

行政院及所屬各機關出國報告
(出國類別：考察)

研究蘭花香氣成分分析及生物技術應用

服務單位：國立屏東科技大學農園生產系
出國人 職 稱：教授
姓 名：陳福旗

出國地點：美國-底特律

出國期間：92.10.01 至 92.10.26

報告日期：93.01.05

F1/
109300009

公務出國報告提要

頁數: 9 含附件: 否

報告名稱:

研習蘭花香氣成分分析及生物技術應用

主辦機關:

國立屏東科技大學

聯絡人/電話:

曾薇之/7703202-6109

出國人員:

陳福旗 國立屏東科技大學 農園生產系 教授

出國類別: 考察

出國地區: 美國

出國期間: 民國 92 年 10 月 01 日 - 民國 92 年 10 月 26 日

報告日期: 民國 93 年 01 月 05 日

分類號/目: F1/農技(耕作方法) F1/農技(耕作方法)

關鍵詞: 蘭花,香氣成分分析,生物技術應用

內容摘要: 為瞭解蝴蝶蘭香氣成份及產生方式、部位,以及控制香氣產生之基因與其利用,承蒙農委會經費補助,前往具香氣成份分析及分子生物利用經驗之美國實驗室,以約一個月時間,研習其分析技術及相關基因調控知識,以便應用於大花型蝴蝶蘭之香氣育種及生物技術之開發。具揮發性香氣之分析主要利用氣體層析質譜儀(GC/MS),由化學資料庫比對可以得知主要成份之構造。利用生物技術方法將香氣基因分離,轉殖到其他植物後,可促進其產生香氣成份,因此在大花型蝴蝶蘭或文心蘭可以利用基因轉殖技術導入香氣基因或其他揮發成份基因,以產生新的特性,增加商品價值。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

摘要

為瞭解蝴蝶蘭香氣成份及產生方式、部位，以及控制香氣產生之基因與其利用，承蒙農委會經費補助，前往具香氣成份分析及分子生物利用經驗之美國實驗室，以約一個月時間，研習其分析技術及相關基因調控知識，以便應用於大花型蝴蝶蘭之香氣育種及生物技術之開發。具揮發性香氣之分析主要利用氣體層析質譜儀 (GC/MS)，由化學資料庫比對可以得知主要成份之構造。利用生物技術方法將香氣基因分離，轉殖到其他植物後，可促進其產生香氣成份，因此在大花型蝴蝶蘭或文心蘭可以利用基因轉殖技術導入香氣基因或其他揮發成份基因，以產生新的特性，增加商品價值。

目次

摘要.....	1
前言.....	1
研習經過.....	2
香氣分析.....	4
植物揮發成分之收集與分析－以羅勒（Basil）為例.....	5
揮發性成分分析與生物技術之應用.....	7
參考文獻.....	8
心得與建議.....	9

研習蘭花香氣成分分析及生物技術應用
計畫編號：92 農科-1.3.1-糧-Z1

陳福旗

國立屏東科技大學農園系

摘要

為瞭解蝴蝶蘭香氣成份及產生方式、部位，以及控制香氣產生之基因與其利用，承蒙農委會經費補助，前往具香氣成份分析及分子生物利用經驗之美國實驗室，以約一個月時間，研習其分析技術及相關基因調控知識，以便應用於大花型蝴蝶蘭之香氣育種及生物技術之開發。具揮發性香氣之分析主要利用氣體層析質譜儀 (GC/MS)，由化學資料庫比對可以得知主要成份之構造。利用生物技術方法將香氣基因分離，轉殖到其他植物後，可促進其產生香氣成份，因此在大花型蝴蝶蘭或文心蘭可以利用基因轉殖技術導入香氣基因或其他揮發成份基因，以產生新的特性，增加商品價值。

前言

蘭花為台灣最重要的花卉產業之一，其中以蝴蝶蘭、文心蘭等最具經濟價值。大花型蝴蝶蘭品種佔出口相當高比率，然而大部份品種都不具香氣，且具香氣之品種多限於蠟質中小型及其他小花品種。數種原生種蝴蝶蘭都會產生香氣，例如 *Phalaenopsis violacea*、*P. schilleriana*、*P. leuddemania* 等；然而當以具有香氣之原種交配大花型品種時，其後代香氣幾乎消失。為瞭解蝴蝶蘭香氣成份及產生方式、部位，以及控制香氣產生之基因與其利用，承蒙農委會經費補助，前往具香氣成份分析及分子生物利用經驗之美國實驗室，以約一個月時間，研習其分析技術及相關基因調控知識，以便應用於大花型蝴蝶蘭之香氣育種及生物技術之開發。

有關蘭花香氣的研究只有零星的報告，蝴蝶蘭 *Phalaenopsis violacea* 花瓣所含的香氣種類極多，Borneo type 主要成份為 49% linalool、43% geraniol；Malaya type 主要成份為 27.8% linalool、26.7% elemicine；素心蘭的香氣主要為 58% nerolidol；其他蘭科植物主要成份含 benzylacetate (Kaiser, 1993)。然而蘭科植物的香氣基因不易分離，目前為止，尚無相關報告。

利用 GC-MS 分析康乃馨花朵開放時，產生之香氣成份主要有 13 種，其中 10 種包括：hexanal, (2E)-hexenal, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexen-1-ol, nonanal,

benzaldehyde, benzyl alcohol, benzyl benzoate and caryophyllene (Schade et al., 2001)。Clarkia breweri 的花瓣會釋放出 benzylacetate、benzenoid esters、benzylbenzoate、eugenol, isoeugenol, methyleugenol, 及 isomethyleugenol, benzylacetate 係由 acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase (BEAT) 所催化的反應 (Dudareva et al., 1998b; Nam et al., 1999; Wang & Pichersky, 1998; Wang et al., 1997)。BEAT 的 cDNA 已從 C. breweri 被選殖 (Dudareva et al., 1998a), 此外其花瓣亦含有水楊酸甲酯 methylsalicylate, 受到 S-Adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase (SAMT) 酵素的控制 (Ross et al. 1999)。SAMT cDNA 已被選殖且表現於大腸桿菌, 表現之特性與在花瓣上的性質相似 (Ross et al. 1999)。開花時柱頭會產生許多 S-Linalool, 以吸引蛾類昆蟲來授粉 (Pichersky et al., 1995), 此香氣是由 3S-linalool synthase(LIS)所合成, 且其 cDNA 也已被選殖 (Dudareva et al., 1996)。轉殖到番茄可增加其果實風味 (Lewinsohn et al. 2001)。但是轉殖到矮牽牛, 其花瓣則無法產生香氣, 顯示不同物種的調控方式有異 (Lucker et al., 2001)。數種植物的蛋白質邊相似性介於 40%-96%之間 (Cseke et al., 1998)。而且與 terpene synthase 合成路徑的酵素序列有相似性, 成員間催化產生各種 terpenoids。由薄荷葉片分離出另一種 3R-linalool synthase 基因, 與 Clarkia 的 3S-linalool synthase 之只有 41% 的相似性 (Crowell et al., 2002)。艾草葉片亦含有 3R-linalool, 與薄荷比較, 有 42% 相似性 (Jia et al., 1999)。

香氣基因在花卉上的應用, 除了矮牽牛轉殖 LIS 基因無法表現香氣的報告外, 也有嘗試將 LIS 及 BEAT 基因轉到洋桔梗, 以便探討花朵是否會產生香氣 (Zaccai et al., 2001)。由於蘭花是單子葉植物, 若能自蘭花分離香氣基因, 未來將可轉殖到蝴蝶蘭及文心蘭等經濟蘭花作物。

以下為研習香氣分析過程及整理相關應用文獻之報告, 並探討其在蘭花香氣改良之可行性。

研習經過

2003 年 10 月 1 日晚上自高雄小港機場搭華航班機轉中正機場, 當天直飛洛杉磯, 抵達時已是當地時間 10 月 1 日半夜, 於 10 月 2 日清晨轉搭美國航空到芝加哥機場, 再轉機到底特律, 此時已是近中午時間, 密西根大學分子發育及細胞生物系前系主任 Eran Pichersky 教授到機場迎接, 並先送我到他的實驗室參觀。

自 10 月 3 日開始的兩週, 由實驗室的博士後研究員 Dr. Eyal Fridman 帶領進行植物揮發成分的分析技術, 主要偏重在 GC/MS 分析的前置作業及判讀數據。由於實驗室專精的領域為生化基因體研究(biochemical genomics), 因此以分子生物學、生物化學、及氣體層析儀、高壓液相層析儀、氣體層析質譜儀、液體層析質譜儀等分析儀器進行與香氣或揮發成分有關之化學、酵素、基因功能之研

究，成果相當豐碩。目前該實驗室正進行的主題之一為羅勒誘變探討減少某些揮發成分之基因體研究，因此以羅勒 (*Basil*) 誘變株示範如何取樣氣體樣品。

Pichersky 先示範如何利用改造的玻璃三角瓶來收集葉片或花朵中的香氣揮發成分，經以吸附材料 Porapak Q 吸附 24 小時後，在以有機溶劑 hexane 溶出，經以氮氣濃縮溶劑後，以自動上樣方式將溶質 3 ul 打入 GC/MS，揮發成分在管柱中被氮氣分離，並由游離源將分子打成許多斷片，經與系統內之化合物資料庫比對，電腦會顯示幾個可能的分子式及其分子量，經過判定，或與標準品圖譜比對後，即可確認某一個波峰產生的主斷片屬於哪種化合物。

以吸附劑吸收之揮發性成分，經過 GC/MS 分離之種類較多，且可以用標準品或 internal standard 來校正含量，因而可以定量一朵花、一個葉片、一株植物或單位重量植物組織所釋放出來的揮發成分有多少。因此如果要進行花卉的香氣育種時，可以將選拔之品種或個體先進行香氣成分種類調查，針對主成分分析個體間之差異，雜交之後帶族群也可以進行定性及定量分析，以選拔出香氣含量較高或較穩定之單株。

另一種分析方法為利用微量萃取裝置 (solid phase microextraction, 簡稱 SPME)，此裝置唯一之微量注射針頭，內曾裝有吸附劑如 polymethylsiloxane (PDMS)，將內針頭突出插入到一個密閉的小空間，例如玻璃漏斗，其內事先將小花苞小心塞入，漏斗口以鋁箔紙封好，等花開時吸附 30 分鐘，取出針頭，直接注射到 GC/MS 的針孔，其內的高溫(約 250°C) 可使吸附劑上的揮發性成分汽化，因而質譜儀可加以分離及鑑別。利用 SPME 的方法，通常是使用於定性分析，亦即判別有哪些種類的成分，因此不能做為定量的依據；而且因為吸附的時間較短，因此能夠檢測的分子種類較少，只限於含量較高成分的檢測。此方法再育種族群的大量檢測時，較為簡便，且較省時間。

在 10 月 15 日，Pichersky 教授邀請到德國普郎克化學生態研究所 (Max-Planck Institute for Chemical Ecology) 所長兼分子生態系的系主任 Ian T. Baldwin 教授來演講有關利用分子生物學研究植物生態的專題，他的研究主題是探討植物與嚙草動物間之交互關係以及演化關係，當植物如野生煙草 *Nicotiana attenuata* 受到不同動物咬食時，所產生的化學訊號不一樣，但也有重疊之處，例如當兔子大量咬食其葉片時，煙草的受傷反應開始合成尼古丁成分，而且含量增加，使得咬食的動物對煙草失去興趣，因而可以重新生長。若是昆蟲咬食，因為昆蟲的口器會分泌一些脂肪酸類化合物，刺激煙草產生水楊酸甲酯及乙烯，這一類化學訊號刺激煙草本身產生 protease inhibitors，當昆蟲進食許多含抑制蛋白的葉片時，其消化不良，因而不再進食或死亡。而含不同量 protease inhibitors 的煙草個體間在自然環境下也會互相競爭，含量多的其生長較緩慢。利用轉基因技術將 protease inhibitor 基因轉到含量少的煙草時，原來的生長優勢會減弱。有些植物在遭受昆蟲咬食時，除了會產生水楊酸甲酯及乙烯、刺激產生尼古丁、protease inhibitors 之外，還會刺激葉片產生其他揮發性成分，因而吸引捕食動物 (predators)，前來將昆蟲殺死取食，此外昆蟲產卵的比率降低，使得蟲口數也因

而降低，植物可避免受害。這種植物生態上的生存策略，在農作物的管理上應該相當有用，可以使用一些安全、對環境無害的化學藥劑如荷爾蒙等，處理溫室植物，使植物產生抗蟲獲抗病反應，因而能夠防止昆蟲取食，或減少病害，進而農藥的使用可以減少。此種研究尤其值得探討是否可以應用於蝴蝶蘭之生產，因為蝴蝶蘭栽培在溫室內，可以在晚上較為密閉時間來處理安全藥劑，刺激植株產生抗蟲及抗病反應。

香氣分析

將阿拉伯芥植物放到平底三角瓶，兩側上下各接一個小玻璃連通管(此即為簡易自治製 headspace)，一端以活性炭濾紙使空氣通過，另一端則用另一種窄口徑玻璃管連接，其內亦塞入特殊設計活性炭濾網並加以抽氣，使瓶內累積之植物釋放氣體濃縮於濾紙上，再將 hexane 溶劑打入小玻璃管中，將濃縮的氣體或香氣成分溶解，打入 GC-MS，並與標準品比對其質譜，若是未知化合物，則必須使用其他儀器如 NMR、IR 等圖譜比對。另一種收集工具微細針筒，其針頭內層有一含吸附材料薄膜濾紙(SPME 針筒)，可比吸附香氣成分，再直接打入 GC-MS 管柱，其內的高溫 (約 250°C) 可使針頭內吸附之氣體揮發而流入管柱，其出現的成分較複雜，peaks 較多，解讀較不容易，沒有標準品較不易分析。通常針對未知氣體多種成分時，可以先採用氣體層析儀找到將各種化合物分開之條件，再以此條件將氣體打入 GC/MS 中分析，分離之每一個波峰再檢測其離子斷片質量分布圖譜，並與電腦中之化合物資料庫進行比對。

Pichersky 教授的實驗室除了有 GC-MS 外，尚有 HPLC、LC-MS，後者可用於鑑定不具揮發性質之化合物。

質譜的分析由於有資料庫的幫助，使得現在對於化合物之分析更加容易，它可用於分析環境污染物 (如環境荷爾蒙)、天然化合物、香氣成分 (應用於食品、化妝品、植物香氣品種改良)、石油化學品之鑑定、藥物檢驗等領域，其用途相當廣泛。

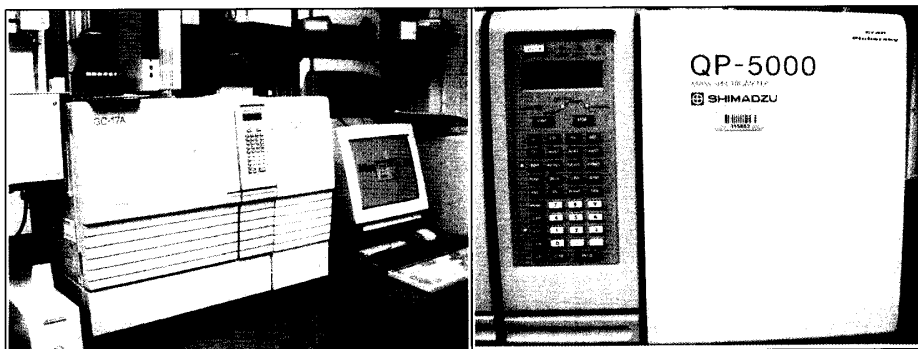


圖 1. 氣體層析質譜儀 GC/MS。(左) 儀器本體，含氣體層析部分及質譜儀。(右) 質譜儀部分。此兩圖均為島津 QP-5000 質譜儀。

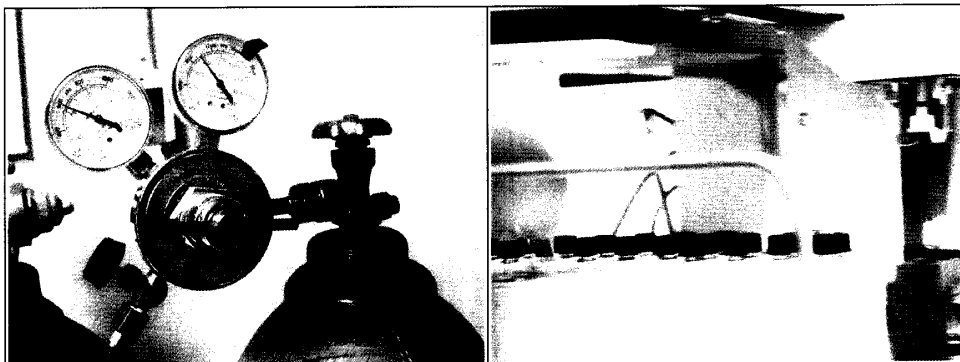


圖 2. (左) GC/MS 之解析氣體為氦氣 (He)，(右) 樣品多時，可使用自動上樣裝置，其中黃蓋瓶子含對照溶劑。

植物揮發成分之收集與分析—以羅勒 (Basil) 為例

1. 以 Headspace 收集濃縮揮發成分
2. 以 SPME 濃縮針頭直接在密閉容器中收集濃縮一定性
3. 以有機溶劑萃取—
 - 甲、Methyl tert-butyl ether (MTBE)
 - 乙、Ethyl acetate
 - 丙、Acetone
 - 丁、Hexane

由自行設計之三角瓶 headspace 所收集之濃縮氣體，以 3 ml 之 hexane 溶出於小玻璃試管中，以氮氣將溶劑趕到剩下約 0.2 ml，將其轉移至小玻璃瓶，瓶口以 septum 墊片封住，放到 GC/MS QP5000 自動取樣架上，樣品分為花朵氣體及葉片氣體，並以 ethyl acetate 為對照。將收集好濃縮的樣品以自動上樣機取 3 μ l 打入儀器，經由管柱中的氦氣攜帶分離，並由質譜偵測分子斷片之質量分佈，與化學資料庫進行比對，即可得知該成份最可能的結構及其分子式。

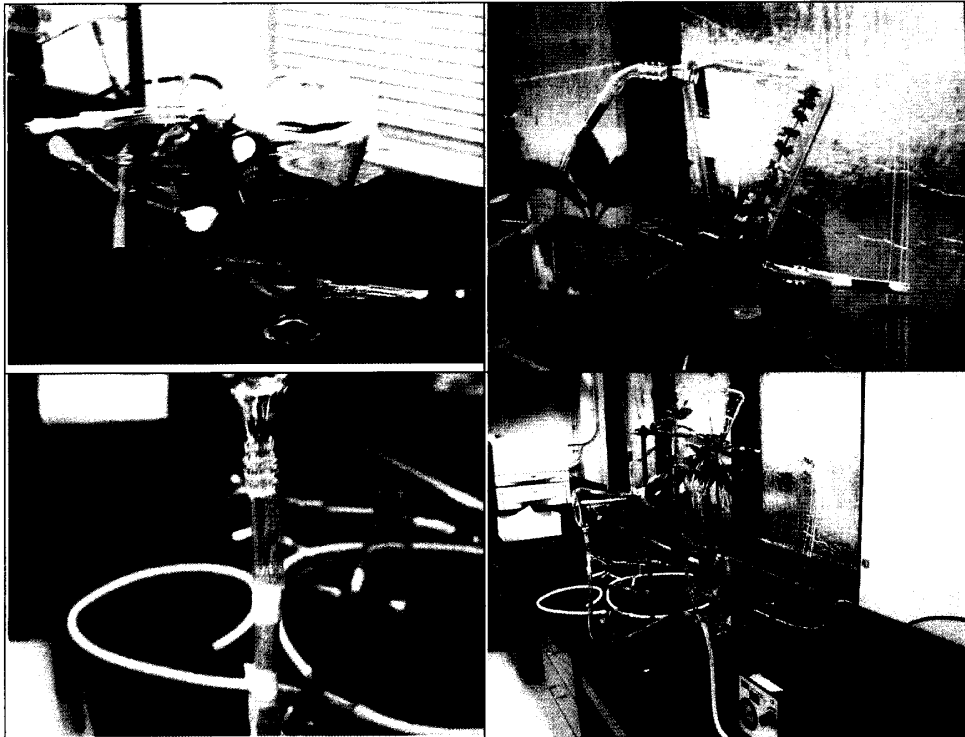


圖 3. 以三角瓶設計成 Headspace 收集羅勒花朵及葉片之揮發成分。A. 三角瓶連接上下兩側連通管；B. 將花序小心放入倒置三角瓶中，瓶口以蠟膜封閉；C. 抽氣端連通管上接一個自製之收集管，管內填充 Porapak Q 吸附材料；D. 抽氣 24 小時，進氣口之連通管以填充活性碳粉及玻璃綿之管子過濾空氣。

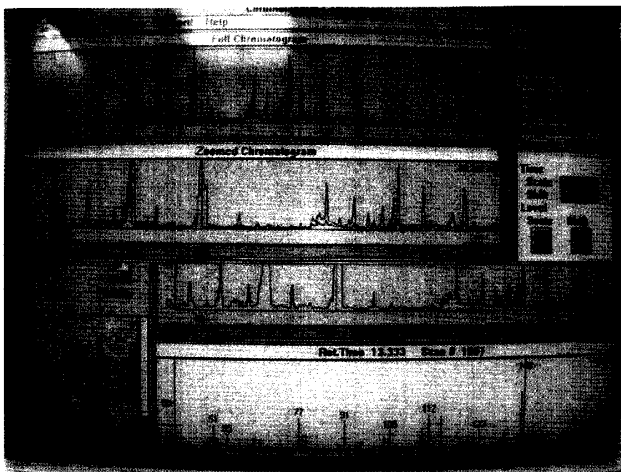


圖 4. GC/MS 分離出來之羅勒葉片氣體質譜剖析圖。最下方的分子斷片分佈圖為 Methyl chavicol 所產生。

揮發性成分分析與生物技術之應用

1. 香花之育種

目前有許多植物的香氣基因已經被分離出來，其中主要的成分為沉香醇 (linalool)，植物花朵或葉片在適當時間及發育時期會產生香氣，例如羅勒葉片及花朵會產生沉香醇，此外葉片還產生 methyl charvicol，這是羅勒有味道的主要成分。許多植物的果實也會產生出沉香醇，例如番石榴、桃、李、鳳梨、百香果等 (Bernreuther and Schreier, 1991)。Clarkia breweri 為一種草花植物，其花朵釋放之香氣主要成分為沉香醇，用以吸引授粉昆蟲。利用生化方法，將沉香醇合成酶加以純化測定氨基酸序列，並以其設計核酸引子，可將其控制基因分離出來 (Pichersky et al., 1995; Dudareva et al., 1996)。

玫瑰是一個世界性的重要木本花卉，可供盆花、切花、庭園樹、精油、香水等用途，因此對於玫瑰花朵中香氣產生的生物化學即分子生物學研究特別重要，以色列成立了一個所謂花瓣基因體 (petal genomics) 的大型研究計劃，希望能夠將玫瑰花瓣中合成產生的香氣成分進行詳盡分析，並將調控的基因分離出來，以便能夠進一步利用生物技術來改良玫瑰的香氣，或用於香水及精油的生產，目前以有不少成果 (Guterman et al., 2002; Lavid et al., 2002; Vainstein et al., 2002)。台灣在花卉香氣的研究通常用較傳統的萃取方法，成果有限，最近已經有成功大學生物系學者投入研究，然而尚未有實際的成果。由於蘭花的香氣，特別是蝴蝶蘭與文心蘭，雖已有前人的零星研究，其控制的基因目前仍然沒有報導，原因可能在於蘭花是特化的單子葉植物，而目前已經發表香氣基因序列的植物多為雙子葉植物及裸子植物，顯示可能還有極大的發揮空間，可嘗試以氣體層析質譜儀來確定蘭花所釋放香氣的一些主要成分，在利用生物化學方法純化其酵素，確定酵素活性後，測定其胺基酸序列，並據以設計核酸引子進行 PCR 反應把香氣基因選殖出來。

本實驗室曾經以不同植物沉香醇合成酶的基因比對後，設計保守區域的核酸引子，進行 PCR 反應，但所合成的 DNA 片段經過定序比對都不是與沉香醇或 terpenoid 化合物的合成基因相似，可見蘭花的基因可能與其他雙子葉植物有相當大的差異。

2. 園產品風味的改良

將 linalool synthase 基因轉殖到番茄，轉殖植株所結果實之風味經過化學分析，顯示其 linalool 成份增加，可以增加風味。其他園藝作物應可以利用相似方法提高果實花萼之風味。

參考文獻

Baldwin, I. T. 2001. An ecological motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiol.* 127: 1449-1458.

Bernreuther A, Schreier P. 1991. Multidimensional gas chromatography/ mass spectrometry: a powerful tool for the direct chiral evaluation of aroma compounds in plant tissues: II. Linalool in essential oils and fruits. *Phytochem. Anal.* 2: 167-170.

Dudareva N, Cseke L, Blanc VD, Pichersky E. 1996. Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel pattern of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flowers. *Plant Cell* 8: 1137-1148.

Guterman I., M. Shalit, N. Menda, D. Piestun, M. Dafny-Yelin, G. Shalev, E. Bar, O. Davydov, M. Ovadis, M. Emanuel, J. Wang, Z. Adam, E. Pichersky, E. Lewinsohn, D. Zamir, A. Vainstein, and D. Weiss. 2002. Rose scent: Genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell* 14: 2325-2338.

Lavid N., J. Wang, M. Shalit, I. Guterman, E. Bar, T. Beuerle, N. Menda, S. Shafir, D. Zamir, Z. Adam, A. Vainstein, D. Weiss, E. Pichersky, and E. Lewinsohn. 2002. O-Methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals. *Plant Physiol.* 129: 1899-1907.

Vainstein A., E. Lewinsohn, E. Pichersky, and D. Weiss. 2002. Floral fragrance. New inroads into an old commodity. *Plant Physiol.* 127: 1383-1389.

心得與建議

1. 此次研習承蒙農委會經費補助，以及密西根大學 Pichersky 教授的美意，使得本人能夠在休假期間前往研習香氣成分之分析技術，獲益良多。並且也獲得 Pichersky 教授的許可，攜回數個調控香氣及抗病相關之酶基因，包括 *Clarkia* 的 linalool synthase cDNA、控制甲基水楊酸合成的甲基轉移基因、以及控制甲基茉莉酸合成酶的甲基轉移酶基因，前者經構築到植物表現載體後，可轉殖到經濟花卉如蝴蝶蘭或文心蘭，以增加我國兩種蘭花之市場競爭力；後兩者表現於植物時，植物會產生甲基水楊酸以及甲基茉莉酸，兩者均為揮發性物質，可刺激植物本身產生抗病或抗蟲反應，而且鄰近植物也會受到影響，因而也表現防禦反應，這在溫室蘭花的生產上可能有實用價值；此外由於植物本身產生了防禦反應，將來可能可以減少農藥的施用，對環境及對人體的影響降到最低，由於農藥的使用減少，生產成本應該可以降低。
2. 研習期間本人也協助該實驗室進行羅勒之組織培養，以便未來可以利用基因轉殖進行羅勒的功能性基因體研究，改變不同香氣成分。雖然短時間內沒有具體成果，但是合作關係可以持續下去，因此將協助羅勒組織培養再生的技術，以供其應用。
3. Pichersky 是研究香氣成分生物技術的先趨，目前並獲得美國科學基金會四年 80 萬美金的經費支助，研究揮發成分控制基因中，甲基轉移酶基因的分離及調控研究，受到相當肯定。未來有機會建議在適當研討會可邀請他到台灣演講及傳授經驗。
4. 由於大花形蝴蝶蘭通常沒有產生可以聞到的香氣，應該可以利用生化基因體的試驗技術，進行蝴蝶蘭的香氣分析及相關基因選殖與利用，使大花形品種及文心蘭切花將來可以產生香氣，以開拓更廣大的市場。如果可以獲得適當的研究經費，應該可以著手研究蝴蝶蘭的香氣育種，以免失去我國的市場先機。
5. 經由此次研習獲得之經驗，將可應用於蘭花香氣相關生物技術之研發，並建立長期合作關係，將有用之香氣或與抗病抗蟲有關之植物揮發性氣體之基因引入經濟栽培作物，以育成高附加價值之花卉產品。