



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I493033 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：099109119

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 26 日

(51)Int. Cl.: C12N15/82 (2006.01)

A01H1/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/03/27 日本

2009-080524

2009/05/12 日本

2009-115722

2009/07/24 日本

2009-173096

(71)申請人：三得利控股股份有限公司 (日本) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)
日本

(72)發明人：福井祐子 FUKUI, YUKO (JP)；田中良和 TANAKA, YOSHIKAZU (JP)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

CN 1836039A

Y. Fukui, "Two novel blue pigments with ellagitannin moiety, rosacyanins A1 and A2, isolated from the petals of Rosa hybrida", Tetrahedron, 2006, Vol. 62, No. 41, p.9661~9670.

Y. Fukui, "Structure of rosacyanin B, a novel pigment from the petals of Rosa hybrida", Tetrahedron Letters, 2002 Vol. 43, No. 14, p.2637~2639.

審查人員：陳逸霖

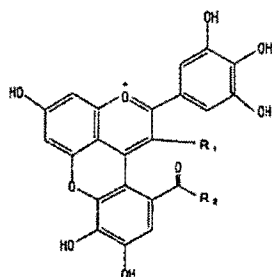
申請專利範圍項數：6 項 圖式數：14 共 45 頁

(54)名稱

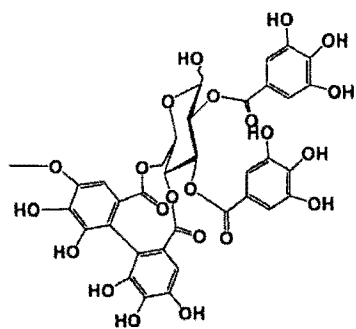
藍玫瑰所包含之新穎化合物

(57)摘要

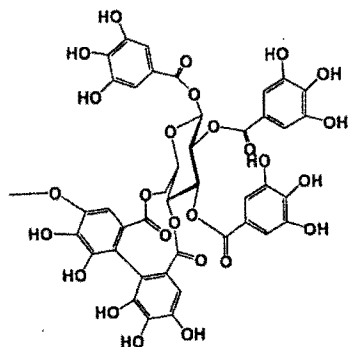
本發明提供一種藍玫瑰所含之新穎化合物。本發明之新穎化合物係含於藍玫瑰中，且具有下述通式(I)所示之化學結構：



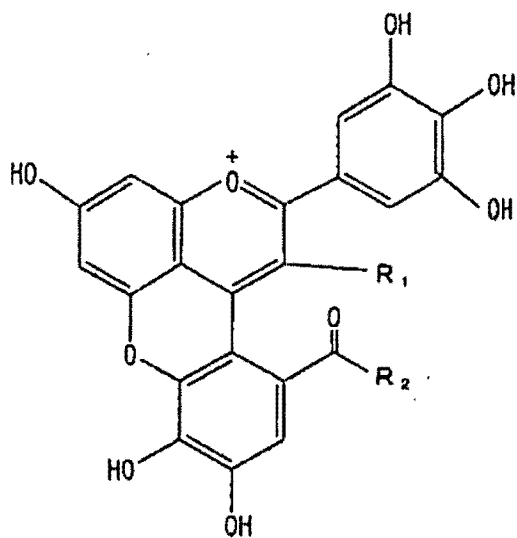
式中， R_1 為下式所示之基，且 R_2 為 -OH；



或是 R_1 與 R_2 共同形成 -O-；或者是， R_1 為下式所示之基，且 R_2 為 -OH；



但， R_1 中葡萄糖之 1 位羥基的配位(波狀線)表示 α 體與 β 體的互變異構現象。本發明亦提供含有該新穎化合物之薔薇科植物及其一部份。



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99109119

※申請日：

※IPC分類：

C12N15/82 (2006.01)

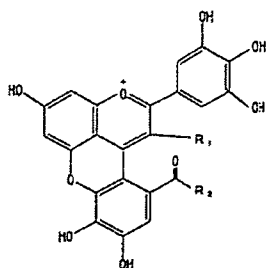
一、發明名稱：(中文/英文)
99. 3. 26

藍玫瑰所包含之新穎化合物

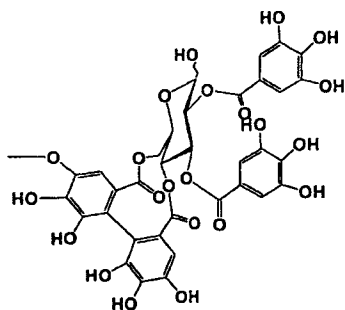
二、中文發明摘要：

A01H1/00 (2006.01)

本發明提供一種藍玫瑰所含之新穎化合物。本發明之新穎化合物係含於藍玫瑰中，且具有下述通式(I)所示之化學結構：

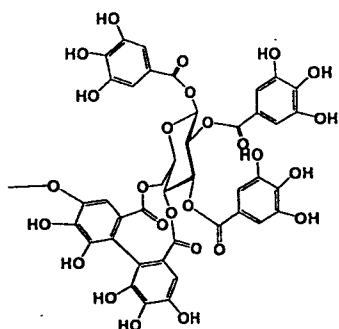


式中， R_1 為下式所示之基，且 R_2 為 $-OH$ ；



或是 R_1 與 R_2 共同形成 $-O-$ ；

或者是， R_1 為下式所示之基，且 R_2 為 $-OH$ ；



但， R_1 中葡萄糖之1位羥基的配位(波狀線)表示 α 體與 β 體的互變異構現象。本發明亦提供含有該新穎化合物之薔薇科植物及其一部份。

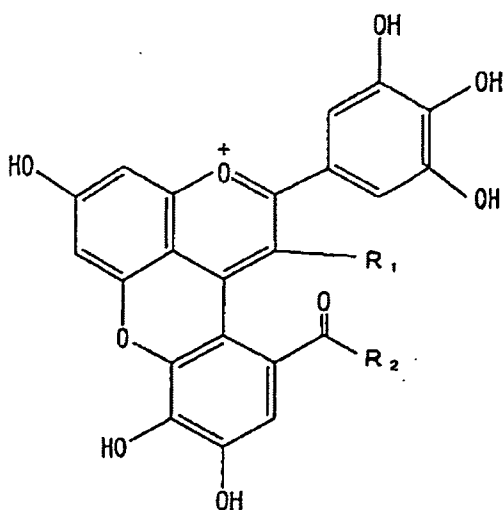
三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (無) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

技術領域

本發明關於一種玫瑰色素(即新穎化合物)及含有該色素之玫瑰等植物以及該植物的一部份，該植物可藉由基因重組而被賦予產生飛燕草素(delphinidin)之能力。此外，本發明亦關於一種使用該化合物來改變植物花色之方法。

【先前技術】

背景技術

玫瑰是一種用作切花而甚為重要的植物，其色素已受到詳細之調查。例如，花青素系色素已知有矢車菊素3, 5-雙葡萄糖苷、天竺葵花色苷基3, 5-雙葡萄糖苷、矢車菊素3-葡萄糖苷、天竺葵花色苷基3-葡萄糖苷、peonidin3, 5-雙葡萄糖苷、peonidin3-葡萄糖苷等。包含該等色素之花青素的生合成通路已為人所知。

此外，利用基因重組而表現出類黃酮3', 5'-氫氧化酶基因之玫瑰(參照下述專利文獻1及專利文獻2)會生產飛燕草素苷(以下，亦稱為飛燕草素3, 5-雙葡萄糖苷)。此時，類黃酮中B環之5'位的羥化反應被認為是發生在黃烷酮或二氫黃酮醇之階段。由於類黃酮3', 5'-氫氧化酶係存在於內質網(endoplasmic reticulum)之細胞色素P450的一種，現今認為該羥化反應係發生於內質網上。催化花青素類之生合成反應的酵素(例如花青素糖轉移酶)不具有訊息肽等之序列，且為可溶性蛋白質，因而存在於細胞之細胞質中。花青素類

於經糖加成後，藉由pump而運送至液泡中。

另一方面，已有報告指出，至少有一部份玫瑰存有化合物玫瑰花青苷(Rosacyanin)類(參照第1圖)，且亦已決定玫瑰花青苷A1、玫瑰花青苷B及玫瑰花青苷A2等之結構(例如，參照以下專利文獻3或非專利文獻1)。

由於玫瑰花青苷在其部分結構中具有矢車菊素骨架，因此可以想見，其以矢車菊素、與矢車菊素共通之前驅物或是矢車菊素之類似物為基礎而被合成出的可能性。然而，這並未超出推測的範疇，實際上，就玫瑰花青苷可以何種物質為前驅物並經由何種路徑來合成出一事，目前仍尚未明朗化。

另一方面，如前所述，藉由基因重組而表現出類黃酮3', 5'-氫氧化酶基因之玫瑰中，飛燕草素係取代矢車菊素之部分而被合成出。假設上述針對玫瑰花青苷合成路徑之假說(即，玫瑰花青苷是否係以矢車菊素為前驅物而合成出的假說)正確，於幾乎不存有矢車菊素(將成為前驅物)之該等基因重組玫瑰中，將不會合成出玫瑰花青苷類。

本案發明人為了獲得有關玫瑰花青苷合成系之知識與見解，而使用專利文獻1或專利文獻2所記載之幾乎不含有矢車菊素(或是與宿主相較下矢車菊素含量顯著低落)的上述基因重組玫瑰進行解析，結果與預測相反，發現其存在有一種新穎化合物，該化合物與原本玫瑰所具有之玫瑰花青苷類在化學結構上明顯不同。再者，已明確得知該新穎化合物僅專一性地存在於藉由基因重組而表現出類黃酮3',

5'-氫氧化酶基因的玫瑰，而終至完成本發明。

先行技術文獻

專利文獻

【專利文獻1】國際公開WO2004/020637公報

【專利文獻2】國際公開WO2005/017147公報

【專利文獻3】日本特開2002-201372號公報

非專利文獻

【非專利文獻1】Tetrahedron 62(2006)9661-9670

【發明內容】

發明概要

發明欲解決之課題

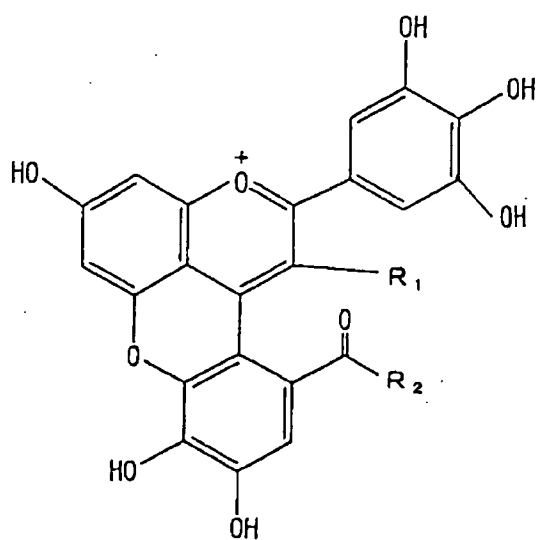
本發明所欲解決之課題在於提供一種新穎化合物(係玫瑰色素)、含有該色素之玫瑰等植物以及其一部份，特別是，該植物係藉由基因重組而被賦予生產飛燕草素之能力。此外，本發明所欲解決之課題亦在於提供一種使用該化合物來改變植物花色之方法。

解決課題之手段

本發明係如下所述。

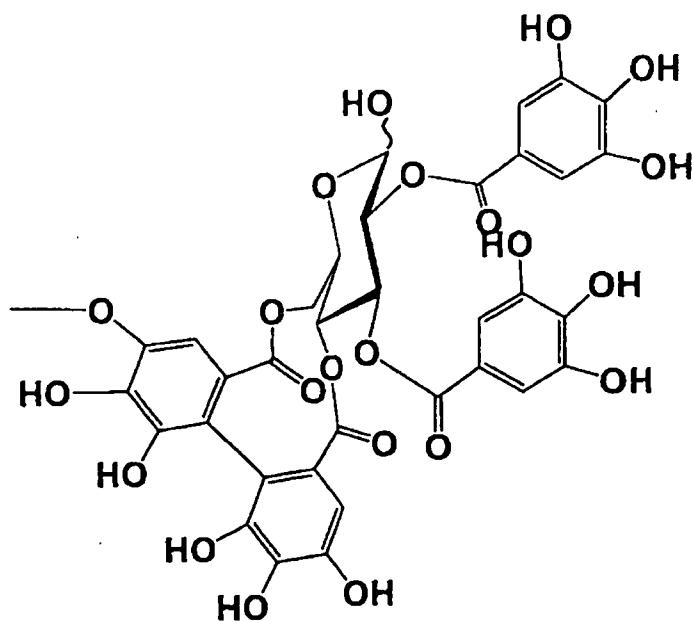
[1] 一種下述通式(I)所示之化合物：

【化1】



式中， R_1 為下式所示之基，且 R_2 為 $-OH$ ；

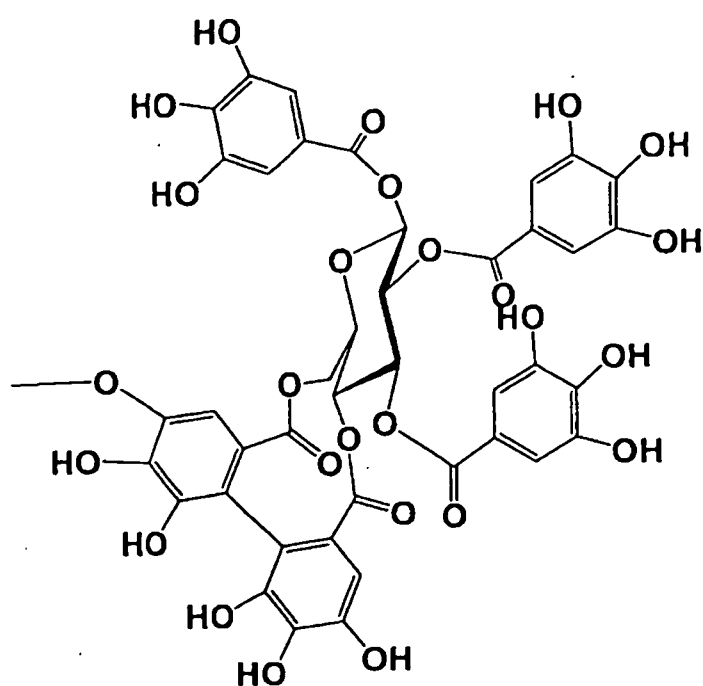
【化2】



或者 R_1 與 R_2 共同形成 $-O-$ ；

或者是， R_1 為下式所示之基，且 R_2 為 $-OH$ ；

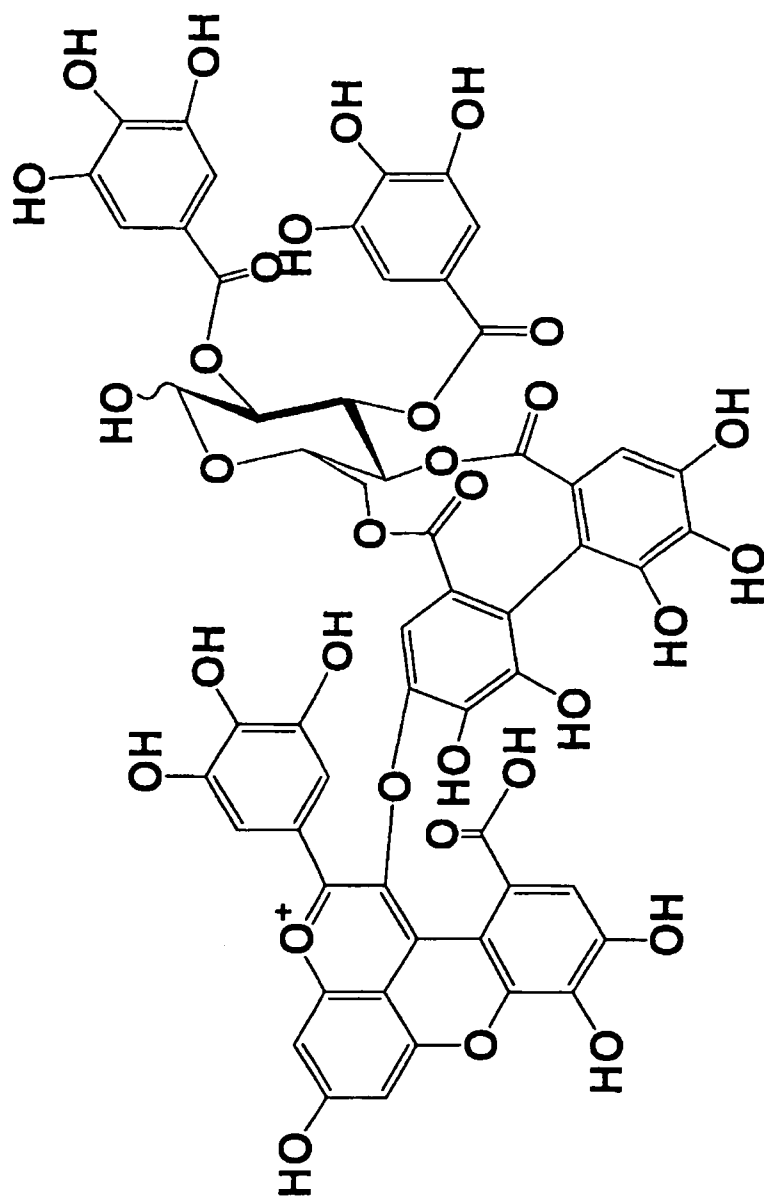
【化3】



但是， R_1 中葡萄糖之1位羥基的配位(波狀線)表示 α 體與 β 體的互變異構現象。

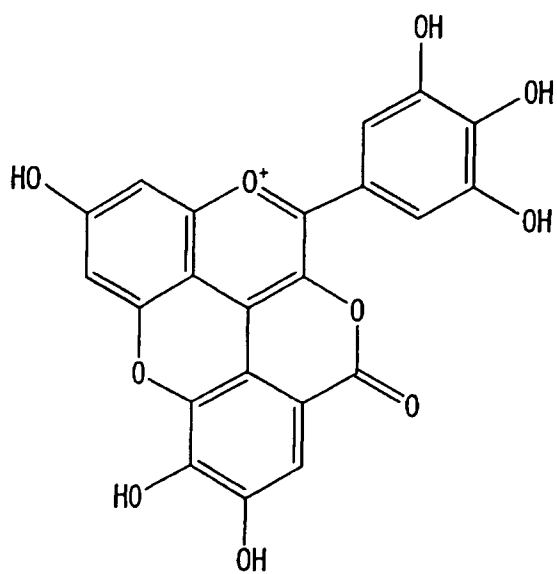
[2]一種下式所示之化合物：

【化 4】



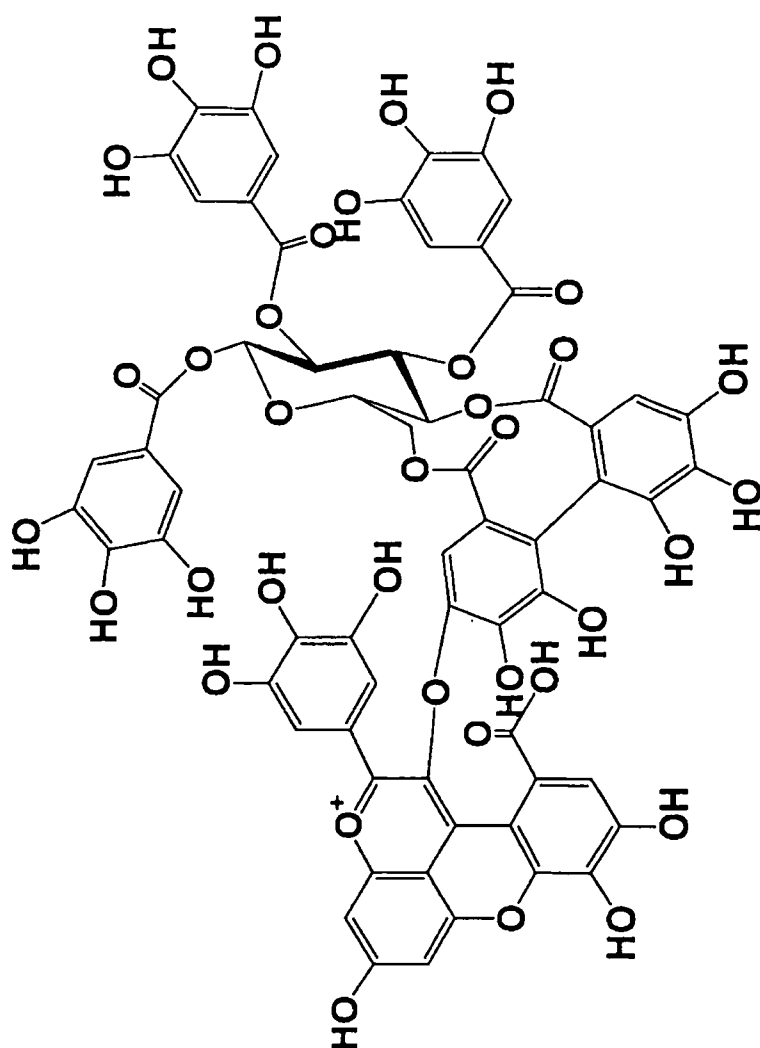
[3] 一種下式所示之化合物：

【化 5】



[4]一種下式所示之化合物：

【化 6】



[5] 一種植物，含有如[1]至[4]中任一項之化合物，但該植物於自然狀態下並不含該化合物。

[6]如[5]之植物，其係薔薇科植物。

[7]如[6]之植物，其中前述薔薇科植物為薔薇科薔薇屬植物。

[8]如[7]之植物，其中前述薔薇科薔薇屬植物為薔薇科薔薇屬之玫瑰。

[9]一種植物部份，其係如申請專利範圍第5至8項中任

一項之植物的一部份。

[10]如[9]之植物部分，其係切花。

[11]一種切花加工品，係使用如[10]之切花者。

[12]一種改變植物花色之方法，係使用如[1]至[4]中任一項之化合物者。

[13]如[12]之方法，其中前述植物為薔薇科植物。

[14]如[13]之方法，其中前述薔薇科植物為薔薇科薔薇屬植物。

[15]如[14]之方法，其中前述薔薇科薔薇屬植物為薔薇科薔薇屬之玫瑰

發明之效果

藉由本發明，而從藍玫瑰花瓣中抽提出新穎色素並予以分離及純化，而解明其化學結構。這將會成為以基因工程手法改變玫瑰花色以製作出新穎薔薇科植物的研究基礎。此外，舉例來說，可將本發明之新穎色素使用在令玫瑰等之切花吸收俾以改良切花顏色，亦可作為植物性天然色素而利用在例如飲食品之加色上。

圖式簡單說明

第1圖顯示矢車菊素、飛燕草素及玫瑰花青苷之化學結構式。

第2圖顯示已導入至紫藤色系玫瑰品種「LAVANDE」之質體pSPB919的結構。

第3圖為藍色色素(1)於30%乙腈、0.5%TFA中之可視~紫外吸收光譜圖。

第4圖為以HPLC分析藍色色素(1)時之層析圖，因該化合物之葡萄糖1位羥基顯示出 α 體與 β 體之互變異構現象，而可見到2個尖峰。

第5圖為紅色色素(2)於30%乙腈、0.5%TFA中之可視~紫外吸收光譜圖。

第6圖為以HPLC分析紅色色素(2)時之層析圖。

第7圖為藍色色素(3)於30%乙腈、0.5%TFA中之可視~紫外吸收光譜圖。

第8圖為藍色色素(1)之化學結構式。圖中，葡萄糖羥基之配位(波狀線)顯示 α 體與 β 體之互變異構物。

第9圖為紅色色素(2)之化學結構式。

第10圖為藍色色素(3)之化學結構式。

第11圖為第8圖所示藍色色素(1)之 ^1H NMR光譜圖。

第12圖為第8圖所示藍色色素(1)之 ^{13}C NMR光譜圖。

第13圖為第9圖所示紅色色素(2)之 ^1H NMR光譜圖。

第14圖顯示已導入至紫藤色系玫瑰「WKS82」之質體pSPB130的結構。

【實施方式】

本發明之實施形態

本發明之新穎色素所具有的結構係於習知物質之玫瑰花青苷A1、玫瑰花青苷B及玫瑰花青苷A2(B環之羥基數量為2個)的B環上更額外附加有1個羥基。換言之，本發明之新穎藍色色素可說是一種具有藍色色素之飛燕草素(已確認存在於藍玫瑰之習知物質)部分結構(B環之羥基數量為3

個)的新穎化合物。

如專利文獻1或2所記載，藉由使藍色基因(類黃酮3', 5'-氫氧化酶)發揮機能，藍玫瑰中會存有習知玫瑰品種植物所不存在之藍色色素(於B環具有3個羥基)。此次，則將此種用作藍色色素之化合物(所具有之結構係在習知物質之玫瑰花青苷A1、玫瑰花青苷B及玫瑰花青苷A2(B環之羥基數量為2個)的B環上更額外增加1個羥基)予以分離、純化，並以TOF-MS及NMR鑑定之，決定其結構。

本發明之3種化合物分別為顯示如第3圖、第4圖、第11圖及/或第12圖所示數據的化合物，或是顯示如第5圖、第6圖、第9圖及/或第13圖所示數據之化合物，或者是顯示如第7圖所示數據之化合物。

花青素(anthocyanin)類(例如與矢車菊素(cyanidin)相較下分子量較大之玫瑰花青苷類)因其B環更額外增加1個羥基而具有3個羥基，溶解度提升效果更為提高的結果，認為其是一種輸送至花瓣細胞之液泡後在表現藍色上更有效之色素。此外，玫瑰花青苷類與一般色素相較下，具有可於植物體內合成的優異特徵。又，本發明提供一種含有第8~10圖所示化合物之植物。但，該植物於自然狀態下不含該化合物，或是其花瓣中不存在有可測出之量的該化合物。此外，本發明提供一種使用第8至10圖之化合物來改變植物花色的方法。例如，可藉由基因工學手法，將與本發明化合物之合成相關之酵素的基因導入對象植物，使該化合物於植物花瓣內合成可檢測出之預定量，藉此即可取得本發明

之化合物。或者，亦可採用使植物直接吸收本發明之化合物的物理性方法，但，對象植物含有該化合物之態樣並不侷限於上述者。

本發明之植物體係於花瓣內含有第8~10圖所示之化合物。植物體花瓣中之該等化合物的含有率並未特別受限，但以花瓣濕重量計宜為0.00001mg/g以上。下限值更宜為0.0001mg/g以上，尤宜為0.0007mg/g以上。上限值則宜為1mg/g以下，更宜為0.5mg/g以下，而以0.13mg/g以下尤佳。

對象植物之例可列舉如玫瑰、菊花、康乃馨、金魚草、仙客來、蘭花、洋桔梗、小蒼蘭、非洲菊、唐菖蒲、霞草、長壽花、百合、天竺葵屬植物(Pelargonium)、天竺葵(geranium)、矮牽牛、夏堇(Torenia)、鬱金香、水稻、大麥、小麥、油菜、馬鈴薯、番茄、楊樹、香蕉、尤加利、番薯、大豆、苜蓿、羽扇豆、玉蜀黍及花椰菜等，但並不侷限於該等植物。

其中，以薔薇科植物為佳，且更宜為薔薇科薔薇屬植物，尤宜為以雜交玫瑰(*Rosa hybrida*)代表之薔薇科薔薇屬玫瑰。本發明亦關於前述植物之一部分(特別是切花)及使用該切花之切花加工品。於此，切花加工品包含使用該切花之押花、保鮮花(preserved flower)、乾燥花及樹脂封入品等，但並不限於此。

實施例

以下，藉實施例更為具體地說明本發明。

實施例1：色素化合物之分離、純化

以藍玫瑰作為抽提來源，分離出本發明之色素化合物並予以純化。

製作出已導入有質體pSPB919之品種Lavende

製作出抽提來源之藍玫瑰。藉由以下所示之方法，製作出導入有質體pSPB919之品種Lavende。

從藍色鳶尾花切花之花瓣取得RNA，再從其調製出polyA⁺ RNA。使用cDNA基因庫作製套組(Stratagene社)，並以製造者建議之方法，從該polyA⁺ RNA製作出將λZAPII(Stratagene社)作為載體之cDNA基因庫。鳶尾花之DFR基因片段係與取得龍膽花DFR基因片段之報告作同樣處理(Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 37, 711-716, 1996)。

使用製造者建議之方法，以Geneclean回收所得之約400bp的DNA片段，次選殖(subcloning)至pCR-TOPO。於決定其鹼基序列時發現與玫瑰DFR基因相同之序列。使用該DNA片段篩選鳶尾花cDNA基因庫，獲得含有全長胺基酸序列之鳶尾花DFRcDNA。其中，決定了pSPB906之選植株(clone)所含cDNA的全鹼基序列(鹼基序列與胺基酸序列請參照專利文獻2之序列編號9與序列編號10)。

接著，以BamHI與XhoI消化pSPB580而獲得約3.9kb之DNA片段，以BamHI與XhoI消化pSPB906而獲得約1.5kb之DNA片段，令連結該等片段而獲得之質體為pSPB909。

於植物中，玫瑰DFRcDNA之雙股RNA的轉錄係如下述般進行。將以PstI部分消化pCGP1364(Tanaka et al. Plant Cell Physiol. (1995)36 1023-1031)所獲得之約3.5kb的DNA

片段(含MacI啟動子、玫瑰DFRcDNA及mas終止子)插入pUC19(Yanisch-Perron C et al., Gene 33: 103-119, 1985)之PstI部位，藉此所得之質體中，令pUC19之HindIII部位接近MacI啟動子者為pCGP1394。

接著，連結下述片段而獲得pSPB185，即：以HindIII與SacII消化pCGP1394而獲得之約1.4kb的DNA片段；以PstI消化pCGP1394後使其末端平滑化，更以SacII消化而獲得之約1.9kb的DNA片段；及，以SacI消化pBinPLUS後，使其末端平滑化，更以HindIII消化而獲得之雙偶載體(binary vector)片段。以XbaI消化pSPB185，使其末端平滑化，藉由與SalI linker連接(ligation)而獲得pSPB521。藉由連結下述片段而獲得pSPB528：以HindIII與BamHI消化pUE6獲得之約700bp的DNA片段；以HindIII與SacI消化pSPB521而獲得之雙偶載體DNA片段；及，以BamHI與SacI消化pE2113而獲得之GUS基因DNA片段。

pSPB528為一種可將結構基因插入具有加強子之花椰菜鑲嵌病毒35S啟動子與甘露鹼合成酶終止子(mannopine synthase terminator)之間而表現於植物的雙偶載體。此外，為了使pCGP645所含玫瑰DFRcDNA之5' 非翻譯領域序列縮短，以SmaI與PvuI消化pCGP645後使其末端平滑化，連接而獲得pCGP645s。

模板使用pCGP645s，引子使用反向引子與合成引子RDF310(參照專利文獻2之序列編號19)，以PCR增幅而取得玫瑰DFRcDNA之5' 側序列，並選殖至pCRTPOPO。決定

DNA之鹼基序列，確認無PCR造成之錯誤。令其為pSPB569。此外，模板使用pCGP645s，引子使用反向引子與合成引子RDF830(參照專利文獻2之序列編號20)，以PCR增幅而取得長度相異之玫瑰DFRcDNA之5'側序列，並選殖至pCRTPO。決定DNA之鹼基序列，確認無PCR造成之錯誤。

令其為pSPB570。連結下述片段而獲得pSPB572：以BamHI與SacI消化pSPB528而獲得之雙偶載體DNA片段；以SacI與XhoI消化pSPB569而獲得之0.3kb的DNA片段；及，以BamHI與SalI消化pSPB570而獲得之DNA片段。本載體係設計成可於植物中轉錄玫瑰DFRcDNA之雙股RNA。

以SacI消化pUE6，使末端平滑化，插入SalI linker而獲得pUE8。以HindIII與EcoRI消化pUE8，並將所得DNA片段導入pBinPLUS之HindIII與EcoRI部位，令其為pSPB189。連結下述片段而製得pSPB567：以BamHI與SalI消化pSPB189而獲得之約3.7kb的DNA片段；及，以BamHI將pCGP1961完全消化後更以XhoI將其部分消化，而獲得之約1.8kb的DNA片段。以PacI消化pSPB572，進行脫磷酸化處理後，連結以PacI消化pSPB567而得之約2.8kb的DNA片段，選出nptII基因與源自三色堇之F3' 5' H#40會朝相同方向轉錄之質體，令其為pSPB905。

以AscI消化pSPB905，進行脫磷酸化處理後，連結以AscI消化pSPB909而獲得之約2.5kb的DNA片段，獲得鳶尾花DFR基因會轉錄成與nptII基因相同方向之質體，令其為

pSPB919(參照第2圖)。期待本質體會於玫瑰中轉錄源自鳶尾花之DFR基因與源自三色堇之F3' 5' H#40基因，並藉由雙股RNA之轉錄而抑制玫瑰之DFR基因表現。將該質體導入農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)Agl0菌株。

藉由感染該農桿菌而將pSPB919(參照第2圖)導入紫藤色系玫瑰品種「Lavende」，獲得轉形體。使轉形細胞細分化，獲得基因重組植物體之藍玫瑰(經導入質體pSPB919之品種Lavende)，再使其開花。

色素化合物之抽提、分離、純化、鑑定

以下述方法，從如上述般獲得之藍玫瑰(經導入質體pSPB919之品種Lavende)花瓣230g中純化出色素化合物。

使用均質器，於液態氮中將花瓣230g冷凍粉碎，加入1L含有0.5%TFA之50%乙腈並浸漬一晚。以旋轉蒸發器將經矽藻土過濾之濾液濃縮至約2/5の體積。

將該經濃縮之抽提液加至吸附樹脂HP-20(三菱化成(株))400ml。800ml水洗後，以1L之含0.1%TFA的20%乙腈、含0.1%TFA之60%乙腈逐步(stepwise)溶出。於60%分液(fraction)時溶出含有藍色色素之分液。

以下述分餾HPLC將該分液予以純化。管柱為Develosil-ODS-UG(野村化學社製)5cm ϕ * 50cm，移動相使用A:水、B:50%乙腈0.5%TFA，於流速32ml/min下，以B30%(保持30min)B30→B100%之線性梯度(50min)，保持20分鐘B100%。檢測係以A260nm進行。收集於67-82min溶出之含有藍色色素的分液，將其冷凍乾燥。反覆離析2次。

將該冷凍乾燥品1.2g加至已藉50%乙腈而平衡化之SephadexLH-20管柱(Pharmacia)(1.2L)。50%乙腈2.5L溶出後，更收集於50%乙腈2.5L溶出之含有藍色色素的分液，予以冷凍乾燥。

以分餾HPLC將所得冷凍乾燥品再次進行層析。

管柱為YMC pack PolymerC18(YMC株式會社，2cm ϕ * 30cm)，移動相為A:0.5%TFA/水、B: 0.5%TFA/50%乙腈，6ml/min，以下述梯度進行。B65%(保持30min)B65→B90%線性梯度(20min)，保持30分鐘B90%，以A260nm進行檢測。收集於50-52min溶出之紅色色素(2)、於60-65min溶出之藍色色素(1)以及於65-73min溶出之藍色色素(3)並予以冷凍乾燥。層析係反覆進行共3次。

針對如此獲得之冷凍乾燥品，即藍色色素(1)、紅色色素(2)及藍色色素(3)以目測觀察色調。結果，分別呈現深藍色、深紅色及深藍色。

其中，就藍色色素(1)測定花瓣中之含量，結果其含量以花瓣濕重量計係在0.0007mg/g~0.13mg/g之範圍內。

實施例2：以機器分析色素化合物之結構解析

針對藍色色素(1)、紅色色素(2)及藍色色素(3)，使用視需要而再次純化之試料，進行各種機器分析。

以HPLC分析藍色色素(1)、紅色色素(2)及藍色色素(3)，並以光二極體陣列(Photodiode array)檢測器測定於30%乙腈、0.5%TFA中之650-250nm吸收光譜(參照第3圖、第5圖、第7圖)。

HPLC 使用 Shodex-Asahipak-ODP50(昭和電工社製)4.6mm ϕ * 25cm 為管柱，進行移動相為 0.6ml/min 之 30% 乙腈、0.5%TFA 的等強度(isocratic)溶出。檢測係以光二極體陣列檢測器 (SPD-M10Avp，(株)島津製作所製)測定 650-250nm 之吸收光譜，監測 A560nm 之層析圖。

將結果摘要如下(有關保持時間(R.T.)請參照第4及6圖)。

藍色色素(1) λ max 593nm R.T. 14.6分及18.5分*

紅色色素(2) λ max 535nm R.T. 8.9分

藍色色素(3) λ max 594nm R.T. 21.6分

* 藍色色素(1)因葡萄糖1位之羥基顯示 α 體與 β 體互變異構而顯示出2個尖峰。

進行藍色色素(1)、紅色色素(2)及藍色色素(3)之 TOF-MS 測定。

使用 Q-TOF Premier(Micromass社製、英國)，離子源使用安裝有 Z 噴霧離子源之 ESI，於正向 V 模式下測定 MS。以 Cone volt. : 60V、Capillary voltage : 3KV、鎖定噴霧(lock spray)進行質量修正，基準(reference)使用白胺腦素(Leu-enkephalin)(m/z556.2771[M+H]⁺)。

結果，藍色色素(1)造成 m/z1221.1352[M]⁺ 之分子離子(molecular ion)，紅色色素(2)造成 m/z435.0380[M]⁺ 之分子離子，藍色色素(2)造成 m/z1373.1442[M]⁺ 之分子離子，分別與分子式 C₅₆H₃₇O₃₂(err. : +6.9ppm)、C₂₂H₁₁O₁₀(err. : +6.4ppm)、C₆₃H₄₁O₃₆(err. : +4.6ppm)十分一致。

分別將藍色色素(1)、紅色色素(2)及藍色色素(3)於含有0.5%TFA之30%乙腈中的吸收光譜顯示於第3圖、第5圖及第7圖。

藍色色素(1)及藍色色素(3)之可視部分的吸收最高點(absorption maximum)為593nm，與專利文獻3之實施例1所載式(II)化合物的吸收最高點相較下，略朝長波長位移。

專利文獻3所載之式(II)化合物係如專利文獻3所記載般呈現藍色。然而，此次所得藍色色素(1)及藍色色素(3)之吸收最高點與專利文獻3所載式(II)化合物之吸收最高點相較下更位於長波長側，顯示出較式(II)化合物更藍之顏色。因此，明確得知，本發明所新發現之藍色色素(1)及藍色色素(3)具有使植物顏色更藍之效果。以TOF-MS測定藍色色素(1)之分子量為 m/z 1221.13 $[M]^+$ ，與專利文獻3之實施例1所載式(II)化合物之分子量1205相較下更大16質量單位。這顯示，經導入專利文獻2所載質體pSPB919之品種Lavende含有與專利文獻3之習知前述色素化合物相較下分子量大16之色素化合物。由於類黃酮3'，5'-氫氧化酶之羥化反應所造成的分子量增加即是因加成1個氧原子而造成16之增加，因此認為藍色色素(1)較專利文獻3之實施例1所載式(II)所示化合物僅多出1個氧原子。由於類黃酮3'，5'-氫氧化酶會專一性地使類黃酮之B環羥化，而判斷現今鑑定之化合物非為非專利文獻1所載之玫瑰花青苷A1配糖體，而是B環具有3個羥基之具有飛燕草素部分結構的化合物。即，判斷藍色色素(1)、紅色色素(2)及藍色色素(3)之結構分別為

第8圖、第9圖及第10圖所示結構。

此外，針對各化合物進行NMR測定。溶解於含有1% DCI(重鹽酸)之DMSO-d₆((CD₃)₂SO)二甲亞砜)，並以¹H與¹³C之殘存尖峰 δ 2.50、 δ 39.43作為內部標準。測定項目係以 DMX-750 光譜儀 (DMX-750 spectrometer, BRUKER BIOSPIN, Germany) 測定 ¹H NMR、¹³C NMR、¹H{¹³C}-HSQC、¹H{¹³C}-HMBC、TOCSY、DQF-COSY及ROE。結果，藍色色素(1)、紅色色素(2)及藍色色素(3)之結構分別決定為第8圖、第9圖及第10圖所示結構。

茲將藍色色素(1)之¹H NMR解析結果顯示於第11圖，並將¹³C NMR解析結果顯示於第12圖。藍色色素(1)於¹H NMR中可見 δ 3.67 (1H, d12, Glc-6 α)、 δ 4.48 (1H, dd2,9, Glc-5 α)、 δ 4.84(1H, t9, Glc-4 α)、 δ 4.94 (1H, dd2,9, Glc-2 α)、 δ 4.99 (1H, dd2,12, Glc-6 α)、 δ 5.30 (1H, d2, Glc-1 α)、 δ 5.64 (1H, t9, Glc-3 α)、 δ 6.22 (1H, s, HHDP)、 δ 6.27 (1H, s, HHDP)、 δ 6.77 (2H, s, gallate-2,6)、 δ 6.79 (1H, s, D-3'')、 δ 6.83 (1H d2, A-6)、 δ 6.85(2H, s, gallate-2,6)、 δ 7.03 (1H, d2, A-8)、 δ 7.87 (2H, s, B-2', 6')之信號。HHDP為hexahydroxy diphenoyl基的略稱。此外，糖之1位羥基為 β 型之葡萄糖的信號亦被視為負信號來觀察。

茲將紅色色素(2)之¹H NMR解析結果示於第13圖。

紅色色素(2)於¹H NMR中可見 δ 7.32 (1H, d1.5, A-6)、 δ 7.40 (1H, d1.5, A-8)、 δ 7.68 (2H, s, B-2', 6')、 δ 7.92 (1H, s, D-3'')之信號。

實施例3：確認其他品種之藍玫瑰中的色素化合物

針對與實施例1不同品種之藍玫瑰，確認到本發明化合物之存在。

經導入質體pSPB130之品種「WKS82」的製作

以下述方法製作出經導入質體pSPB130之品種「WKS82」。

以芳香族醯基修飾花青素，可藉此使花青素安定化，且可使其顏色變藍(例如WO96/25500)。以生產經醯基化之飛燕草素型花青素為目標，進行以下實驗。

從夏堇品種夏波(Summer-wave)花瓣取得RNA，更由其調製出polyA⁺RNA。使用directional cDNA基因庫製作套組(Stratagene社)，以製造者建議之方法從該polyA⁺RNA製作出以 λ ZAPII(Stratagene社)為載體的cDNA基因庫。夏堇之主要花青素的5位葡萄糖受到芳香族醯基修飾(Suzuki et al. Molecular Breeding 2000 6, 239-246)，因此花青素醯基轉移酶表現於夏堇花瓣中。

花青素醯基轉移酶保有特定之胺基酸序列，可將與其對應之合成DNA用作引子而藉此取得花青素醯基轉移酶基因(WO96/25500)。具體來說，將製作夏堇cDNA基因庫時所合成之單鏈cDNA10ng作為模板，並將100ng之ATC引子(參照專利文獻2之序列編號17)、100ng之寡dT引子(參照專利文獻2之序列編號18)作為引子，使用Taq聚合酶(Takara，日本)並於製造者建議之條件下進行PCR。

PCR進行25循環(以95℃下1分鐘、55℃下1分鐘及72℃

下1分鐘為1循環)的反應。以製造者建議之方法藉 Gene Clean II(BIO, 101.Inc.)回收所得約400bp之DNA片段，次選殖至pCR-TOPO。決定其鹼基序列時，發現與龍膽花之醯基轉移酶基因(Fujiwara et al. (1998) Plant J.16 421-431)相同之序列。此外，使用染色引子法(Applied Biosystems社)並使用定序器(Sequencer)310或377(均Applied Biosystems社)決定鹼基序列。

使用DIG標識檢測套組(日本Roche)並藉DIG標識該DNA片段，以製造者建議之方法，藉溶菌斑雜合法(plaque hybridization technique)篩選出夏堇之cDNA基因庫。從所得造成正向信號之選植株中隨機選出12株，從其回收質體並決定鹼基序列。其等顯示出與花青素醯基轉移酶酵素之良好相同性。於該等選植株中，決定出作為pTAT7之選植株所含的cDNA全鹼基序列(鹼基序列參照專利文獻2之序列編號7，胺基酸序列則參照專利文獻2之序列編號8)。

使pBE2113-GUS(Mitsuhara et al.Plant Vell Physiol.37, 45-59 1996)經SacI消化後，使其末端平滑化，插入8bp之XhoI linker(Takara)。於該質體之BamHI與XhoI部位插入使pTAT7以BamHI與XhoI消化而得之約1.7kb的DNA，獲得pSPB120。使pSPB120經SnaBI與BamHI消化後，使其末端平滑化並連接(ligation)而獲得pSPB120'。另一方面，以BamHI使含有源自三色堇之F3' 5' H#40 cDNA的質體pCGP1961完全消化後，更以XhoI部分消化，回收所得約1.8kb之DNA片段，將其與經BamHI及XhoI消化之pUE5H連

接，令所得質體為pUEBP40。

使pUEBP40經SnaBI與BamHI消化後，令其末端平滑化並予以連接，獲得pUEBP40'。回收使pUEBP40'以HindIII部分消化而得之約2.7kb的DNA片段，與使pSPB120'經HindIII部分消化之DNA片段連結。所得質體中，於雙偶載體上由右邊界(right border)側起依序朝同方向連結有新黴素磷酸轉移酶(neomycin phosphotransferase)基因、源自三色堇之F3' 5' H#40基因及源自夏堇之5AT基因，令此種雙偶載體為pSPB130(參照第12圖)。本質體係精心製作成：於植物中結構性地表現出源自三色堇之F3' 5' H#40基因與源自夏堇之5AT基因，且會使基因專一性地轉錄至花瓣。將該質體導入農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)Ag10株。藉由感染該農桿菌而將pSPB130(第12圖)導入紫藤色系玫瑰「WKS82」，製得轉形體。使轉形細胞細分化，製得基因重組植物體之藍玫瑰(經導入質體pSPB130之品種「WKS82」)，並使其開花。

色素化合物之抽提、分離、純化及鑑定

以與實施例1相同之方法，從如上述般製得之藍玫瑰(經導入質體pSPB130之品種「WKS82」)花瓣230g進行抽提、分離及純化，而獲得藍色色素(1)、紅色色素(2)及藍色色素(3)。

針對所得藍色色素(1)、紅色色素(2)及藍色色素(3)以目視觀察色調。結果，分別呈現深藍色、深紅色及深藍色。

此外，針對藍色色素(1)、紅色色素(2)及藍色色素(3)

使用LC-TOF-MS，確認其等分別與實施例1所鑑定之色素成分為相同化合物。

產業上之可利用性

藉由本發明，而從藍玫瑰花瓣中抽提出新穎色素並予以分離、純化，並解明其化學結構。本發明所新發現之化合物與玫瑰花青苷類(已知存在於習知紫藤色系玫瑰)相較下呈現出藍色，因此，可使用本發明所發現之上述化合物來改變植物花色。此外，或是將該化合物用作植物性色素，藉此，可利用在例如飲食品之著色等上。

【圖式簡單說明】

第1圖顯示矢車菊色素、飛燕草素及玫瑰花青苷之化學結構式。

第2圖顯示已導入至紫藤色系玫瑰品種「LAVANDE」之質體pSPB919的結構。

第3圖為藍色色素(1)於30%乙腈、0.5%TFA中之可視~紫外吸收光譜圖。

第4圖為以HPLC分析藍色色素(1)時之層析圖，因該化合物之葡萄糖1位羥基顯示出 α 體與 β 體之互變異構現象，而可見到2個尖峰。

第5圖為紅色色素(2)於30%乙腈、0.5%TFA中之可視~紫外吸收光譜圖。

第6圖為以HPLC分析紅色色素(2)時之層析圖。

第7圖為藍色色素(3)於30%乙腈、0.5%TFA中之可視~紫外吸收光譜圖。

第8圖為藍色色素(1)之化學結構式。圖中，葡萄糖羥基之配位(波狀線)顯示 α 體與 β 體之互變異構物。

第9圖為紅色色素(2)之化學結構式。

第10圖為藍色色素(3)之化學結構式。

第11圖為第8圖所示藍色色素(1)之 ^1H NMR光譜圖。

第12圖為第8圖所示藍色色素(1)之 ^{13}C NMR光譜圖。

第13圖為第9圖所示紅色色素(2)之 ^1H NMR光譜圖。

第14圖顯示已導入至紫藤色系玫瑰「WKS82」之質體pSPB130的結構。

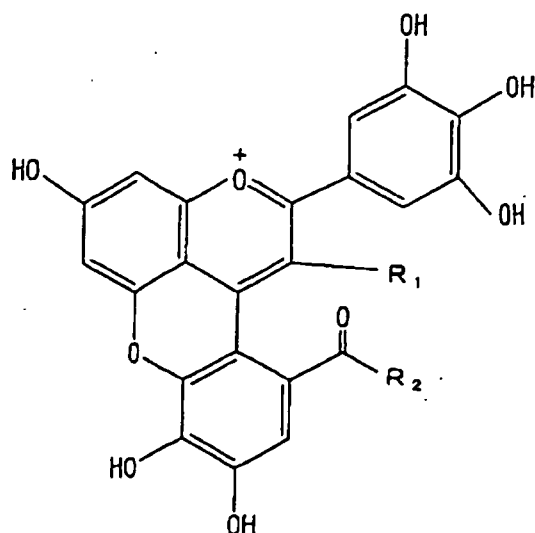
【主要元件符號說明】

(無)

七、申請專利範圍：

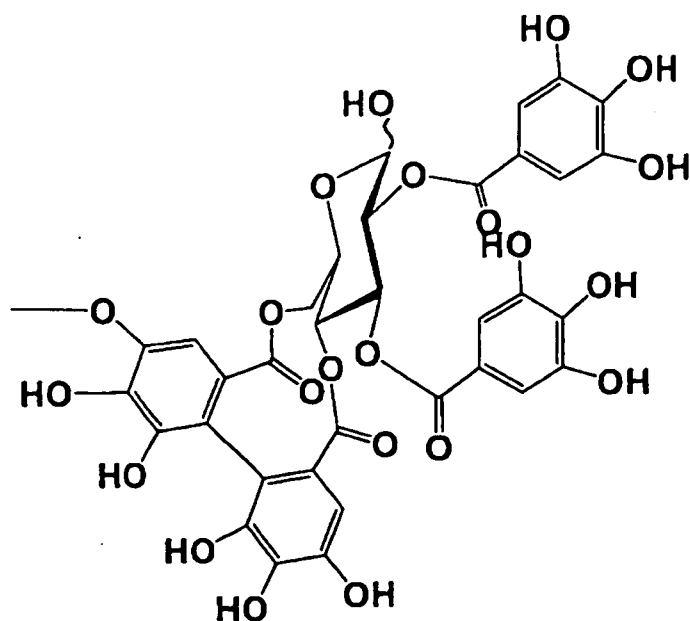
1. 一種下述通式(I)所示之化合物：

【化1】



式中，R₁ 為下式所示之基，且 R₂ 為 -OH；

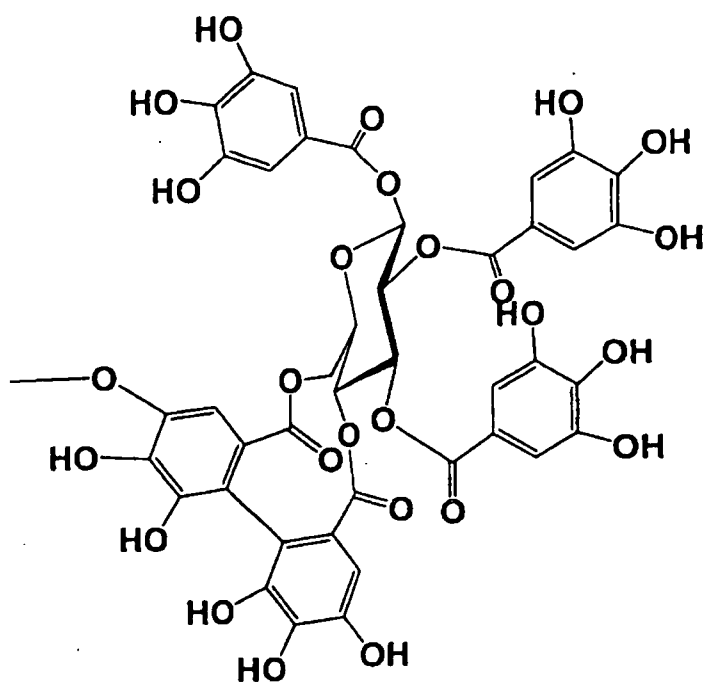
【化2】



或者 R_1 與 R_2 共同形成 $-O-$ ；

或者是， R_1 為下式所示之基，且 R_2 為 $-OH$ ；

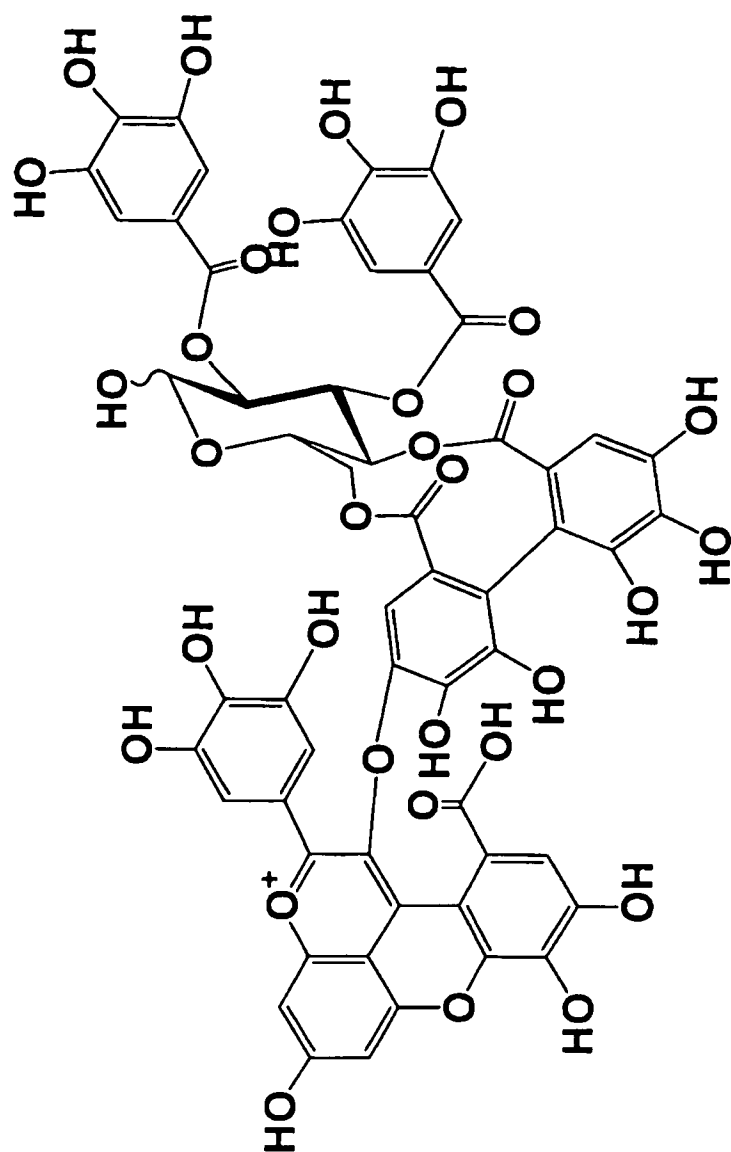
【化3】



但是， R_1 中葡萄糖之 1 位羥基的配位(波狀線)表示 α 體與 β 體的互變異構現象。

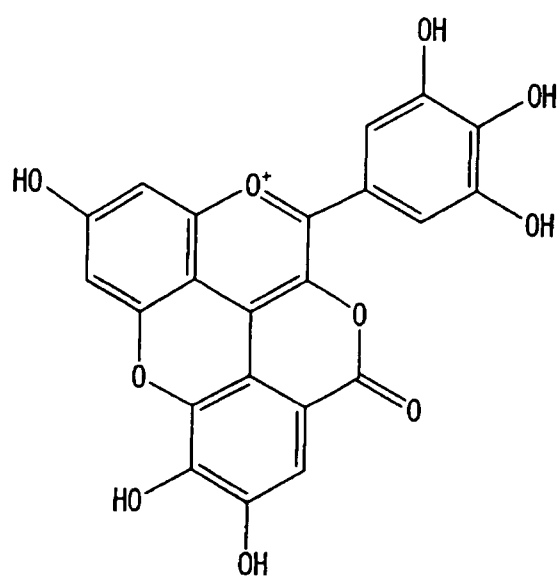
2. 一種下式所示之化合物：

【化4】



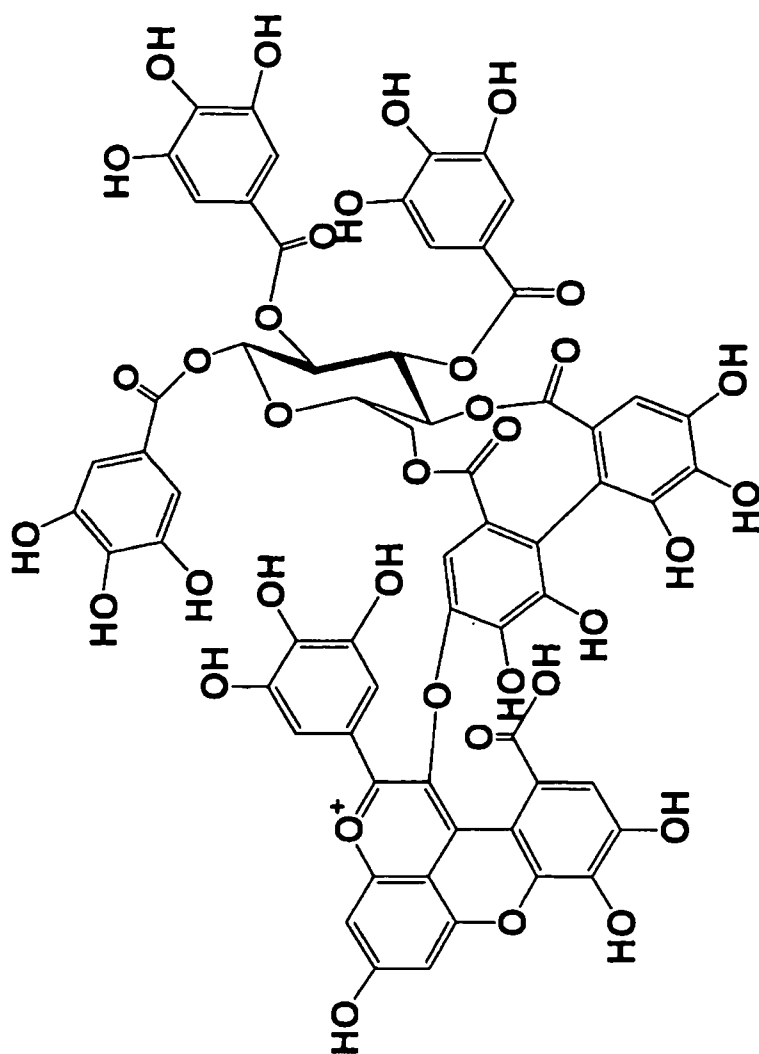
3. 一種下式所示之化合物：

【化5】



4. 一種下式所示之化合物：

【化6】



5. 一種如請求項1至4中任一項之化合物的製造方法，該方法包含以下步驟：

藉由基因重組技術，以農桿菌法將一源自三色堇之類黃酮3', 5'-氫氧化酶基因導入一薔薇科植物之薔薇科薔薇屬的雜交玫瑰(*Rosa hybrida*)中；

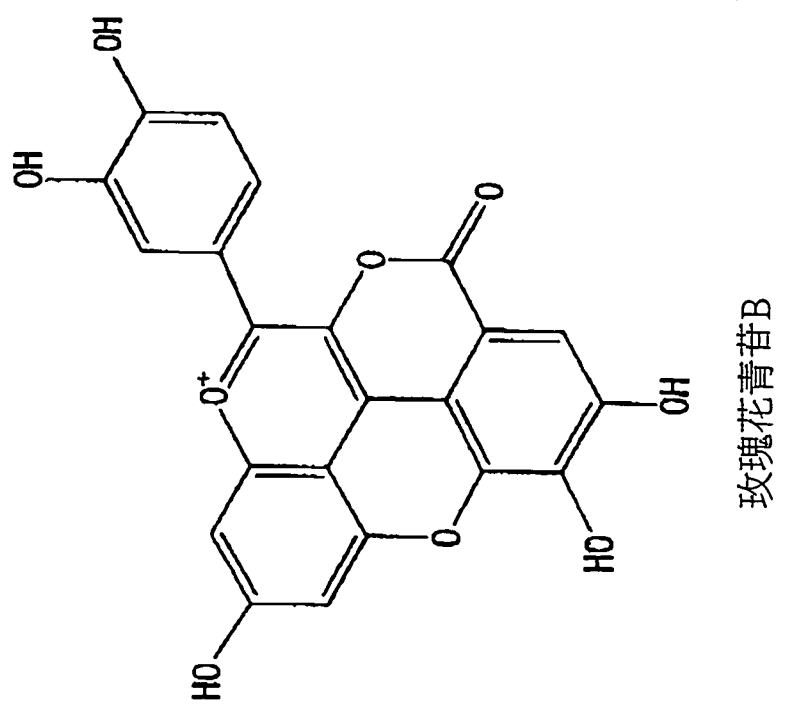
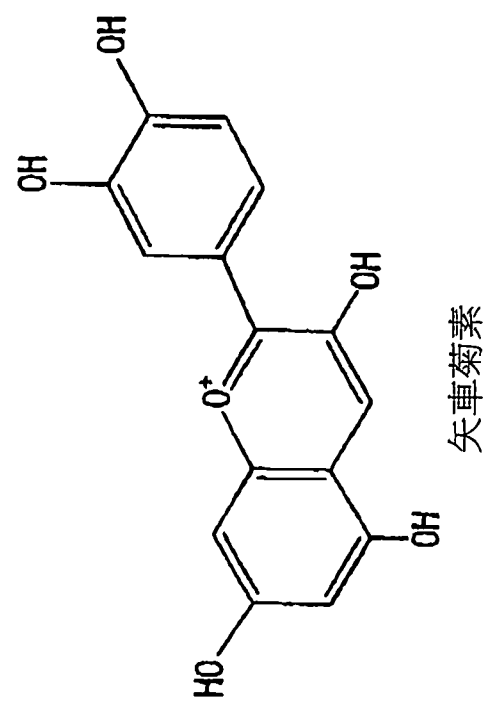
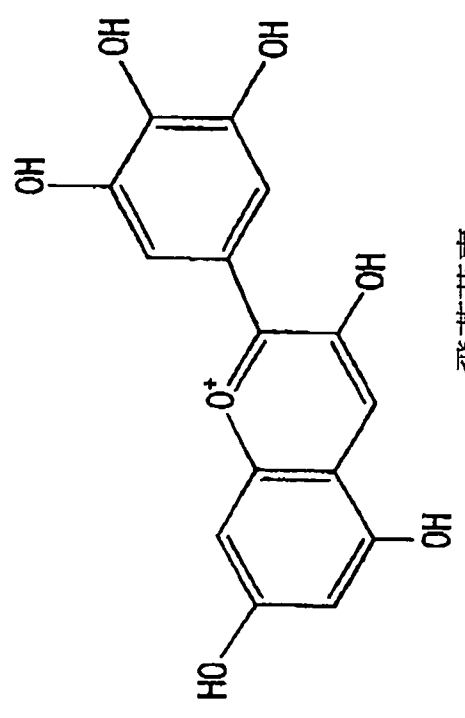
使該基因表現於花瓣內，以生成如請求項1至4中任一項之化合物；以及

分離並純化於該花瓣中生成之該化合物。

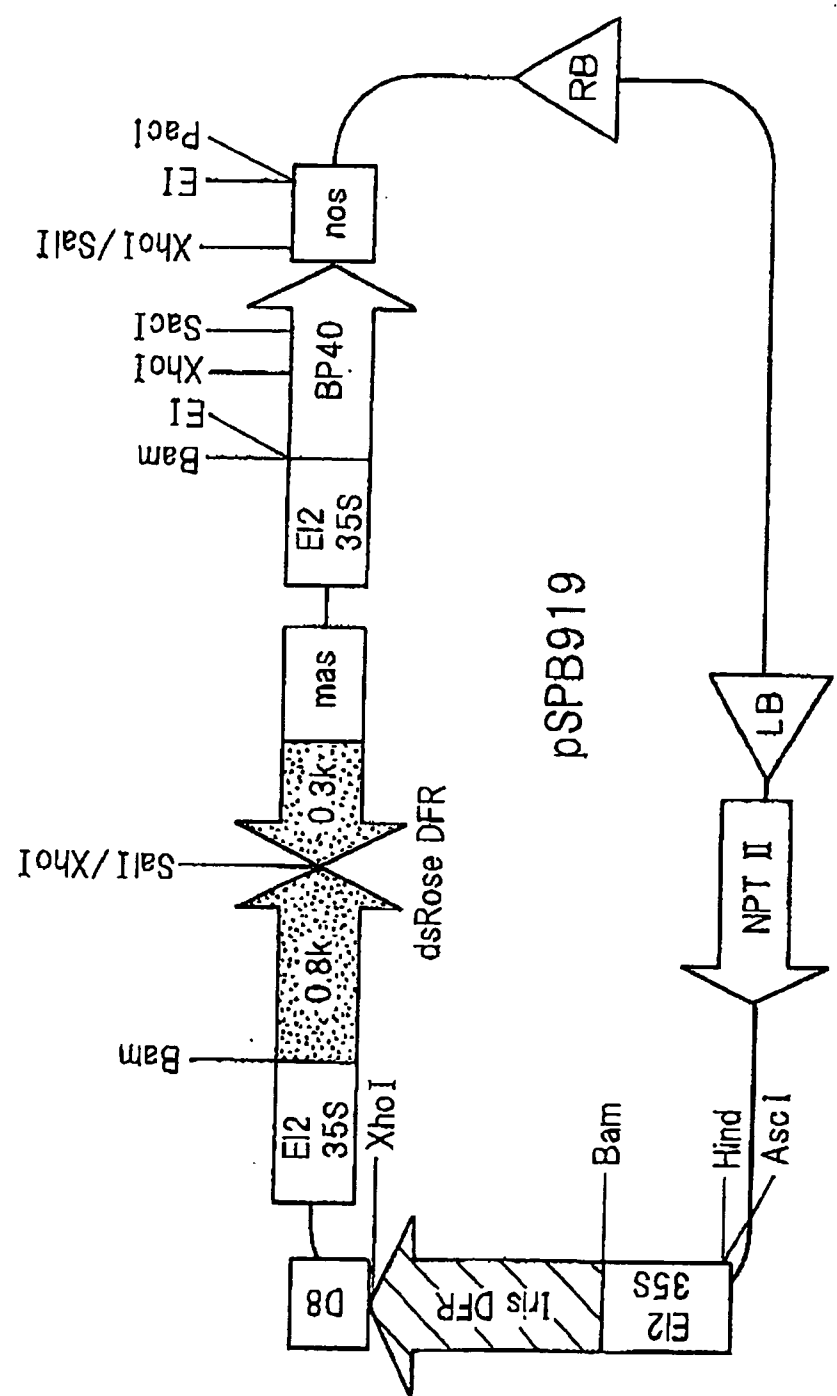
第 99109119 號專利申請案申請專利範圍替換本 修正日期：104 年 1 月 16 日

6. 如請求項 5 之方法，其中該雜交玫瑰係品種 Lavende 或 WKS82。

第 1 圖

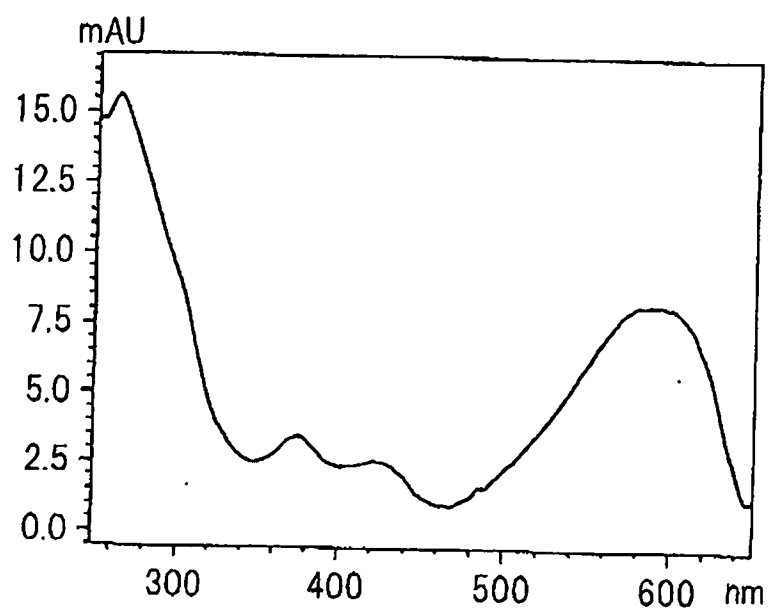


第 2 圖

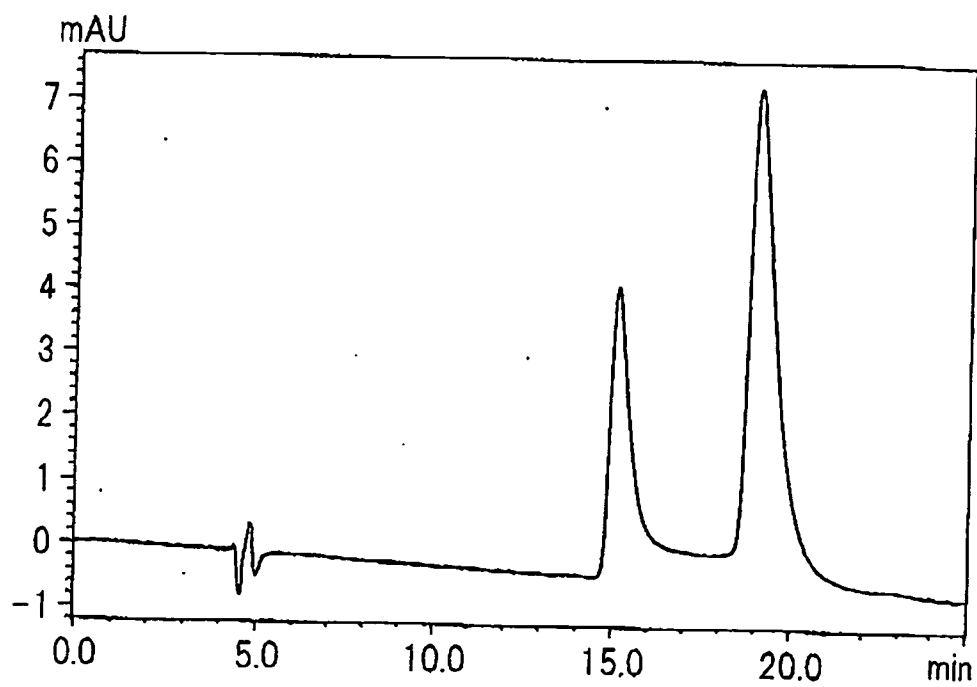


3/12

第 3 圖

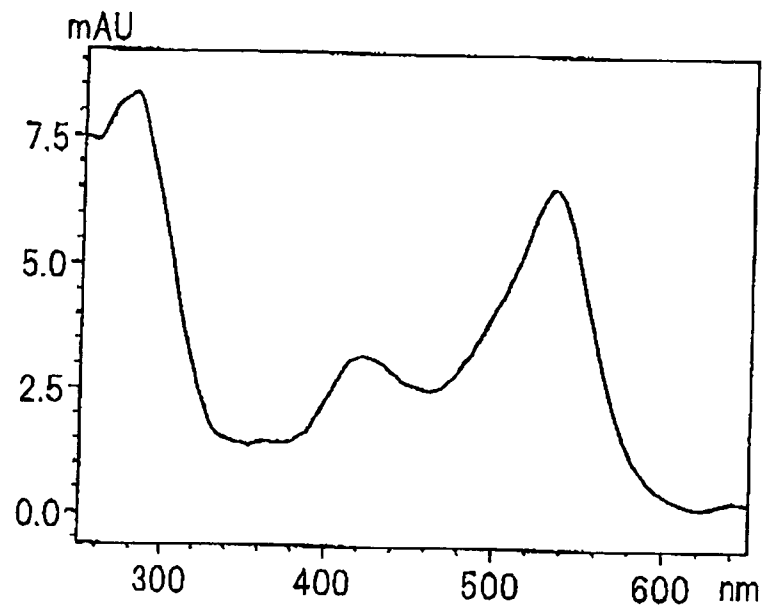


第 4 圖

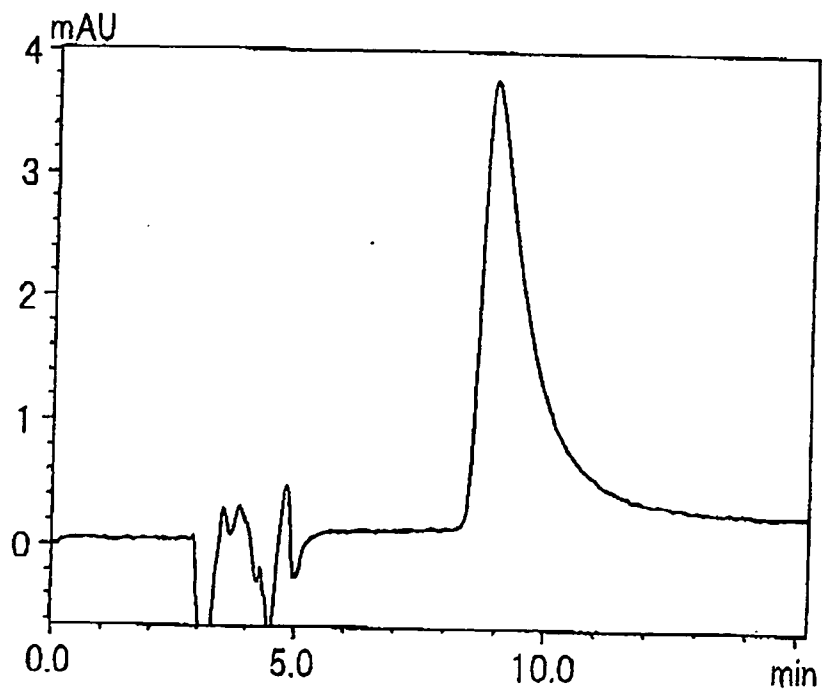


4/12

第 5 圖



第 6 圖



$\frac{5}{12}$

第 7 圖

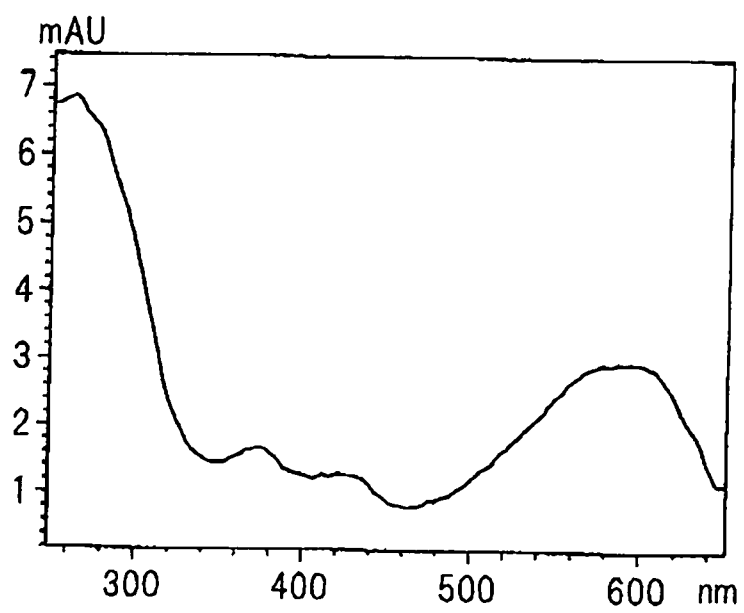
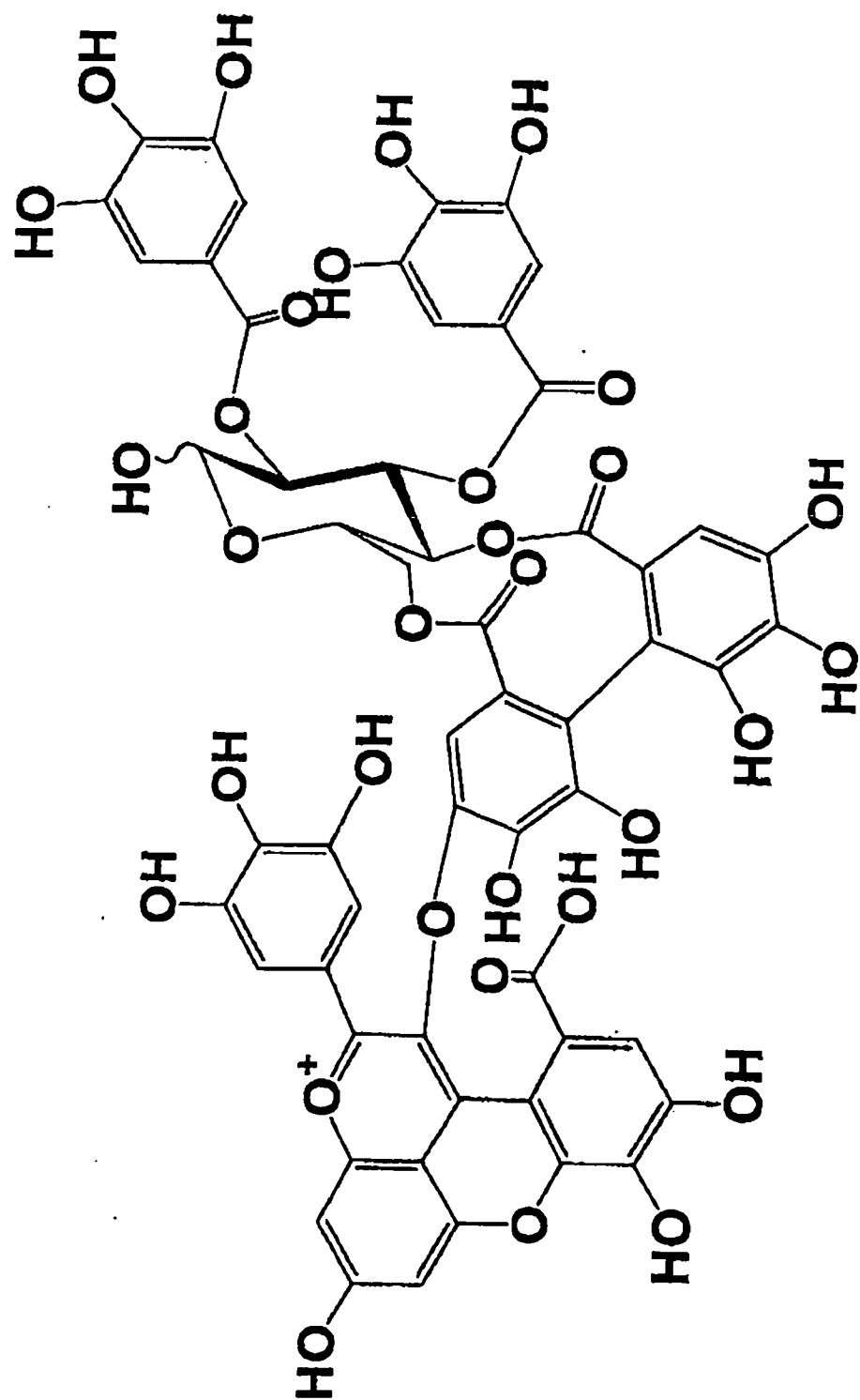
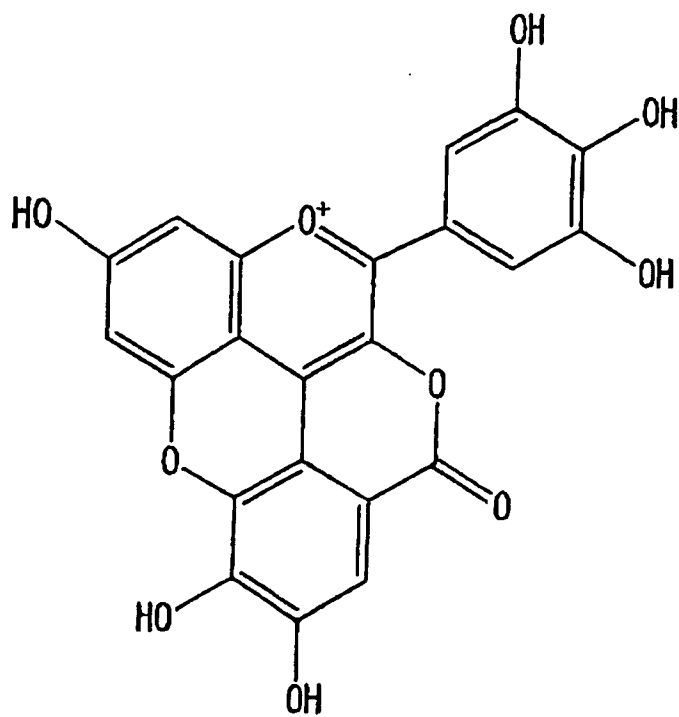


圖 8

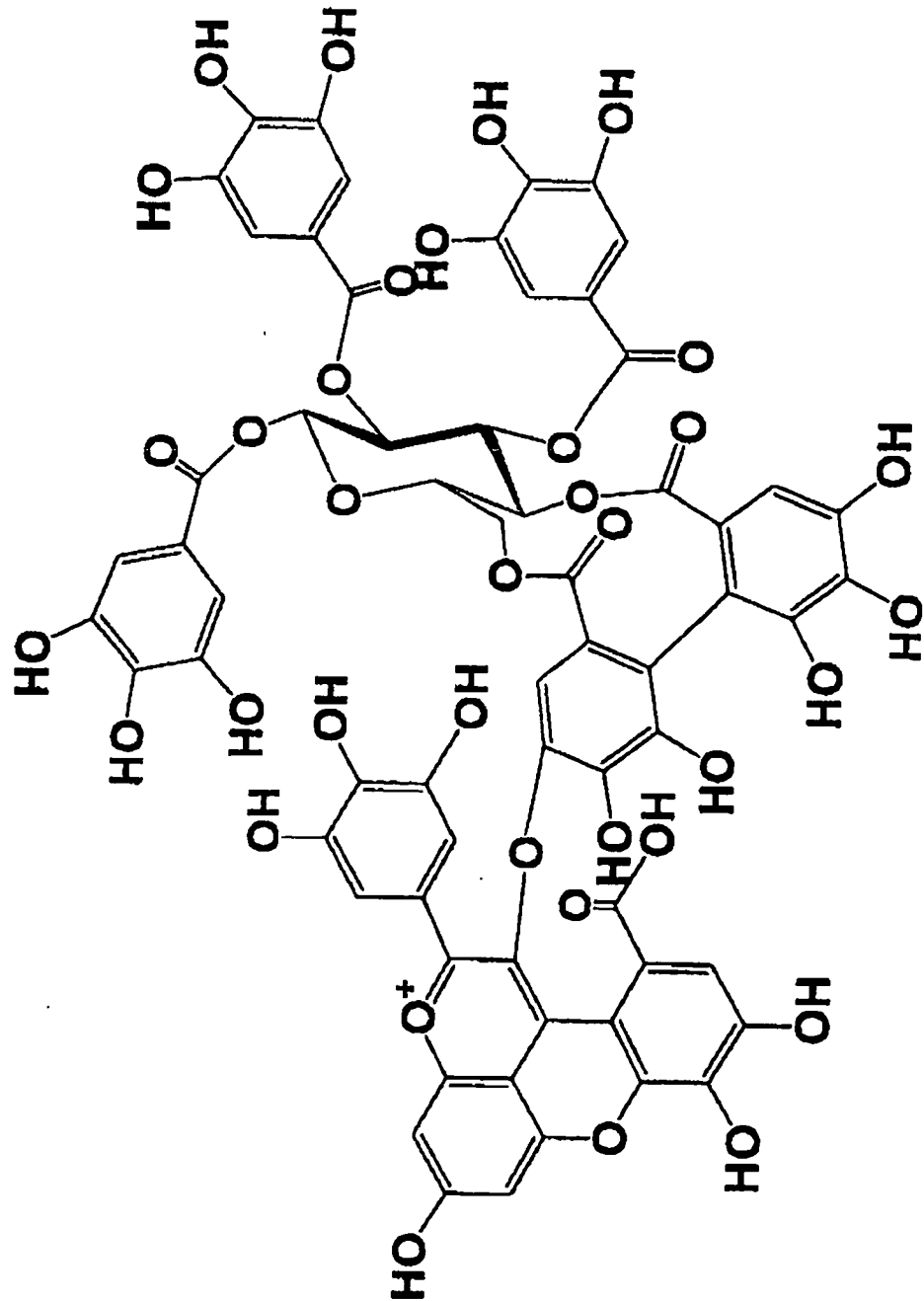


7/12

第 9 圖



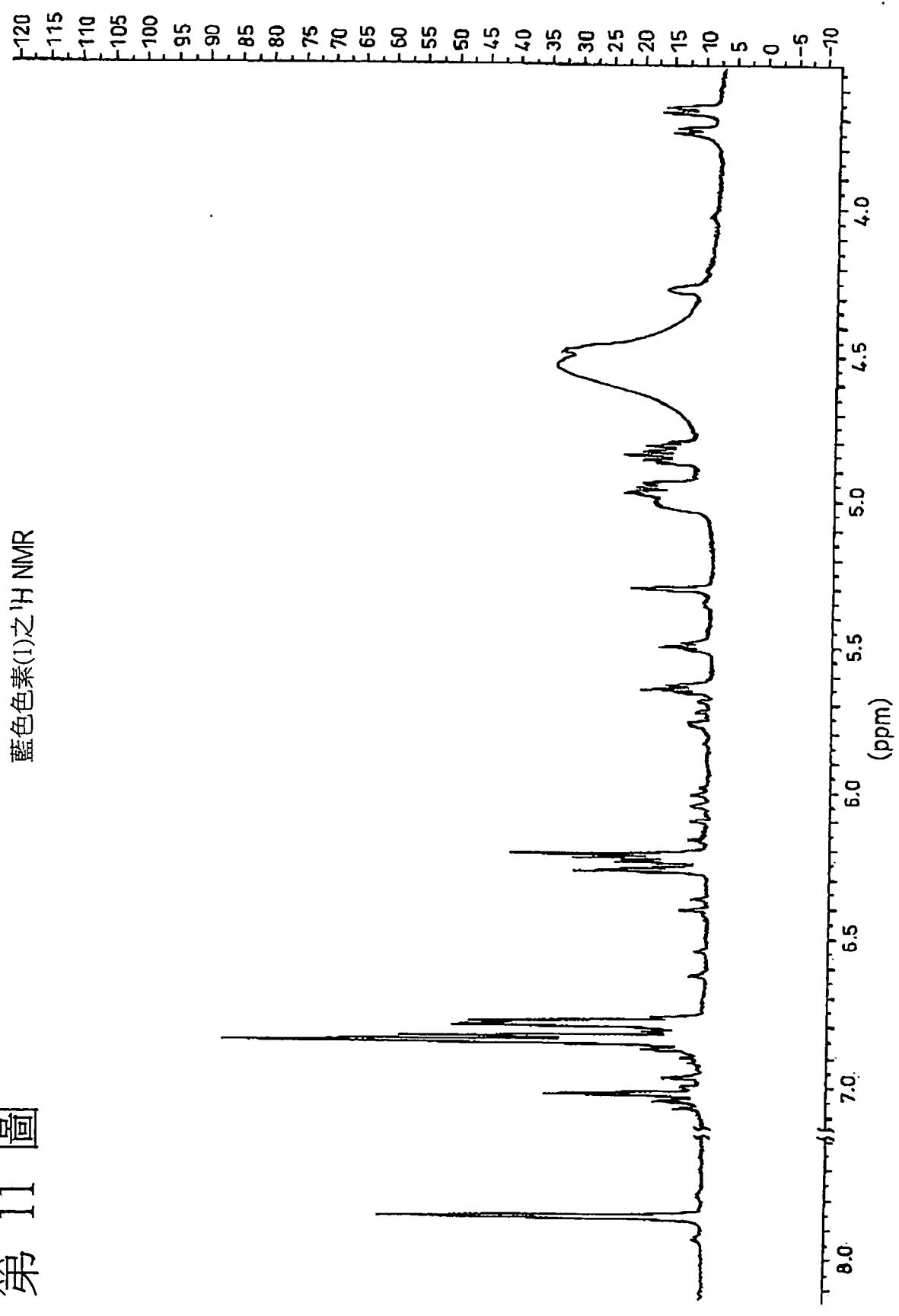
第 10 圖



9/12

第 11 圖

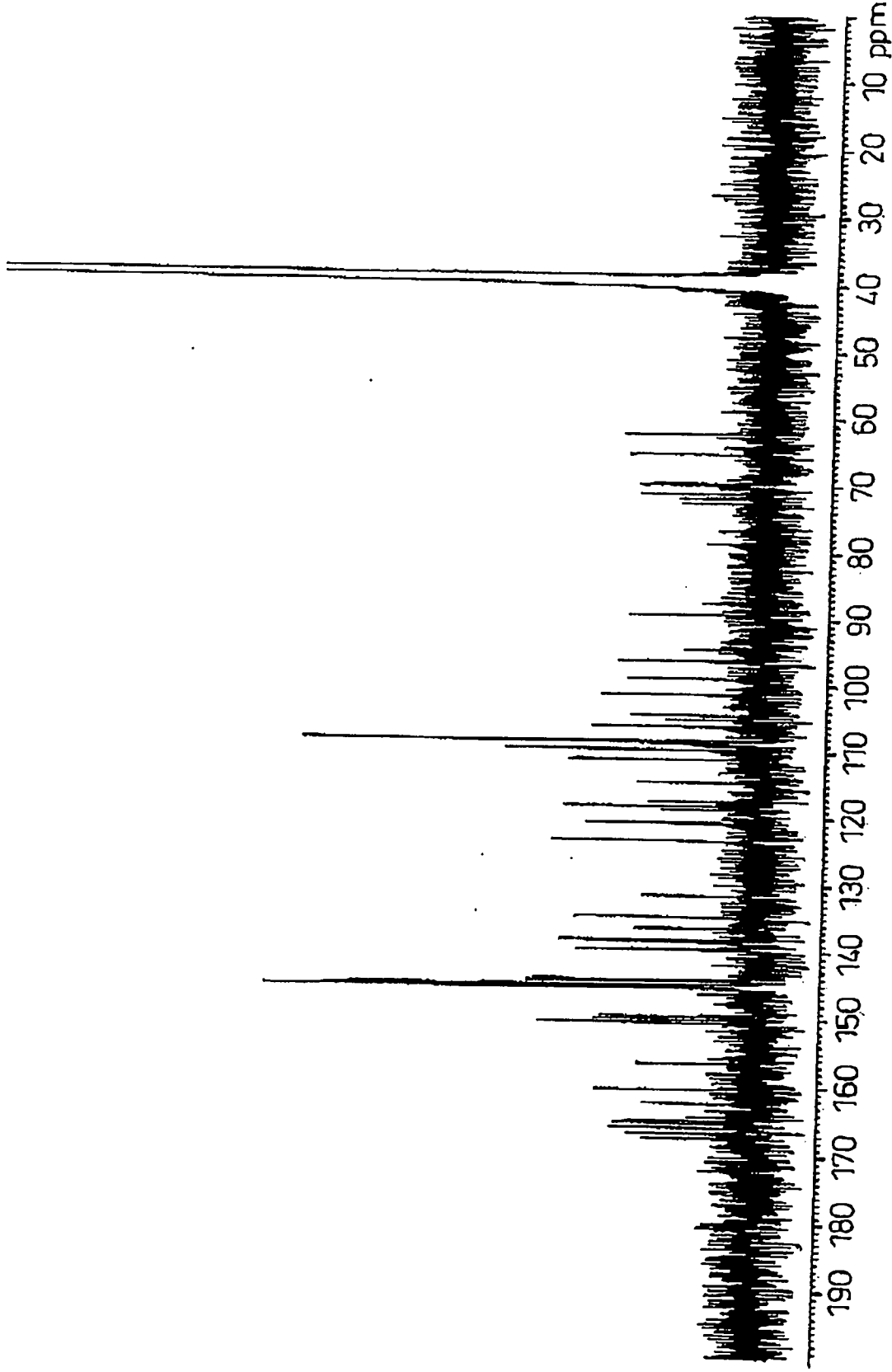
藍色色素(I)之 ^1H NMR



$\frac{10}{12}$

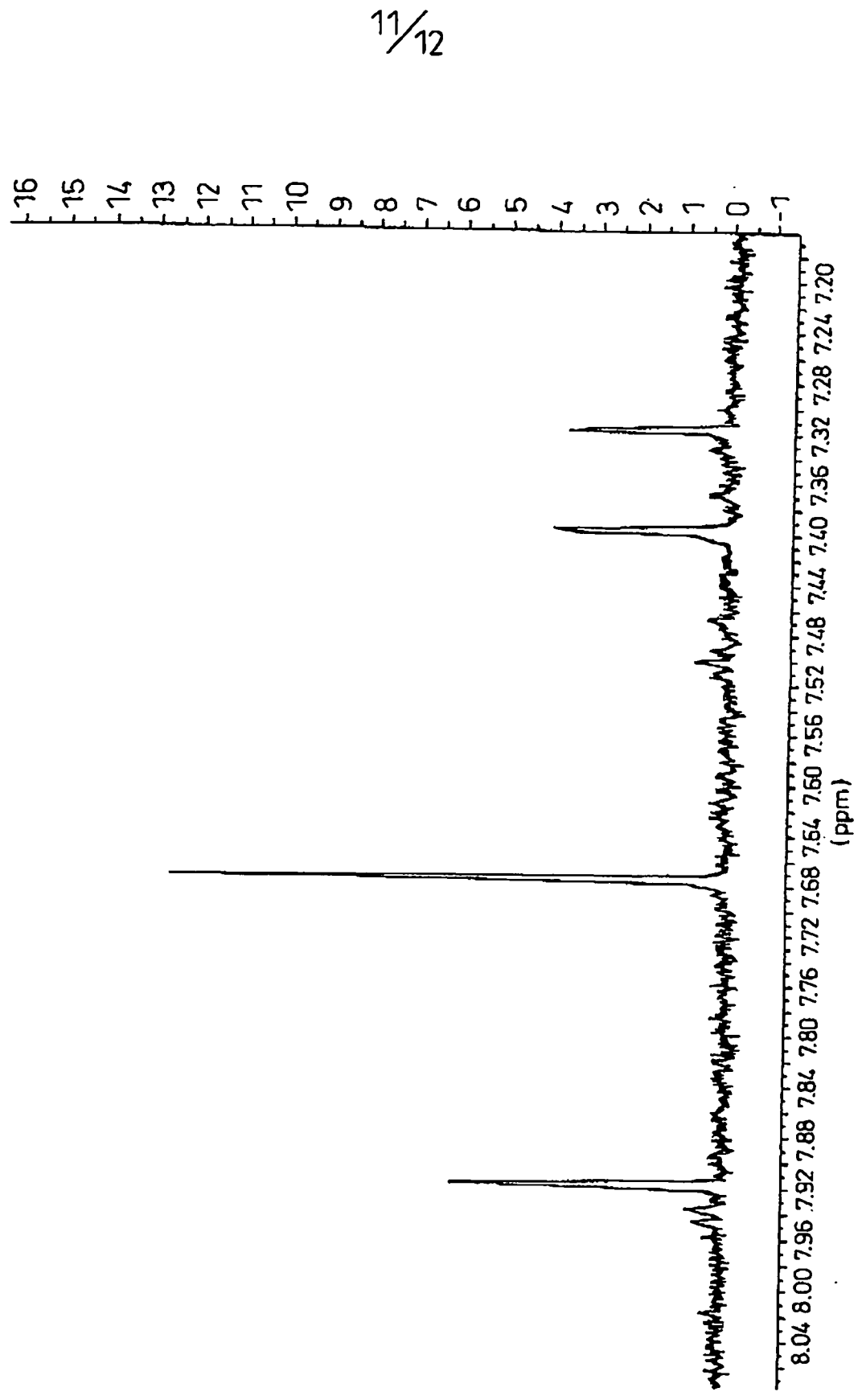
藍色色素(1)之 ^{13}C NMR

第 12 圖



第 13 圖

紅色素(2)之¹H NMR



第 14 圖

