

公開
密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：110201e307

行政院農業委員會林務局九十四年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：942934

計畫名稱：土肉桂苗木大量繁殖體系之建立 (III) (第2年/全程3年)

(英文名稱) **Establishment of Mass Propagation System of *Cinnamomum Osmophloeum* Kaneh(III)**

計畫編號：94農科-11.2.1-務-e3(7)

全程計畫期間：93年1月1日至95年12月31日

本年計畫期間：94年1月1日至94年12月31日

計畫主持人：林敏宜

執行機關：私立中國文化大學

土肉桂苗木大量繁殖體系之建立

Establishment of Mass Propagation System of *Cinnamomum Osmophloeum* Kaneh

林敏宜

摘要

土肉桂是臺灣珍貴樹種，在市場有供不應求之趨勢，本試驗將測試出合適之培養基成分及目的細胞株之大量繁殖條件，以期能將含有高含量肉桂醛之細胞株大量生產，提高其經濟價值。在細胞培養方面，將土肉桂葉片置入 0.5 mg/l IBA 及 0.5 mg/l BA 在黑暗中培養，經過 1 個月後可得到白色、鬆軟之癒傷組織。取 0.5 克胚原性細胞置入三角錐形瓶加入 50ml WPM 培養液，畫出細胞生長曲線，取對數期細胞進行放大培養，1 個月後可獲得 100 g/l 鮮重之培養細胞。將其置入 3L 氣舉式生物反應器中，以相同培養液培養細胞可持續生長，培養中以通氣 0.2-0.6 v.v.m. 可以達到較佳之細胞生長。細胞經取出絕乾後萃取分析，可得到 19 種成分。

【關鍵詞】細胞懸浮培養、生物反應器、大量繁殖

Abstract

Cinnamomum osmophloeum are valuable in Taiwan, its demand is excess in marketplace. Studies on clones select, proper medium, and scale up mass propagation would promote its economic value. Leaf blade of *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. were inoculated onto WPM supplemented with 0.5 mg/l IBA and 0.5 mg/l BA, and were cultured in the dark, white and soft callus were induced from leaf blade after one month, suspension cell culture was then established by using these callus. Growth curve of suspension cell was determined, vigorous grow embryogenic cells were selected by using microscope, and 0.5 g of embryogenic cells was inoculated into 125 ml conical flask containing 50 ml WPM liquid culture medium. To select log phase cell for amplification culture, 100 g/l fresh weight were produced after one month cultured. Then, scale up 3L culture in airlift bioreactor, cells were growth quality in the same liquid medium and 0.2-0.6 v.v.m. aerated. Through aried cell and GC-MS analyzed, 19 components were detected.

【Key words】Cell Suspension Culture, Bioreactor, Mass Propagation

前 言

土肉桂(*Cinnamomum osmophloeum* Kaneh.)為台灣固有樹種，屬樟科、樟屬，生長於台灣中低海拔的闊葉林中，土肉桂根皮與葉部所含之肉桂醛，其甜度為蔗糖之 50 倍，故可大量應用於食品工業上 (王,1987；張,2002)

土肉桂精油中的主要成分肉桂醛，對常見的大腸桿菌、綠膿桿菌、糞腸桿菌及金黃色葡萄球菌均有非常好的抑菌效果，可以當做天然的防腐劑 (李等,2003；Chang & Cheng,2002)。研究顯示丁香酚(engenol)、苯甲醛(benzaldehyde)可抑制魚肝油的氧化；丁香酚、香葉醇(geraniol)、萜品醇 (terpinenol) 則有抑制脂質氧化的效果。

土肉桂係台灣原生樹種，土肉桂根皮具有肉桂醛(cinna-maldehyde)等精油成分可用在生物防治或食材方面上 (楊,1992)。目前土肉桂在市場因其副產物之價值，成為農民競相種植之對象，但是含肉桂醛高之品系得之不易，數量也遠不及提供市場需求，故擬利用上年度篩選出高含量肉桂醛之品系進行細胞系大量生產之技術研究。

材料與方法

一、土肉桂優良株系大量培育

土肉桂優良株系大量培育 取肉桂醛含量高之品系進行優良株系扦插之大量培育，以上年度試驗出之條件，進行發根劑暨溫室生長環境調控。採集土肉桂肉桂醛含量高之品系進行扦插繁殖試驗，利用不同種類之發根劑進行處理以直徑 2.8cm，長 12.5cm 穴植管為扦插器具，放置在六組穴植管架上，一組為一百孔，穴植管內放 PVC 以方便觀察根系生長情況，PVC 內盛以蛭石、珍珠石、泥碳土 (比例為 2:1:2)之介質。扦插完成後予於日夜均勻噴水，白天為 30 分噴 30 秒，夜間為 3 小時噴 30 秒。溫室空氣保持流通且溫度控制在 25℃左右。90 天後噴水時間改為白天 1 小時 10 秒，夜間 3 小時 30 秒。定期評估根系生長及高生長。待苗木生長至 50 公分高，將其出栽，持續評估其生長。

表 1 發根素 粉劑配製法

	1500ppm	3000ppm	6000ppm
滑石粉	1kg	1kg	1kg
NAA	0.75g	1.5g	3g
IBA	0.75g	1.5g	3g
億力	1g	1g	1g

二、土肉桂細胞株系大量培養

(一)、癒合組織誘導

1.材料

採取當年生枝條幼嫩部的葉片及莖部為材料，進行癒合組織誘導。

2. 材料消毒

將葉片或芽體，以 70%酒精浸泡，用蒸餾水清洗後，置於 2%NaOCl 溶液，加一滴 Tween 20，以超音波震動 15~30 分鐘，再經滅菌水沖洗後，切取適當培植體接種。

3. 固體培養

培養基以 MS 無機鹽配方為基礎，添加 3%蔗糖，1 mg/l peridoxin-HCl，1 mg/l thiamine-HCl，10 mg/l nicotinic acid，100 mg/l inositol，及 0.8%Agar 使培養基固化。材料接種後，置於 25~27°C 靜置培養。

(二)、細胞懸浮培養

取上述誘導出之 0.5g 胚性癒合組織，移至 125ml 三角錐型瓶中，加上 50ml 之液態培養液，培養液成分以 WPM 基礎培養液加上 6 種不同配方的植物生長調節劑組合 (0-1 mg/l 2,IBA+0.1-0.5 mg/l BA) 而成，以促使其大量增殖，過 5 天後再用濾網過濾粗顆粒。約 7-10 天繼代培養一次 (繼代時更換 10ml 培養液及上面懸浮破裂之細胞)，震盪器轉速 110rpm 培養。在培養過程中以 SCV (sedimented cell volume) 法測其細胞生長曲線，調整細胞密度後，更換新鮮培養基，並利用光學顯微鏡觀察其細胞生長狀況。培養過程中每天量測細胞生長量，並取指數期細胞進行大量培養。

(三)細胞放大培養

1. 懸浮細胞放大條件測試

取 125ml 錐形瓶中生長分裂最旺盛之細胞約 50ml (內含細胞鮮重約 0.5g)，加新鮮培養液 (WPM 修正培養基添加 IBA 0-5 mg/l 與 BA 0-5 mg/l)。每隔 7-10 天更換培養液。培養溫度為 25±1°C，光照強度為 27μE.m⁻².s⁻¹，分全光照 (即 24 小時持續光照) 與黑暗 (即完全不照光) 兩種處理。細胞懸浮培養則以水平迴轉式震盪器培養，震盪速度 110rpm。

2. 溶氧量及培養液中酸鹼值測試

取上述光照處理之培養細胞進行溶氧量及培養液中酸鹼值測試，pH 及 DO 測量儀器，通氣量給予 0.2-0.6 v.v.m. [(volume of air)(volume medium)⁻¹min⁻¹]。

3. 細胞生長速率測量

細胞生長速率之測量採用每日靜止 30 分鐘後量測。

4. 3L 氣舉式 (air-lift) 生物反應器培養

內含 a. Air Compressor (Tokyo RIRAKIKAI Co.,Ltd) b.pH Indicator DPD-3(日製) c.DO Indicator Model-M1032 (日製) d.pH 電極 Broadley James Co., Ltd e.DO 電極 Able Type 10AN (日製) f.pH 電極 Broadley James Co., Ltd g.DO 電極 Able Type 10AN (日製)

取 20 克懸浮培養細胞(鮮重)放入反應器中，加入 2L WPM 培養液，培養中持續通氣 0.2-0.6 v.v.m.。培養過程中每隔 1 日添加新的培養液 30ml，並淘汰反應

器中懸浮在上層之破裂細胞。培養過程進行細胞生長條件監控紀錄及分析，監控項目包括溶氧量(dissolved oxygen)、pH 值、細胞生長量、培養液消耗量。

三、細胞培養過程持續監控二次代謝物產出，進行分析。

取 100 克細胞用 105°C 烘箱烘至絕乾後，利用水蒸氣法 (陳,2002) 萃取，Gas Chromatography-mass 進行精油成分分析。

結果與討論

一、土肉桂優良株系大量培育

採集土肉桂肉桂醛含量高之品系進行扦插繁殖試驗，利用不同種類之發根劑進行處理可達 87% 以上發根率 (圖 1)。

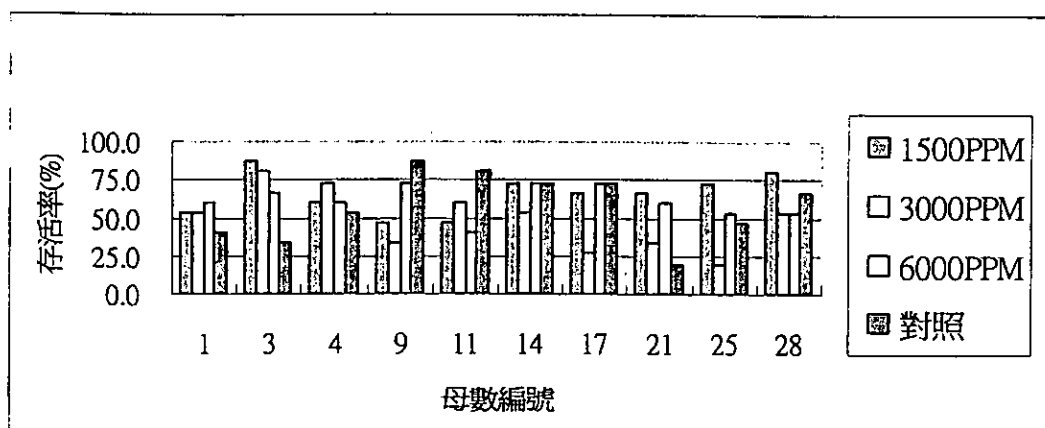


圖 1 不同濃度發根劑對土肉桂扦插苗成活率之影響

試驗結果顯示 1500ppm 對母樹發根率最顯著，成活率平均達 65.3 %，其中 3 號母樹最高達 86.7%。3000ppm 處理對母樹發根率最不顯著，成活率平均達 48.7%，其中 25 號最低 20.0%。

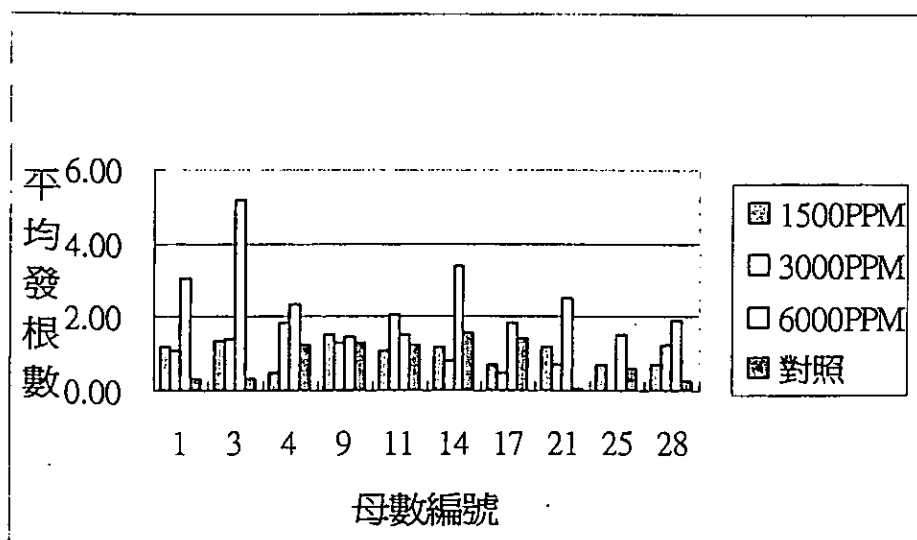


圖 2.不同濃度發根劑對土肉桂扦插苗平均發根數之影響

試驗結果顯示 6000ppm 對母樹發根數顯著，平均發根數 2.49 根，其中 3 號母樹最高達平均 5.2 根。對照組對母樹發根數最不顯著，平均發根數 0.847 根，其中 21 號最低為 0.07 根。其中 3000ppm 對 25 號母樹處理插條是綠枝狀態，但沒發根現象可能因時間處理不夠或是枝條有受感染原因造成。

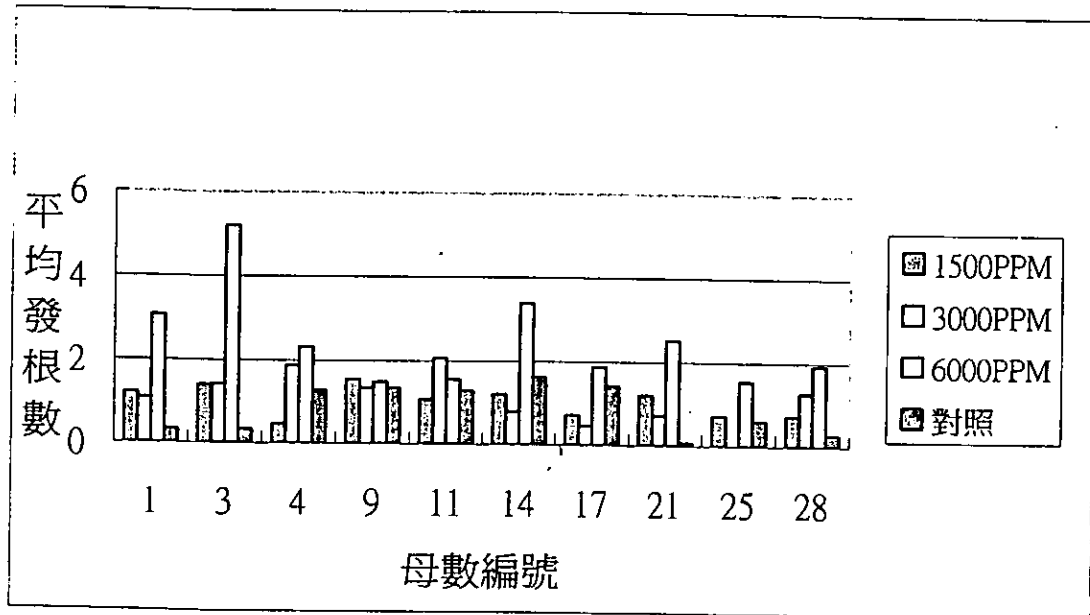


圖 3.不同濃度發根劑對土肉桂扦插苗平均根長之影響

試驗結果顯示 6000ppm 對母樹發根數顯著，平均發根數 2.02cm，其中 3 號母樹最高達平均 3.51cm。對照組對母樹發根數最不顯著，平均發根數 0.87cm，其中 3 號最低為 0.01cm。其中 3000ppm 對 25 號母樹處理插條是綠枝狀態，但沒發根現象可能因時間處理不夠或是枝條有受感染原因造成。

待苗木生長至 30 公分高，每編號母數各取 3 株共計 60 株分別在陽明山文化大學及烏來華林林場進行出栽，生長狀況如表 4。經過 6 個月之生長，平均生長高度陽明山由 31.4 公分增加為 38.09 公分，烏來由平均高度 34.4 公分增加為 43 公分。土肉桂與其它樹種相比較，生長勢較慢，兩出栽地相比較以烏來生長較佳，分析原因可能烏來氣候較為溫暖，故平均生長較佳。

表 4 土肉桂苗分別在陽明山及烏來出栽後生長高度

母樹編號		1	3	4	9	11	14	17	21	25	26
平均生長高度 (cm)											
6 月	陽明山	31.2	32.5	31.6	31.5	30.1	31.5	29.5	30.5	33.1	32.5
	烏來	30.2	33.0	30.0	32.0	32.2	30.8	31.6	31.2	30.1	31.0
7 月	陽明山	33.3	33.0	32.0	31.8	32.1	33.2	30.5	31.1	35.2	33.0
	烏來	34.0	36.2	33.2	32.5	34.2	32.5	33.2	33.2	31.1	33.2
8 月	陽明山	35.0	34.2	33.2	33.0	33.5	34.5	31.5	32.3	36.1	33.1
	烏來	36.2	39.1	34.0	35.0	36.5	35.0	36.3	37.2	34.5	35.2
9 月	陽明山	36.1	36.0	35.6	34.2	34.6	35.6	32.3	33.8	37.1	34.0
	烏來	38.2	40.1	34.5	37.0	38.6	37.1	38.5	39.4	36.7	37.1
10 月	陽明山	37.1	37.1	37.1	35.6	35.0	36.2	33.1	35.2	38.1	35.1
	烏來	40.2	41.2	35.0	37.6	40.1	39.5	40.1	41.3	38.2	39.1
11 月	陽明山	38.0	38.0	38.1	37.0	36.8	36.8	35.2	37.2	39.0	36.0
	烏來	41.0	42.0	37.1	39.2	42.7	41.2	42.1	44.5	39.5	41.2
12 月	陽明山	39.0	38.5	39.5	37.5	38.0	37.1	36.1	39.1	39.1	37.0
	烏來	43.1	43.0	38.0	41.2	45.1	44.2	45.0	46.5	41.2	43

二、土肉桂細胞株系大量培養

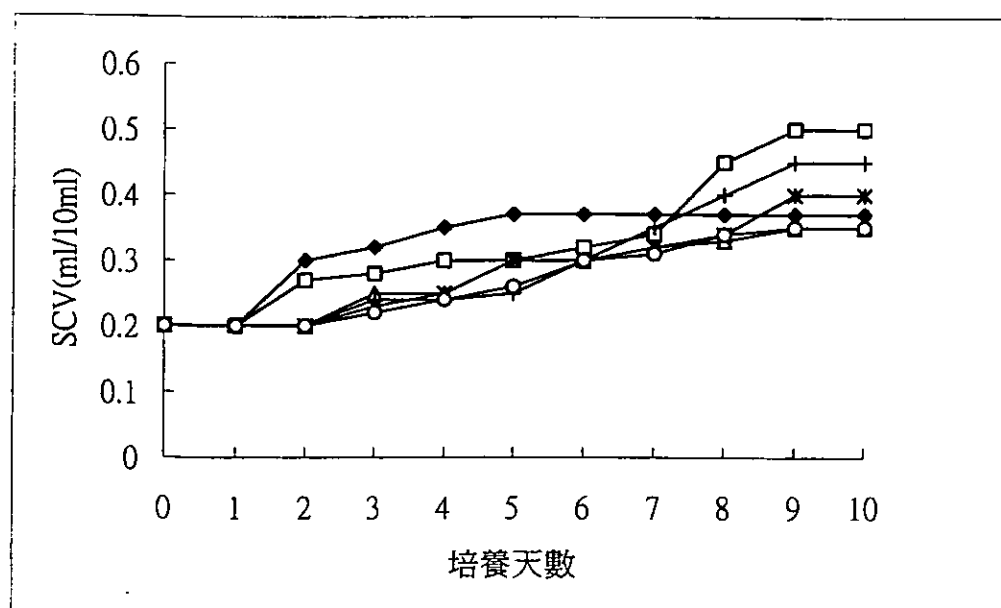


圖 4.土肉桂懸浮培養細胞生長曲線

培養液參試組合 0、0.5、1 mg/l IBA 及 0.5 與 0.1 mg/l BA，比較其細胞

生長量影響。在 6 種不同的配方中得知在不同生長調節劑之組合中以 IBA 對細胞生長量影響較大而 BA 影響甚少，而 IBA 又以 0.5 mg/l 對其細胞增殖量較有顯著效果，土肉桂癒合組織細胞在 0.5mg/l BA 與 0.5 mg/l IBA 之組合同一培養天數下細胞產率較高。

經過培養得知土肉桂細胞懸浮培養初期 1 天細胞生長緩慢，在第 2 天後細胞生長較快速，生長曲線在第 9 天達生長最高峰，以後呈現生長停滯或遲緩現象。經過更換培養 10ml 之培養液及破裂細胞後細胞生長會再出現另一波生長遲緩及快速增殖至飽和期之現象。

在開始進行培養 7 天後，觀察到觀察胚原性細胞（光學顯微鏡），此胚性癒合組織是由一較小之分生且含高密度細胞質之胚性細胞所組成，再續培養 7 天後，此胚性細胞出現高分裂活性，細胞可分裂成 20 個細胞團。

(三)、大量培養

1. pH 值變化

採取第 9 天生長最高峰細胞進行生物反應器測試。經過高壓滅菌鍋消毒後，pH 值明顯下降，但在培養進行第 3 天後，pH 值逐漸上升（圖 5）。

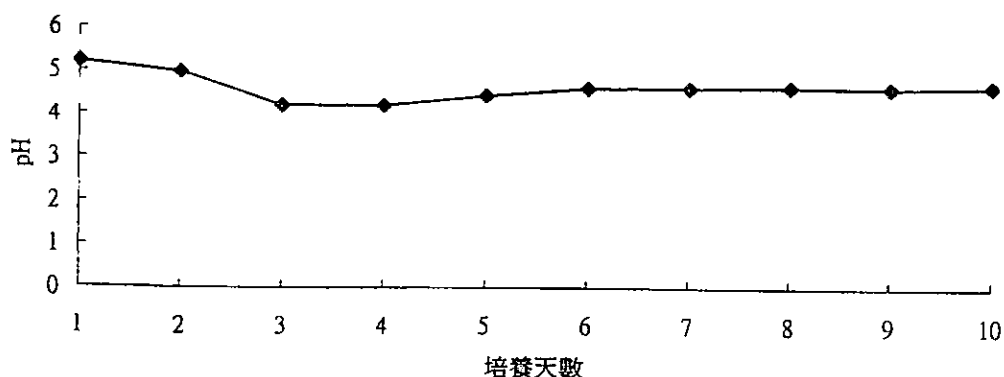


圖 5 土肉桂放大培養中 pH 值反應

在懸浮細胞在培養初期，pH 值會快速下降，培養一星期後 pH 值會慢慢上升，此結果與 Tautorus *et al.*,(1992)利用生物反應器生長 *Picea mariana* 及 *Picea glauca-engelmannii* 同。他們認為將培養液中 pH 值控制在一合適的範圍中有利於 stationary phase 的維持。培養初期 pH 值下降，隨後 pH 值逐漸上升，這可能是由於培養初期培養物利用氫離子的速率大於對硝酸鹽的利用，導致 pH 值下降，pH 值上升是由於硝酸鹽的利用所致(劉等，1998)。細胞生長過程中之代謝反應可能需要氫離子 (H^+) 的參與，在吸收 H^+ 後而使得培養液 pH 值上升，或者是分泌鹼性代謝物質，但不論如何都是為了維持正常細胞生長週期所需的適當 pH 值而對環境做的調節。當環境中之 H^+ 濃度偏離正常生長週期所需範圍後，為維持細胞質內環境的恆定，細胞需對此變化做出調節反應。其調節的機制有引發特

殊代謝反應生成或消耗之”biochemical”方式，與將 H^+ 排出或吸入細胞質之”biophysical”方式 (Raven,1986)。

2.DO 值變化

DO 值在培養過程中並沒有太大之變化 (圖 6)，給予相同之空氣量，DO 值一直維持在一個範圍內。

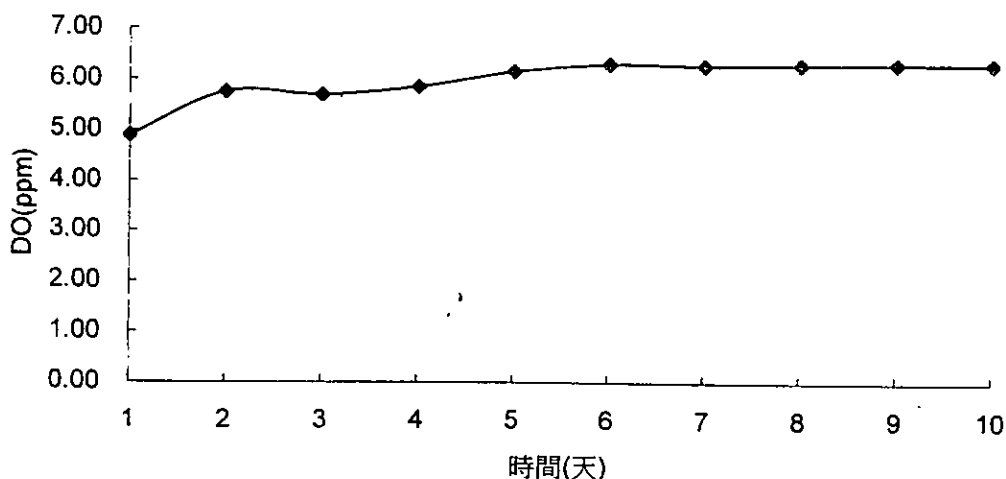


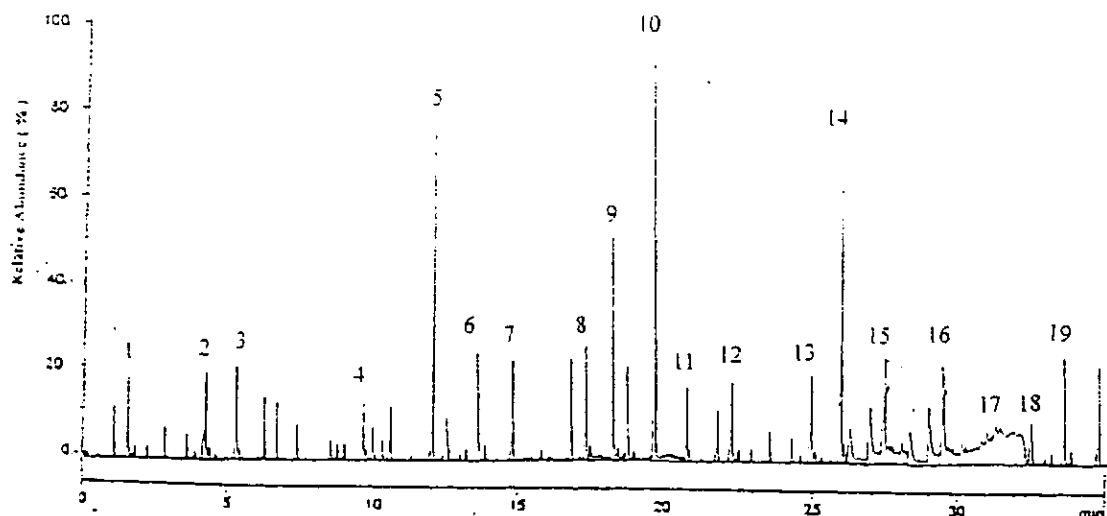
圖 6 土肉桂放大培養中 DO 值反應

一般植物細胞培養其溶液中，溶氧值通常只要維持在 20%飽和度即足以提供細胞生長代謝所需 (陳,1998)。不同植物細胞對氧氣之需求量及對剪應力的耐受力亦不相同 (Scragg,1995; Namdev and Dunlop,1995)，所以在擴大規模生物反應器的選擇上，仍然沒有一絕對法則來作為判斷標準 (Humphrey,1998)。以前認為生物反應器培養植物細胞的基本要求是：在最溫和的攪拌及通氣條件下，能達到最均勻的混合效果及最高的氧氣傳送速率 (Tanaka,1987)。

Hohe *et al.*,(1999) 利用 *Cyclamen persicum* Mill 進行細胞增殖，發現以 40%氧氣分壓對植物細胞增殖之速率大於三角錐形瓶培養及 5%、10%、20%氧氣分壓之影響。培養液中酸化程度對細胞增殖之影響更甚於氧氣，若是培養液中維持 pH 值在 3.5，會減低細胞活力，若是在 3.3 則細胞將在 4 天內死亡。

三、氣相層析-質譜儀(GC-MS)之質譜鑑定分析

細胞培養過程持續監控二次代謝物產出，經培養一個月後，細胞增殖率可達 1 倍，取烘乾後細胞 100 克萃取可收取約 1CC 精油，經 GC-mass 分析內含 19 種化合物。據葉 (2005) 以土肉桂葉片萃取精油，認為以水蒸氣-有機溶劑法萃取可以收取較多量之精油，也可以避免成分產生變異。本試驗採用蒸餾法萃取是否合適尚待評估。



- | | |
|--------------------|-----------------------|
| 1. Camphene | 12. Cuminaldehyde |
| 2. Myrcene | 13. Pipertone |
| 3. β -Pinene | 14. Safrole |
| 4. 1,8-Cineole | 15. Cinnamic aldehyde |
| 5. P-Cymene | 16. Benzyl benzoate |
| 6. Limonene | 17. Eugenol |
| 7. Benzaldehyde | 18. Cinnamic alcohol |
| 8. Linalool | 19. Cinnamyl acetate |
| 9. Terpineol | |
| 10. Benzyl acetate | |
| 11. Nerol | |

參考文獻

- 王振瀾 (1987) 土肉桂造林木之精油收率與成分分析。林業試驗所研究報告季刊 2: 129-144。
- 李漢中、鄭森松、劉如芸、張上鎮 (2003) 不同地理品系土肉桂葉部精油之化學多態性。中華林業季刊 36: 411-422。
- 陳品方 (2000) 台灣杉與土肉桂精油及其成分之生物活性。台灣大學森林學研究所碩士論文。66 頁。
- 陳品方、張上鎮、吳懷慧 (2002) 土肉桂葉部精油及其成分之抗蟎活性。中華林學季刊 35(4): 397-403。
- 陳怡穎 (2003) 台灣土肉桂葉部精油之組成與抗氧化性。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- 陳品方 (2000) 台灣杉與土肉桂精油及其成份之生物活性。國立台灣大學森林學

研究所碩士論文。

- 葉書吟 (2005) 土肉桂葉部精油之化學多態性及其 DPPH 自由基清除能力之探討。中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。
19. 陳禧瑩 (1998) 以植物細胞培養生產二次代謝物 L-DOPA 之培養條件及生物反應器操作策略探討。國立台灣大學化學工程學研究所博士學位論文。
- 楊開聰 (1996) 不同萃取方法及葉片前處理對土肉桂葉部精油收率及成分的影響。華岡農科學報 7 : 99-116。
- Chang, S. T. and S. S. Cheng (2002) Antitermitic activity of leaf essential oils and components from *Cinnamomum osmophleum*. J. Agric. Food Chem. 50: 1389-1392.
- Chang, S. T. and Cheng, S. S. (2002) Antitermitic activity of leaf essential oils and components form *Cinnamomum osmophleum*. J. Agr. Food Chem. 50:389-1392.
- Hohe, A., T. Winkelmann and H.G. Schwenkel (1999) The effect of oxygen partial pressure in bioreactor on cell proliferation and subsequent differentiation of somatic embryos of *Cyclamen persicum*. Plant Cell Tissue & Organ Culture. 59(1):39-45.
- Humphrey, A. (1998) Shake flask to fermentor. What have we learn. Biotechnol. Prog., 14:3-7.
- Namdev, P. K. and E. H. Dunlop (1995) Shear sensitivity of plant cells in suspensions. Present and future. Appl Biotechnol. 54 : 109-131
- Raven, J.A. (1986) Biochemical disposal of excess H^+ in growing plants. New Phytol. 140:75-206
- Scragg, A. H. (1995) The problems associated with high biomass levels in plants cell suspension. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 43 : 163-170
- Tanaka, H. (1987) Large scale cultivation of plant cells at high density : A review. Process Biochem. August. 106-113.



土肉桂 30 公分苗



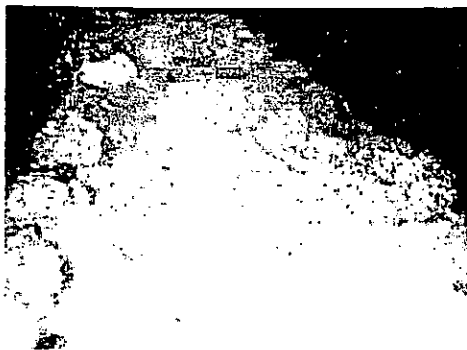
土肉桂葉片誘導出癒傷組織 (2 星期)



土肉桂葉片誘導出癒傷組織(1 個月)



土肉桂枝條誘導出癒傷組織 (2 星期)



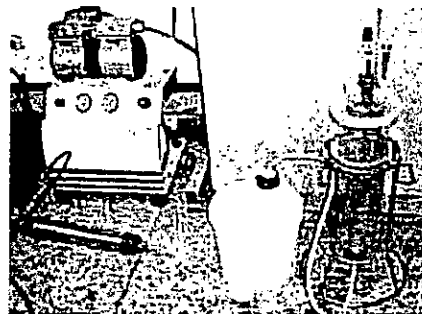
土肉桂葉片切口誘導出癒傷組織



癒傷組織經繼代培養後大量增殖



土肉桂細胞懸浮培養



生物反應器放大培養