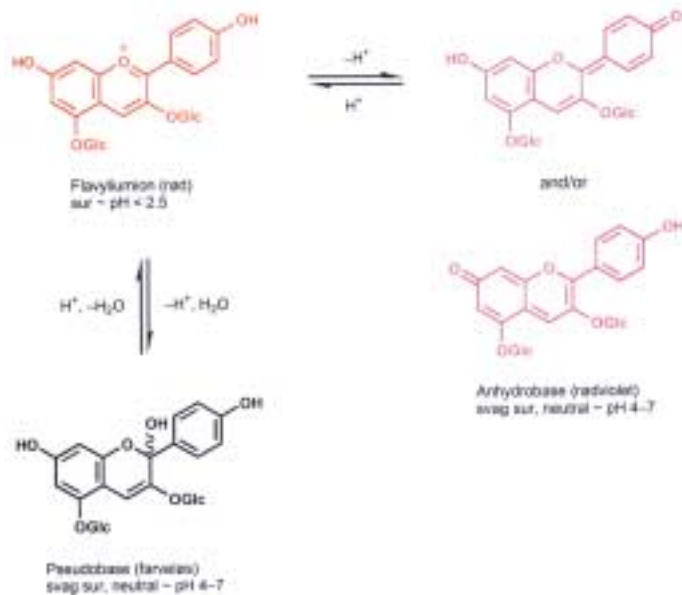
Kopigmentering, intramolekylærstabling og selvassociation

De enkelte anthocyanidiner er tillagt bestemte farver (figur 2). Farvetonerne afhænger af faktorer som pH, kopigmentering, intramolekylærstabling, selvassociation og evnen til at kompleksbinde til forskellige metalioner [3,4]. Sidstnævnte fører til meget stabile metalloanthocyaniner.

Figur 2. Eksempler på simple og udbredte naturligt forekommende anthocyaniner (anhydrobaseform).



R ₁	R ₂	Anthocyanin	Anthocyanidin (aglycon)	Farve
H	H	Pelargonin	Pelargonidin	Orange
OH	H	Cyanin	Cyanidin	Orange-rød
OCH ₃	H	Peonin	Peonidin	Orange-rød
OH	OH	Delphin	Delphinidin	Blå-rød
OCH ₃	H	Petunin	Petunidin	Blå-rød
OCH ₃	OCH ₃	Malvin	Malvidin	Blå-rød



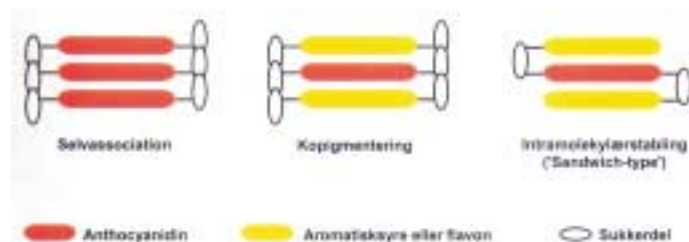
Figur 3. Ændringer i strukturen af anthocyaniner i vandig opløsning som funktion af pH (Glc = sukkerdel).

I stærkt surt miljø (pH < 2.5) danner anthocyaniner stabile flavyliumioner, hvis farve normalt er rød eller orange. I svagt surt til neutralt miljø (pH ~ 4-7) dannes først den rødviolette anhydrobase, der dog hurtigt omdannes til en farveløs pseudo-base ved hydrering (figur 3). Inde i blomstercellerne er pH imellem 4 og 6, hvilket betyder, at ligevægten skitseret i figur 3 er forskudt til fordel for pseudobaser, med mindre anhydro-baserne stabiliseres.

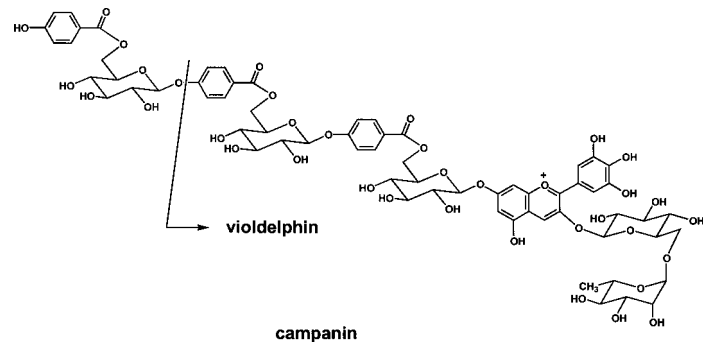
Kopigmentering har ud over en bathochromisk (forskydning af absorption til længere bølgelængde) effekt på anthocyaniner-nes absorptionsspektr og dermed farven også en stabiliserende effekt på anthocyaninerne.

De mest almindelig kopigmenter er flavoner, men også polyphenoler som f.eks. leucoanthocyanidiner kan agere som kopigmenter. Ved kopigmentering mellem et anthocyanin og et flavon er der hovedsagelig tale om intermolekylære hydrofobe interaktioner mellem de to pigmenter. Denne form for hydrofob stabling stabiliseres yderligere ved hydrofile glycosidgrupper på anthocyaninet og flavonen via hydrogenbindinger (figur 4). Anthocyaniner, der indeholder en aromatisk acylgruppe, danner mere stabile kopigmentkomplekser med flavoner end ikke-acylerede anthocyaniner. Anthocyaniner, der indeholder to eller flere aromatiske acylgrupper som f.eks. violdelphin og campanin [5] (figur 5), stabiliseres i højere grad ved intramolekylær-stabling (»sandwich«) end ved kopigmentering [3-6].

Ved en intramolekylærstabling (»sandwich«) er der tale om samme mekanisme som ved kopigmentering. Her stables aromatiske syrer og/eller mindre organiske syrer bundet til glycosiddelen af anthocyaninet intramolekylært over og under anthocyanidinstrukturen (figur 4).



Figur 4. Stabiliseringsmekanismer for anthocyaniner i planteceller.



Figur 5. Eksempel på to anthocyaniner, campanin og violdelphin, der indeholder adskillige aromatiske acylgrupper og som er med til at give Campanula-blomsterne deres intense blå farve.

VIBRA Digitalvægte
Produced by Ohaus Corporation

Prisbillige laborievægte fra kr. 5.500,- ex moms

Stor præcision

Hurtigt respons
 10 modeller fra 220g til 12kg
 opløsning 0,001g - 0,1g
 Stort display 16,5mm
 Bar graf
 RS232 interface
 5 års garanti

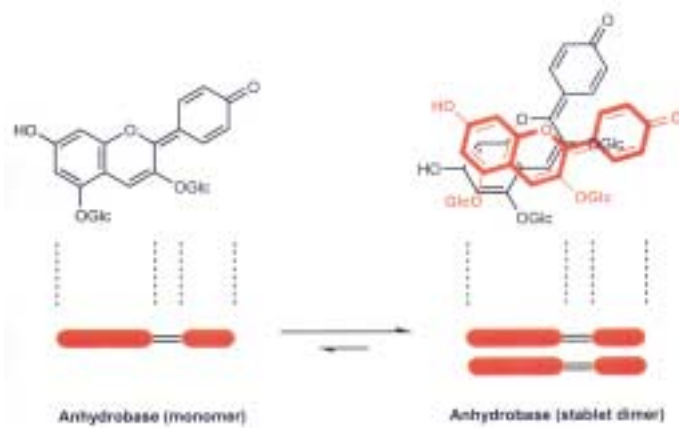
Bøgekildevej 7B
 8361 Hasselager
 Tlf. 8625 8899
 FAX 8625 5889
 salg@atimco.dk
 www.atimco.dk

Rekvirer brochure på VIBRA produkter

IMPORTØR

ATIMCO

Besøg vor internetbutik www.atimco.dk



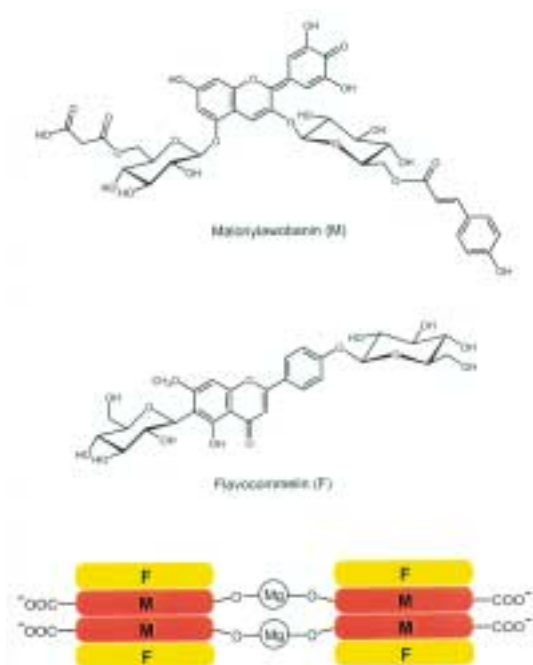
Figur 6. Eksempel på selvassociation af anthocyaniner.

Ved relativt høje koncentrationer af anthocyanin kan farveintensiteten øges mere end proportionalt med anthocyaninkoncentrationen. Det kan forklares ved, at anthocyaninerne deltager i selvassociationsreaktioner. Ved selvassociationsreaktioner imellem anthocyaniner vil der under stablingen være hydrofobe interaktioner mellem de aromatiske dele af anthocyaninernes struktur (figur 6). Det kan afhængig af stablingen resultere i en hypsochromisk (forskydning af absorption til kortere bølgelængde) eller bathochromisk effekt.

I kronbladene fra *Commelina communis* («Dayflower») findes et usædvanligt stabilt pigment, commelinin, der består af seks anthocyaniner (malonylawobanin) og seks flavonenheder (flavocommelin) forbundet til to magnesiumatomer (figur 7) [3,5]. Tilsvarende metalloanthocyaniner er fundet i blå kornblomster, hortensia og lupin.

Genetisk styring af blomsterfarven

I forædling af prydplanter har vedvarende krydsning og selektion resulteret i et bredt udvalg af blomsterfarver og mønstre. Desuden har genteknologer brugt anthocyaninbiosyntesen som modelsystem til at skabe nye farver på flere



Figur 7. Illustration af commelinin-pigmentets struktur set fra siden.

arter. Der er f.eks. fremstillet blå roser og nye nuancer på texasklokke, nellike og gerbera.

Petunia var den første plante, hvor det lykkedes at ændre blomsterfarven vha. rekombinante DNA-teknikker [7]. Petunia af den almindelige lilla type er ikke naturligt i stand til at danne orange pelargonidin-derivater. Men ved at indsætte et gen fra majs er det lykkedes at få orangeblomstrende petunia.

Endelig kan kendskab til nedarvningsmønstret af hvert enkelt anthocyanin, og hvilken nuance det forårsager i kronbladene, være en stor hjælp til at fremavle blomster med bestemte farver. Det er bl.a. gjort i *Alstroemeria* (inkalilje), der har været dyrket som snitblomst siden 1950'erne. *Alstroemeria*-blomsten kan have farver fra pink, rød, orange til lilla eller violet (figur 1). Anthocyaninerne, der er ansvarlige for dette farvespektrum i *Alstroemeria*-blomsten, er vist i figur 8 [8,9].

På grundlag af farvemålinger og kemiske analyser er sammenhængen mellem kronbladenes farve og de forskellige typer af anthocyaniner i *Alstroemeria* blevet bestemt.

Sammenhæng mellem blomsterfarve og anthocyaninstruktur

Sammenhængen mellem blomsterfarve og anthocyaniner/flavonoider kan bestemmes ved at sammenholde overfladefarven på friske kronblade med indholdet af anthocyaniner og flavonoider. Overfladefarven på friske kronblade måles ved Hunter kolorimetri (HunterLab D25 DP-9000) og udtrykkes ved farvetonen h (= hue), som går fra blå (negative værdier) til orange (positive værdier). De enkelte anthocyaniner og flavonoider isoleres ved præparativ HPLC og identificeres ved 1D og 2D NMR-spektroskopiske teknikker og massepektrometri, og indholdet i kronbladene bestemmes ved analytisk HPLC [8,9].

Indholdet af anthocyaniner og flavonoider i kronbladene sammenholdes med overfladefarven, hvorved blomsterfarven som funktion af indhold af anthocyaniner og flavonoider kan bestemmes. I *Alstroemeria* er blomsterfarven som funktion af indhold af anthocyaniner og flavonoider givet ved følgende udtryk [8]:

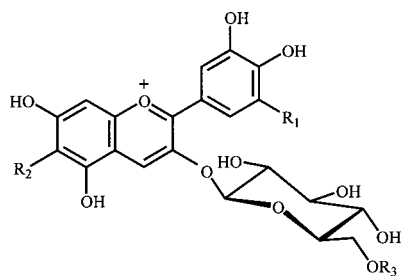
$$h = \arctan(b^*/a^*) = 0.573 + 3.044A + 0.005B - 0.079C - 0.010D - 0.028AB + 0.0004CD + 0.001C^2$$

- A: indhold af anthocyanin/indhold af andre flavonoider,
 B: procentvis indhold af 6-hydroxycyanidin 3-rutinosid og 6-hydroxycyanidin 3-malonylrutinosid,
 C: procentvis indhold af delphinidin 3-rutinosid og delphinidin 3-malonylglucosid,
 D: procentvis indhold af 6-hydroxycyanidin 3-malonylrutinosid, delphinidin 3-malonylglucosid og cyanidin 3-malonylglucosid.
 AB, CD og C²: vekselvirkninger.

Som det fremgår af formelen, afhænger de røde og lilla blomsterfarver i *Alstroemeria* af bestemte kemiske karakterer. Procentvist højt indhold af delphinidin-anthocyaniner og malonerede anthocyaniner giver anledning til en mere blålig farvetone i *Alstroemeria*-blomsterne. Højt indhold af i sig selv farveløse flavonoider giver ligeledes mere blålige blomster, hvilket skyldes kopigmentering, der forårsager et bathochromisk skift af anthocyaninernes absorptionsspektrum, så de fremstår mere blå end uden stabiliseringen fra kopigmenterne (flavonoiderne). Højt indhold af 6-hydroxycyanidiner eller cyanidanthocyaniner giver anledning til henholdsvis en rød-orange og en klar rød farve i *Alstroemeria* (figur 1).

Nedarvningsmønster for anthocyaniner

Hvordan hvert enkelt farvestof nedarves bestemmes ved chromatografiske analyser af indholdet af anthocyaniner i



R ₁	R ₂	R ₃	Anthocyanin
OH	OH	Rhamnosyl	6-Hydroxydelphinidin 3-rutinosid
H	OH	Rhamnosyl	6-Hydroxycyanidin 3-rutinosid
OH	H	Rhamnosyl	Delphinidin 3-rutinosid
H	H	Rhamnosyl	Cyanidin 3-rutinosid
OH	H	Malonylrhamnosyl	6-Hydroxycyanidin 3-malonylrutinosid
OH	H	Malonyl	Delphinidin 3-malonylglucosid
H	H	Malonyl	Cyanidin 3-malonylglucosid

Figur 8. Anthocyaniner (flavyliumion) i *Alstroemeria*-blomsten.

afkom og deres forældre. I det følgende tages udgangspunkt i, hvordan dette er gjort for *Alstroemeria*-blomster.

Det procentvise indhold af de forskellige anthocyaniner i *Alstroemeria* afkommets blomster var i de fleste tilfælde lig gennemsnittet af forældrenes procentvise indhold. Den samlede anthocyaninkoncentration og anthocyanin-flavonoidforholdet



Figur 9. Blomster af henholdsvis *Alstroemeria pelegrina* L., *A. philippii* Baker og deres afkom (*A. pelegrina* × *A. philippii*).

var generelt lidt højere i hybrider end i forældrene. Der var dog to arter, *A. pelegrina* og *A. versicolor*, der generelt fik afkom med relativt højt indhold af delphinidiner (delphinidin 3-rutinosid og delphinidin 3-malonylglucosid), selvom de selv havde et lavt indhold (et eksempel på komplementære gener).

For at udnytte resultaterne i et forædlingsprogram bør man overveje, hvilke kombinationer af karakterer, der vil give de ønskede blomsterfarver. For at opnå en intens blålilla farve må man vælge en forældreplante med højt indhold af pigment og en med et procentvis højt indhold af delphinidin 3-rutinosid og delphinidin 3-malonylglucosid.

Det bedste valg kunne eksempelvis være at kombinere en genotype med dybrøde blomster (procentvist højt indhold af malonerede cyanidinglycosider) med en lys blålig type (procentvist højt indhold af delphinidinglycosider). Figur 9 viser netop resultatet af en krydsning mellem den røde *A. pelegrina* og den blå *A. philippii*, hvor afkommet er intenst blåfarvet, og resultatet af de kemiske analyser er anført i tabel 1.

Tilsvarende vil der for at få røde blomsterfarver skulle bruges forældreplanter med højt procentvist indhold af cyanidinglycosider uden malonering eller maloneret 6-hydroxy-

Anthocyanin	<i>Alstroemeria</i> art/hybrid (procentvis indhold)		
	<i>A. pelegrina</i>	<i>A. philippii</i>	Hybrid
6-Hydroxydelphinidin 3-rutinosid	0,0	0,5	0,8
6-Hydroxycyanidin 3-rutinosid	0,7	0,0	0,9
Delphinidin 3-rutinosid	0,7	66,4	61,4
Cyanidin 3-rutinosid	39,9	1,3	1,3
6-Hydroxycyanidin 3-malonylrutinosid	0,0	0,0	0,0
Delphinidin 3-malonylglucosid	0,0	29,8	31,6
Cyanidin 3-malonylglucosid	58,7	2,0	4,0
Total koncentration af anthocyaniner (µM)	110	50	100

Tabel 1. Indhold af anthocyaniner i *Alstroemeria*-blomsterne *A. pelegrina* og *A. philippii* og deres afkom (hybrid).

cyanidinglycosider. Orange blomsterfarver kan kun opnås med et procentvist højt indhold af 6-hydroxycyanidiner uden malonering.

E-mail-adresser:

Rikke Nørbæk: rikke.nørbæk@agrsci.dk

Lars Porskjær Christensen: larsp.christensen@agrsci.dk

Kirsten Brandt: kirsten.brandt@agrsci.dk

Referencer

- Harborne JB (ed.). *The Flavonoids: Advances in research since 1980*. Chapman & Hall, London, 1988.
- Harborne JB (ed.). *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London, 1996.
- Goto T and Kondo T. Structure and molecular stacting of anthocyanins flower color variation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991; 30: 17-33.
- Goto T. Structure, stability and colour variation of natural anthocyanins. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 1987; 52: 113-158.
- Brandt K, Kondo T, Aoki H and Goto T. Structure and biosynthesis of anthocyanins in flowers of *Campanula*. *Phytochemistry* 1993; 33: 209-212.
- Goto T, Tamura H, Kawai T, Hoshino T, Harada N and Kondo T. Chemistry of metalloanthocyanins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1986; 471: 155-172.
- Mol J, Grotewold E and Koes R. How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.* 1998; 3: 212-217.
- Nørbæk R, Christensen LP and Brandt K. An HPLC investigation of flower colour and breeding of anthocyanins in species and hybrids of *Alstroemeria*. *Plant Breeding* 1998; 117: 63-67.
- Nørbæk R, Christensen LP, Bojesen G and Brandt K. Anthocyanins in Chilean species of *Alstroemeria*. *Phytochemistry* 1996; 42: 97-100.

Ny professor i farmakologi

Cand.scient., ph.d. Jesper Lindgren Gromada, 38 år, er fra 1. juni 2003 ansat som professor i farmakologi ved Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet.

Jesper Lindgren Gromada forsker i sukkersyge, og han arbejder især på at undersøge de cellulære processer, som ligger til grund for frisætning af insulin og glukagon fra bugspytkirtlen. Insulin og glukagon spiller en central rolle for regulering af kroppens blodsukkerkoncentration.

