

出國報告（出國類別：研究）

研習扁柏醇生合成與代謝出國報告書

服務機關：行政院農委會林業試驗所

姓名職稱：鍾振德 副研究員

派赴國家：美國

出國期間：97年12月28日~98年6月28日

報告日期：98年9月14日

摘要

赴美國喬治亞大學森林學院研究扁柏醇生合成與代謝，扁柏醇於 1931 年由日人加福均三與野副鐵男在台灣扁柏心材發現，後經證實為非常好的天然高效抗菌劑，廣泛運用於醫藥、化妝品與食品。1998 年 Ono 等人在台灣尚楠細胞培養發現含量極高的扁柏醇，由於其枝葉並不含有扁柏醇，因此對於扁柏醇如何由無而生成，感到非常的好奇。1985 開始收集許多的台灣尚楠種源，種源依照葉部精油可以分成三個品系，取 8 個種源誘導細胞並分析其扁柏醇含量，發現含量有高達 8000 ppm 以上品系，高於日本學者的 1700 ppm 近五倍，這使扁柏醇生產更具商業價值。另研究扁柏醇的誘導時機，發現葉片放入 MS 添加 3 mg/L NAA 培養基，培養七天即可誘導出扁柏醇，扁柏醇的生成可能源於受傷後所啟動之防禦。

目次

一、過程-----	1
二、研究目的-----	1
三、緒言-----	2
四、材料與方法-----	2
五、結果與討論-----	3
六、心得與建議-----	6
七、參考文獻-----	7

研習扁柏醇生合成與代謝

一、過程

出國期間自 2008 年 12 月 28 日至 2009 年 7 月 4 日返國。2008 年 12 月 28 日從台灣搭機到美國喬治亞州 Athens 鎮喬治亞大學(University of Georgia)，與森林學院講座教授 Dr. Chung-Jui Tsai 和其夫婿 Dr. Scott Harding 研究員合作研究，直至 2009 年 6 月 26 日離開赴加拿大訪問。在美國期間，實驗扁柏醇生合成與代謝之研究，同時參與此研究室有關 **Metabolic profiling and biotechnology** 之相關研究，獲益良多。離開美國之前，於 2009 年 6 月 6-10 日至南卡羅萊納查爾斯頓鎮(Charleston, South Carolina)參加 2009 國際組織培養年會(2009 In Vitro Biology Meeting)，那是來美國第一次離開喬治亞大學，其餘時間皆在實驗室進行研究。本預定 2009 年 6 月 28 日返國，後來加拿大 BC 省林業部林業研究所邀請，於 2009 年 6 月 26-28 日赴加拿大訪問，由旅加學者應成俊博士與遺傳研究部門主管 Dr. Alvin Yangurt 陪同下參訪加拿大 BC 省林木種子園、種源後裔試驗林與其位於維多利亞之研究室。加拿大 BC 省林業非常蓬勃，其研究主要聚焦在溫帶針葉樹種，以花旗松為主。參訪加拿大 BC 省林業研究所後，於 2009 年 6 月 28 日至 7 月 2 日參加兩年一次的林木生物技術國際研討會，此研討會 2009 年在加拿大 BC 省 Whistler 舉行，我將在美國進行有關扁柏醇生合成與代謝的研究成果，發表在此研討會，同時與來自世界各國之林木生物技術研究人員交流。

二、研究目的

對於台灣肖楠(*Calocedrus formosana*)開花結實研究了一段時間，研究過程中收集了台灣大部分台灣肖楠種源。2003 年我們開始進行台灣肖楠所有種源之扁柏醇含量進行資源調查，研究結果發現種源單株間存在非常大的變異。由於台灣肖楠經激勃素處理可以誘導開花，為了追蹤激勃素的變化，因此經常需切取芽體進行植物生長調節素分析，一次偶然機會，把切下來的花芽取部分去分析扁柏醇含量，發現花芽中的扁柏醇含量為零，但其它葉部卻含有扁柏醇。花芽分化過程為什麼扁柏醇會消失？這引起我們研究的興趣。

日本學者 Ono et al. (1998)發表報告指出經由台灣肖楠懸浮培養(suspension culture)可生產 0.17% 乾重的扁柏醇，遠高於我們分析台灣肖楠枝葉 1~2 千倍，且紅檜的細胞團培養結果也證實含有扁柏醇，因此扁柏醇的生合成途徑天然與人工培養可能有所差異。過去幾年利用台灣扁柏、紅檜與肖楠不同組織部位進行組織培養，再誘導出細胞團，研究結果顯示不同品系細胞團的扁柏醇含量差異極大，最低 24 ng/g.dw 到最高 61,026 ng/g.dw，差距達 2500 倍以上，這些材料提供進一步研究之基礎。

扁柏醇的生合成路徑(biosynthetic pathways)尚不清楚，但從目前的研究結果推測有幾個路徑合成扁柏醇(Fujita et al. 2000, Zhao et al. 2001)，起始點大部分走

GAP/pyruvate 路徑產生 geranyl pyrophosphate(GPP)，極少部分走 mevalonate 路徑產生 GPP。從 GPP 開始可能轉變成三個物質，分別為 2-terpinne, Sabinene, 3-carene。這三個物質會以不同的路徑合成至扁柏醇，2-terpinne 先轉變成 3-terpineol，再轉成 terpinen-4-ol，次經過 thujane，以及 3-thujone，最後變成扁柏醇。Sabinene 則可能直接轉變成 3-thujone，最後變成扁柏醇。3-carene 則透過一個不明中間物質，轉變成扁柏醇。

三、緒言

1931 年日人加福均三與野副鐵男在台灣扁柏(*Chamaecyparis obtusa*)心材發現扁柏醇(Hinokitiol, β -thujaplicin)。扁柏醇是很好的天然、高效、低毒抗菌劑，可以殺死或抑制一般細菌、霉菌和酵母菌的生長，且不會產生抗藥性菌種，而且扁柏醇對人類與動物都不具毒性，因此廣泛應用於醫藥、化妝品、食品等等(Trust and Coombs 1973, Miyamoto et al. 1998)。扁柏醇由於是來自天然之有效且低毒抗菌劑，因此也被使用在食品當作防腐或殺菌劑，最近發現其可抑制乙烯的形成與降低呼吸作用，可用於製成鮮果保鮮之防菌紙(Aharoni et al. 1993)。扁柏醇存在於部分柏科(Cupressaceae)，同屬柏科之台灣尚楠枝葉亦含有此成分(鍾振德 未發表資料)，而林童傑(1996)分析台灣紅檜(*Chamaecyparis formosensis*)枝葉沒有含扁柏醇，但張上鎮與王升陽(1995)於木材中發現有此成分。

四、材料與方法

(一) 研究材料：

試驗材料取自台灣尚楠種子園 8 個種源後裔種子，分別為 no. 2, 7, 8, 18, 19, 24, 27 與 28 等八個，經柯季宏等(2006)分析其葉部精油與化學多態性，可將八個種源分成三群化學品系，分別為 no. 2, 7, 8, 24 為 α -Pinene 型，no. 18 & 19 屬於混合型，no. 27 & 28 為 Limonene 型。將 8 個種源後裔種子無菌播種後，分別切取根、下胚軸、子葉與上胚軸，培養於 MS 添加 3 mg/L NAA 固體培養基內，誘導癒合組織形成，大約 40-50 天培養後，將癒合組織取出冷凍乾燥，約 6-12 hrs 即可完成冷凍乾燥，於研鉢研磨成粉狀，利用熱裂解氣相層析質譜儀(pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry)，簡稱 Pyrolysis GC/MS 進行扁柏醇含量分析。

(二) 試驗設計與處理：

1. 比較 8 個營養系誘導癒傷組織之扁柏醇含量:

取上述材料 8 個營養系種子苗下胚軸、子葉與上胚軸等三種試驗材料，於 MS 添加 3 mg/L NAA 培養基誘導癒傷組織，培養 8 個星期之後，混合三種試驗材料冷凍乾燥，冷凍研磨成粉後上樣分析。每個營養系重複 20 次，取其中 10 個進行分析。

2. 比較 no. 2 & 8 兩個營養系種子苗不同部位誘導癒傷組織之扁柏醇含量:

取上述材料 no. 2 & 8 兩個營養系種子苗不同部位，包括胚根、下胚軸、子葉與上胚軸等四種試驗材料，於 MS 添加 3 mg/L NAA 培養基誘導癒傷組織，培養 8 個星期之後，比較分析扁柏醇含量。

3. 扁柏醇誘導之 Time course:

台灣尚楠葉部不含扁柏醇，取經無菌培養之苗木，切取葉片一節置於 MS 添加 3 mg/L NAA 培養基誘導癒傷組織，每隔七天取出冷凍乾燥並冷凍研磨成粉，上樣分析合計取 0, 7, 14, 21, 28, 35 等六個時間點之癒傷組織之扁柏醇含量。

(三) 試驗分析方法：

利用熱裂解氣相層析質譜儀(pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry, 簡稱(Pyrolysis GC/MS)，待測樣品加熱使裂解產生揮發性的小分子，而後再導入 GC/MS 內，得到含各種成份的熱裂解層析質譜圖，再根據這些圖譜獲得定性、定量的研究。

五、結果與討論

(一) 8 個營養系誘導癒傷組織之扁柏醇含量之比較：

8 個營養系每個營養系各有 10 個種子苗誘導癒合組織樣品檢測，合計 80 個樣品。結果顯示 no.2 有一株，其扁柏醇含量 8199.6 $\mu\text{g/g.dw}$ ，高於平均值達 8 倍，而上有 no. 18 兩株與 no. 28 一株之扁柏醇含量約在 4000 $\mu\text{g/g.dw}$ 左右 (Fig. 1)。8 個營養系彼此之間，扁柏醇含量沒有顯著差異，但各別單株之間的差異遠比營養系之間顯著，意即篩選高扁柏醇含量應以單株為主。Fig. 2 為 no. 2 營養系癒傷組織之層析圖與其質譜圖，扁柏醇的 retention time 為 22.76 min，分子量 164。

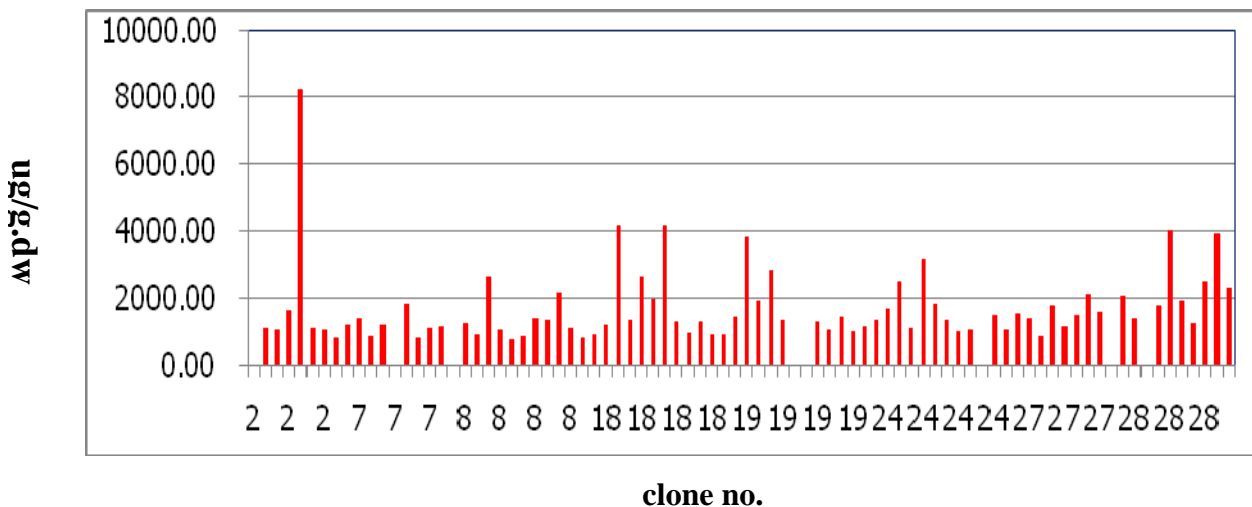


Fig. 1. One of the clone 2 plants produced approximately 8-fold higher than the average amount of hinokitiol

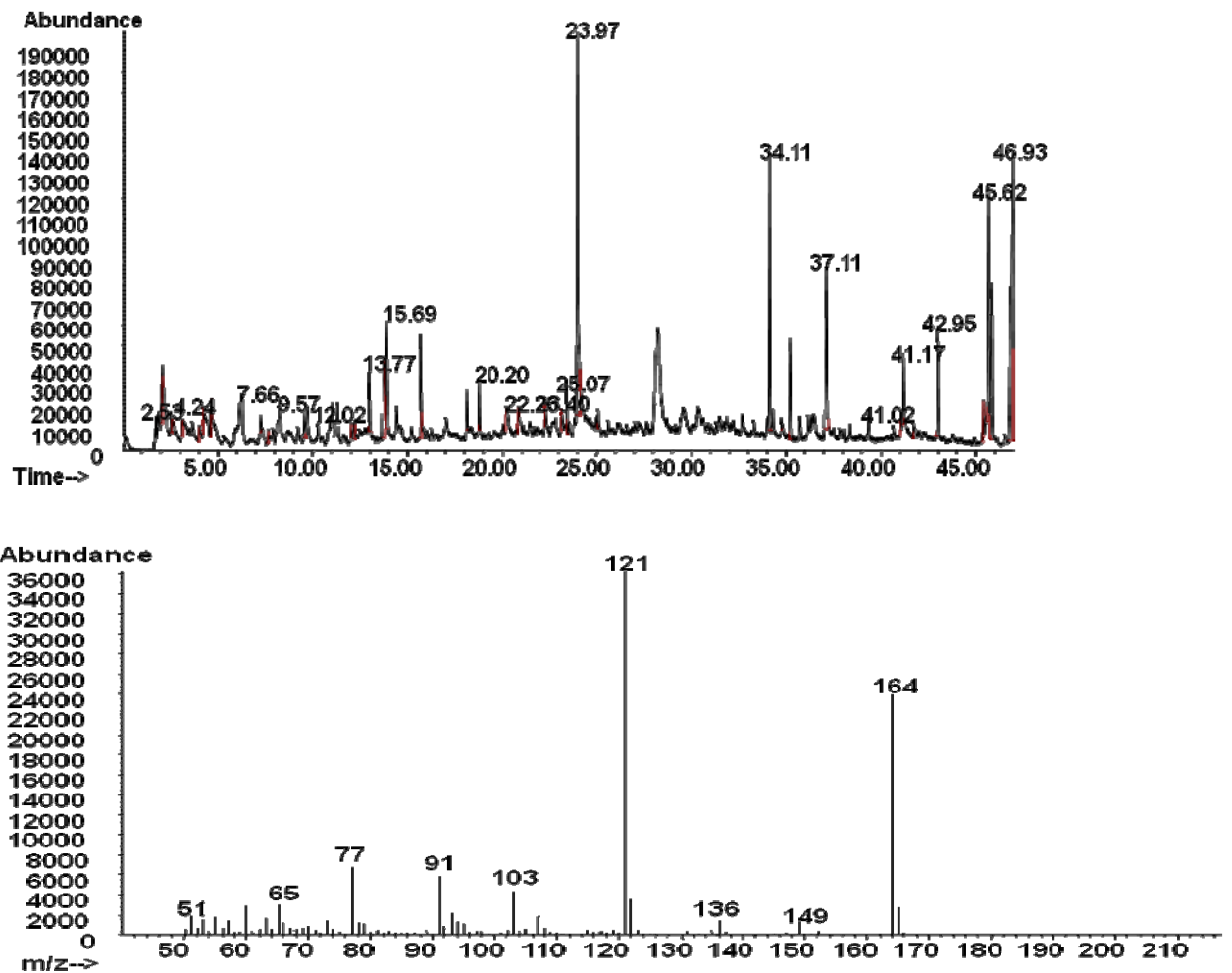


Fig. 2. Total ion chromatogram and hinokitiol spectrum of clone 2. Hinokitiol Rt:22.76 min

(二) no. 2 & 8 兩個營養系種子苗不同部位誘導癒傷組織之扁柏醇含量之比較：

利用營養系 no. 2 & 8 無菌苗，取其根、下胚軸、上胚軸與子葉四部份誘導癒傷組織到第八週(Fig. 3)，分析扁柏醇含量，由 Fig. 3 可以看出 no. 2 和 8 上胚軸 Hinokitiol 含量分別為 4652.2, 961.7 $\mu\text{g/g.dw}$ ，下胚軸為 7686.3, 4083 $\mu\text{g/g.dw}$ ，子葉含量則為 5079.5, 235.1 $\mu\text{g/g.dw}$ ，根 no. 2 含量為 26324.9 $\mu\text{g/g.dw}$ ，而 no. 8 則因樣品不足而無法偵測。

Hinokitiol 在台灣尚楠無菌苗之上胚軸、下胚軸、子葉、根和葉片都能被誘導出來，且 no. 2 各部位的 Hinokitiol 含量都遠比 no. 8 多(Fig. 4)。在 no. 2 營養系中，根的癒傷組織其 Hinokitiol 含量最多，高於其它部位 4-6 倍，但若以癒傷組織重量及其 Hinokitiol 含量來計算，下胚軸的 Hinokitiol 產量遠高於其他部位。

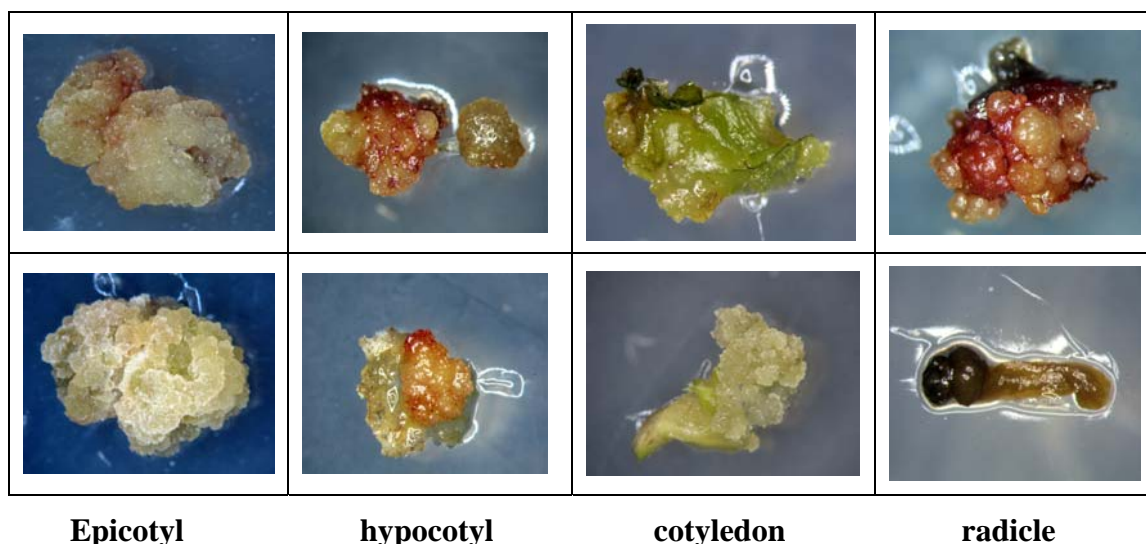


Fig.3. Calli derived from different tissue showed different colors. Epicotyl explants yielded the largest callus amount. Radicle explants had the lowest callus yield, and sometimes did not produce callus at all. 1st row: no. 2, 2nd row: no. 8

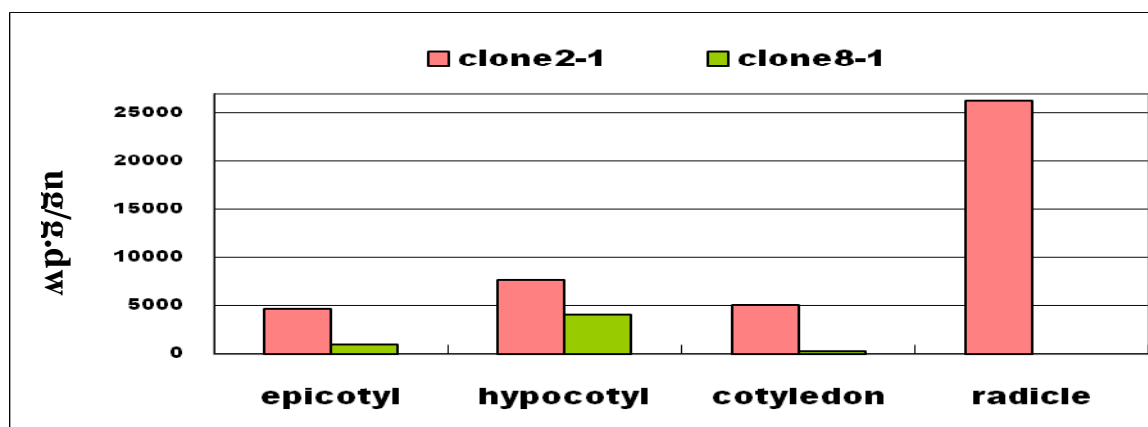


Fig. 4. Hinokitiol concentrations from four different callus sources.

(三) 扁柏醇誘導之 Time course :

台灣尚楠葉部不含扁柏醇，取經無菌培養之 no. 18 苗木，切取葉片一節置於 MS 添加 3 mg/L NAA 培養基誘導癒傷組織，分析樣品有 0, 7, 14, 21, 28, 35 天等六個時間點之癒傷組織，而於第 28 天才可明顯看出癒傷組織，但由解剖顯微鏡則於第 7 天即可在組織傷口看到癒傷組織(Fig. 5)。分析結果發現，Hinokitiol 在癒傷組織形成第一週已被誘導出來，而在第三週達到最大量。由 Fig. 6 可以看出第 7 天 Hinokitiol 含量為 190.2 μ g/g.dw，第 14 天含量為 607.6 μ g/g.dw，第 21 天含量為 3392 μ g/g.dw，第 28 天含量為 3135.9 μ g/g.dw 與第 35 天含量為 2290.5 μ g/g.dw。

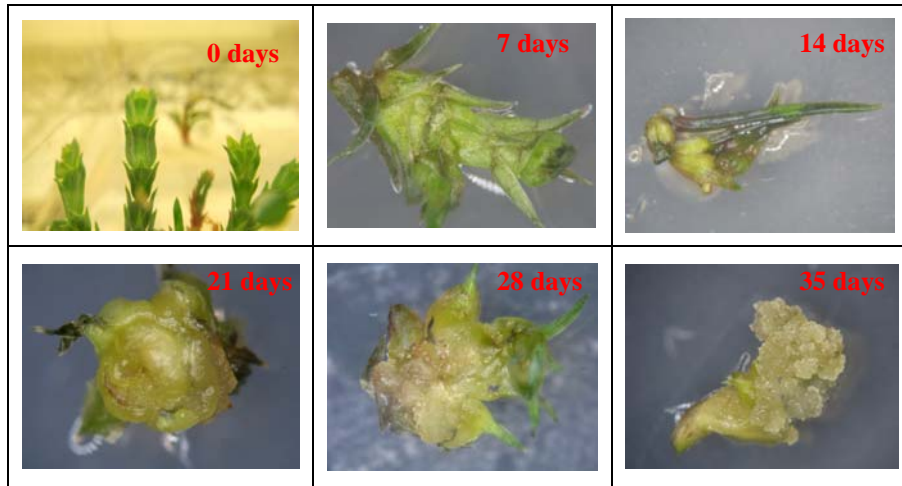


Fig. 5. Leaf tissue does not contain hinokitiol. Callus samples were taken every 7 days and analyzed for hinokitiol. After 7 days, callus formation was not yet evident to the naked eye, but is visible by 21 days. At 35 days, there is a large mass of callus.

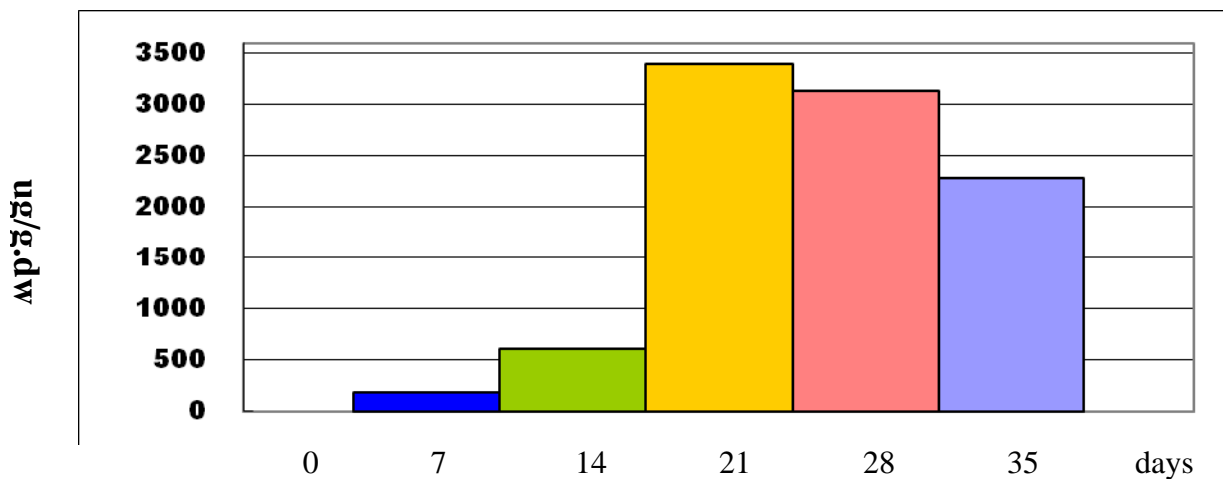


Fig. 6. Callus derived from leaf explants were analyzed for hinokitiol concentration at 7 days intervals. Hinokitiol was detected after 7 days, and reached over 3,000 µg/g dry wt at 21 days. The decline of hinokitiol concentrations from day 21 to 35 is likely due to the fast cell proliferation.

六、心得與建議

六個月研究最大收穫在於了解有關 metabolic profiling 與生物技術之相關研究。在六個月研究中曾參與轉殖 isochorismate synthase 基因至阿拉伯芥突變種研究，此突變種由於合成 salicylic acid 路徑缺陷，造成其無法抵禦病蟲之危害，經轉殖 isochorismate synthase 基因之後，明顯改善其對病蟲之抵抗能力，而藉由 metabolic profiling 方法，秤取僅 12 mg 阿拉伯芥樣品，比較分析轉殖基因與非轉殖基因樣品

間的 salicylic acid 含量，證實轉殖 isochorismate synthase 基因之後，其 salicylic acid 含量增加，但並未達到正常的水準，意即從 isochorismate 生合成到 salicylic acid 的過程中，可能還有一個中間物質，但尚未確認此中間物質為何物。

利用 metabolic profiling 可以比較分析基因轉殖後林木之代謝變化。利用此方法研究的項目非常的廣泛，尤其過去許多的林木生理研究，僅看其中一兩種化合物之變化，卻無法得到一個全面性的輪廓，此時利用 metabolic profiling 方法，可以以非常少量的樣品，分析比較處理樣品之生理代謝之差異，從此得到一個清楚的輪廓，而不致於瞎子摸象。我的研究因為六個月研究而開了一扇窗，可預期將引導我未來看到許多的景象，釐清許多的問題癥結。

六個月進行扁柏醇生合成與代謝研究後，順道至加拿大 BC 省參訪(Fig. 7A) 參加兩年舉辦一次的 2009 林木生物技術國際研討會，將六個月的研究成果以 poster 方式於此國際研討會發表(Fig. 7B)。台灣林業界過去不曾參與此國際研討會，這是令我驚訝的事，尤其生物技術已被列為世界各國重點之研究，參與國際研討會才能了解整個發展的趨勢，大會結束前表決通過 2011 年將於巴西舉辦，巴西為桉樹重要生產與研究國家，預期在 2011 年在桉樹的研究將有非常重要的進展。台灣參與了桉樹生物技術研究甚多，理應積極的準備，以參與 2011 年於巴西舉辦之國際研討會，與世界各國共同討論，同時也釐清楚台灣的桉樹生物技術研究在整個全球的布局中，我們應該投注在什麼地方。

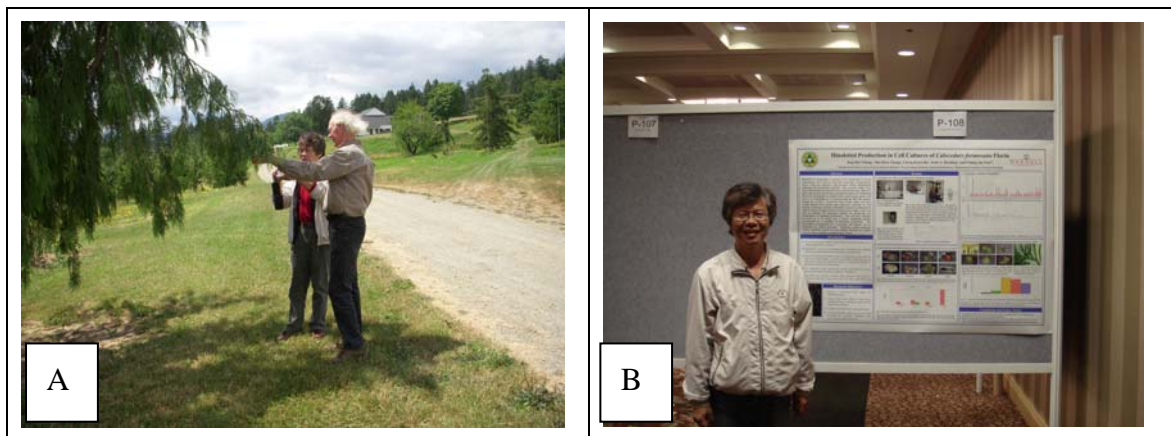


Fig. 7A. Visiting seed orchard of yellow cedar, Victoria, BC, Canada. 7B. “Hinokitiol production in cell cultures of *Calocedrus formosana* Florin” poster was presented in 2009 IUFRO Tree Biotechnology, June 28-July 2, 2009, Whistler, BC, Canada.

七、參考文獻

- 林童傑，1996，台灣紅檜葉之成分研究，國立台灣大學化學研究所博士論文。
- Endo M, Mizutani T, Matsumura M. 1988. High-performance liquid chromatographic determination of hiokitiol in cosmetics by the formation of difluoroborane

- compounds. *J of Chromatography* 455:430-3.
- Ono M, Asai T, Watanabe H. 1998. Hinokitiol production in a suspension culture of *Calocedrus formosana* Florin. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(9):1653-9.
- Trust TJ, Coombs RW. 1973. Antibacterial activity of beta-thujaplicin. *Can J Microbiol.* 19(11):1341–1346
- Yen TB, Chang HT, Hsieh CC, Chang ST. 2008. Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. *Bioresource Tech* 99: 4871–4877
- Zhao J, Fujita K, Yamada J, Sakai K. 2001. Improved *B*-thujaplicin production in *Cupressus lusitanica* suspension cultures by fungal elicitor and methyl jasmonate. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:301-5.