

# 青剛櫟懸浮細胞培養建立 與多酚性化合物分析<sup>1</sup>

楊金昌<sup>2</sup> 王亞男<sup>3</sup> 李衛宗<sup>4</sup>

(收件日期：民國 91 年 2 月 8 日、接受日期：民國 91 年 3 月 20 日)

**【摘要】**本研究以青剛櫟未成熟胚、無菌苗葉片及莖培植體誘導之癒合組織，進行懸浮細胞培養系統之建立及生物反應器培養條件初步探討，並進行其多酚性化合物之檢測。結果顯示以 0.5 g 無菌苗葉片誘導之癒合組織，接種至 30 mL 液態培養基中建立之懸浮細胞培養效果較佳。MS 液態培養基中補充 3% Sucrose 時，兩週增生量可達約 80mL SCV；無菌苗莖誘導之癒合組織，亦以全量 MS 培養基進行細胞懸浮培養較宜。以 HPLC 檢測青剛櫟新鮮葉片、枝條、堅果、癒合組織及懸浮培養細胞多酚性化合物含量，結果顯示新鮮葉片含有 (+)-catechin、(-)-epicatechin、(+)-gallocatechin、(-)-epigallocatechin、rutin 及 procyanidin-B-4，枝條及堅果則檢測出 (+)-catechin 與 (-)-epicatechin。而青剛櫟癒合組織及懸浮培養細胞則只測出 (+)-catechin，莖及胚誘導之癒合組織及由葉片及莖癒合組織建立之懸浮細胞均只含 (+)-gallocatechin。無菌苗葉片誘導之癒合組織經建立懸浮細胞培養後，可成功放大至 2L 的生物反應器培養。

**【關鍵詞】**青剛櫟、癒合組織、懸浮細胞培養、生物反應器、多酚性化合物。

## CELL SUSPENSION CULTURE ESTABLISHMENT AND POLYPHENOLIC COMPOUND ANALYSIS OF *CYCLOBALANOPSIS GLAUCA*<sup>1</sup>

Kim-Chong Yong<sup>2</sup> Ya-Nan Wang<sup>3</sup> Wei-Tsung Li<sup>4</sup>

(Received February 8, 2002; Accepted March 20, 2002)

**【Abstract】** Callus induced from immature embryo, leaf and stem explants of *in vitro* seedlings of *Cyclobalanopsis glauca* were used for establishing cell suspension culture system condition test of bioreactor culture. Polyphenolic compounds of callus and cell suspension were also analyzed. We found 0.5 g of leaf explants induced callus was the optimal amount to obtain a 30 mL cell suspension culture. Cells grew better in MS liquid medium supplemented with 3% sucrose. The stem explants derived callus also grew better in full strength of MS liquid medium. In compare with various parts of plant and seeds, the embryonic-derived callus and suspension cells were sampled for polyphenolic analysis by HPLC. It was showed that fresh leaves contained (+)-catechin, (-)-epicatechin, (+)-gallocatechin, (-)-epigallocatechin, rutin and procyanidin-B-4, and stems and seeds contained (+)-catechin and (-)-epicatechin. All induced callus and suspension cells contained (+)-catechin and (+)-gallocatechin.

1 本研究為國科會補助計劃 (編號 NSC 89-2313-B-002-226)。

2 國立台灣大學森林系博士後研究。  
Post Doctoral Research Fellow, Department of Forestry, National Taiwan University.

3 國立台灣大學森林系教授，通訊作者。  
Professor, Department of Forestry, National Taiwan University. Corresponding Author.

4 國立台灣大學森林系碩士班研究生。  
Graduate Student, Department of Forestry, National Taiwan University.

We successfully transferred the suspension cell to 2L bioreactor.

【Key words】 *Cyclobalanopsis glauca*, Callus, Suspension cell culture, Bioreactor, Polyphenolic compound.

## I、前言

多酚性化合物因廣泛分布於植物中，如植物之未成熟果實、種子外，葉子及樹皮之含量也不少，且自古以來此類化合物即廣泛用於鞣皮、染料、收斂劑及醫藥品。目前已證實青剛櫟的新鮮葉含有九種多酚性化合物 (Sheu *et al.*, 1992)。

利用生物反應器進行細胞大量增殖、產生二次代謝物為目前之重要趨勢，故本研究擬以青剛櫟不同培植體誘導癒合組織，找出自癒合組織建立懸浮細胞培養的適當條件，並初步探討以生物反應器大量增殖之條件，以便日後利用生物反應器進行細胞大量增殖，從青剛櫟細胞株中萃取多酚性化合物。

植物體內所能合成的化合物主要分為一次代謝產物及二次代謝產物。一次代謝物為維繫植物體生長存活所不可或缺的化合物，如氨基酸、碳水化合物、核酸等；二次代謝物只在特殊的條件及環境下，由特殊遺傳基因所控制生成，只出現於植物體局部，無直接生理作用，諸如植物鹼、?類、色素等。由於植物體二次代謝產物含量極微，植物體本身生長速度慢，且二次代謝產物需在特殊的生長環境下才能誘導產生，不易大量取得，亦不容易以一般化學方法合成，故採用植物細胞培養技術是可行的量化生產方式。以植物細胞培養生產二次代謝產物，不僅可以不受地區、季節、氣候、土壤和病蟲害的影響，更可藉由細胞株的篩選改良，培養基的最適化和生物轉換反應的進行，來提高產率、降低生產成本 (陳禧瑩, 1998)。

Routier and Nickell (1956) 首先提出以植物細胞培養量化生產二次代謝產物的方法，而大規模植物細胞培養則開始於 1959 年 (Tulecke and Nickell, 1959; Tulecke, 1987)。1970 年代是以植物細胞培養技術生產二次代謝產物開始

蓬勃發展的年代，此時有許多學者致力於開發細胞培養方式，生產低焦油高尼古丁含量的煙草 (Kato *et al.*, 1972)。1980 年代以植物細胞生產二次代謝產物相關的研究成果，無論是培養技術、生理機制或大規模生產程序皆有卓越的進步，是為量化生產成功的例子。1983 年日本三井石化 (Mitsui Petrochemical) 公司以紫根 (*Lithospermum erythrorhizon*) 細胞培養，大量生產紫根素 (shikonin)，並由日本鐘紡公司將 shikonin 作為唇膏之天然色素。緊接著人蔘素 (ginsenosides) 及黃連素 (berberin) 也相繼達到商業化生產的規模 (Komamine *et al.*, 1991)。在美國則以 *Vanilla planifolia* 細胞培養生產香草精 (Vanilla flavor)，德國 Phyton 公司以 *Echinacea purpurea* 細胞生產免疫多醣體 (Payne *et al.*, 1991)，且皆已商業化生產成功，而最近這幾年熱門的抗癌藥物紫杉醇 (taxol) 商業化生產引起各界的關注 (Jaziri *et al.*, 1996)。近幾年來，組織培養技術結合生物反應器之應用已逐漸受到重視，利用生物反應器繁殖的主要目的是提供最適反應環境，使反應之產率提高 (Kargi and Roesenberg, 1987)。Atkinson and Mavituna (1991) 歸納它的特點為 (1) 能保持高細胞密度 ( $75 \times 10^6$  cell/ml) (2) 維持高的培養生長速率 (3) 細胞生長基質可重複使用 (4) 培養細胞具均質性 (5) 便利監控細胞生長過程 (6) 容易改變生長面積和轉換生長空間。

青剛櫟為本省固有之常綠闊葉樹，因其除具有淨化空氣、綠化、美化環境之功能外，且已分離出具有自由基驅除作用之多酚性化合物。目前經由各種管柱層析及純化，已自青剛櫟的新鮮葉分離出九種多酚性化合物如下：  
(+)-catechin(CA)、(-)-epicatechin(EC)、(+)-gallocatechin(GC)、(-)-epigallocatechin(EGC)、procyanidin-B-4(B4)、(+)-catechin 3-O- $\alpha$ -l-rhamno-pyranoside、rutin、quercetin、

isoqueurgranin (後兩者為新化合物), 由此可見青剛櫟所含的多酚性成分, 主要是以 flavan-3-ol 為基本架構之化合物 (Sheu *et al.*, 1992; 1997)。又因近年來, 在純化技術及分析方法上之精進, 使得有關多酚性之新化合物被分離出來, 同時其生物活性也深受矚目。據最近之研究報告指出, 多酚性化合物除了具有抗化學性肝障礙、抗病毒、降血壓、抗菌、消炎、抗突變、癌細胞之抑制作用外, 還有抗氧化等作用 (Ho *et al.*, 1992; Osakabe *et al.*, 1998)。因此本研究乃以醫療資源之開發, 活性成分之分離為目的, 採集分布於臺灣全島山麓之青剛櫟 (殼斗科) 的新鮮葉, 進行多酚性成分之探討。

多種酚類化合物具有抑制黃嘌呤氧化酵素的活性 (Chang *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1994), 並曾進一步測試對於僵直性脊髓炎病人全血中自由基之清除效果 (Sheu *et al.*, 1997)。

進行生物反應器前, 必須先建立青剛櫟的組織培養系統。殼斗科植物組織培養方面, 曾被採用的樹種有 *Quercus*、*Fagus*、*Aesculus*、*Carya illinoensis* 及 *Quercus suber* 等屬樹種, 培養的部位包括種子、未成熟胚、枝條、葉、葉肉原生質體及雄花序等, 研究成果包括癒合組織、體胚、二次體胚及再生植株之誘導 (Rodriguez *et al.*, 1994; Bárbara *et al.*, 1995; Capuana and Debergh, 1997; Gingas, 1991; Hermann and Kohlenbach, 1988; Jordan *et al.*, 1996; Jörgensen, 1988; Puddéphant *et al.*, 1997; Puigderrajols *et al.*, 1996; Rancillac *et al.*, 1991; Vieitez *et al.*, 1990; 1992; Yong, 1994), 但青剛櫟組織培養的報告則不多。

青剛櫟多酚性化合物之檢測、分析及純化方法仍未確立, 雖然已有學者證實青剛櫟中含有九個多酚性化合物, 但其以 HPLC 檢測、分析及純化方法則有待建立, 戴世傑 (2001) 針對這方面加以探討, 尤其是癒合組織或懸浮培養細胞中多酚性化合物之檢測、分析及純化方

法, 有助於青剛櫟多酚性化合物之分析研究。

## II、材料與方法

### (I)材料

自宜蘭縣太平山附近及陽明山採集青剛櫟種子, 民國八十八年十月上及中旬所採集的種子為未成熟種子, 八十八年十月下旬種子開始掉落, 採集到成熟種子。將未成熟胚入含有各種植物生長調節劑之 MS 培養基中誘導癒合組織, 並將成熟種子無菌播種, 待長成無菌苗後, 取無菌苗葉片及莖進行癒合組織誘導。誘導所得較疏鬆之癒合組織為供細胞培養之材料, 共有三個較佳的青剛櫟細胞系, 分別是由宜蘭縣太平山採集青剛櫟未成熟胚所誘導形成之癒合組織 (材料 A)、由陽明山採集之青剛櫟熟種子建立無菌苗之葉片及莖所誘導形成之癒合組織 (材料 B 及材料 C)。

### (II)方法

- 癒合組織材料誘導與繼代培養: 材料 A 每個月繼代於添加 1 ppm NAA (Naphthalene acetic acid)、0.7% Bacto agar 及 3% Sucrose 之新鮮固態 MS (Murashig and Skoog, 1962) 培養基 (所有培養基均於配製好後, pH 調整為  $5.7 \pm 0.1$ , 分裝於培養器皿以鋁箔封好, 於滅菌釜  $120^{\circ}\text{C}$ , 壓力  $1.2 \text{ kg/cm}^2$  下滅菌 10~15 分鐘), 培養於  $25^{\circ}\text{C}$  黑暗環境。材料 B 每個月繼代於添加 0.5 ppm NAA 與 0.5 ppm TDZ (Thidiazuron)、0.7% Bacto agar 及 3% Sucrose 之新鮮固態 MS 培養基; 材料 C 則每個月繼代於添加 1 ppm 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)、0.7% Bacto agar 及 3% Sucrose 之新鮮固態 MS 培養基, 培養於  $25^{\circ}\text{C}$  黑暗或光照強度  $27 \text{ (E/m}^2 \text{ s)}$  及 16 hr 光周期環境培養。
- 細胞懸浮培養之建立: 分別取 0.25、0.5 及 1.0 g 無菌苗之葉片所衍生成之癒合組織壓碎接種於盛有 30 mL 液態 MS 培養基添加

- 0.5 ppm NAA 與 0.5 ppm TDZ 及 3% Sucrose 之有側管 125 mL 三角瓶，於 FIRSTEK SCIENTIFIC Orbital shaker Model S102 以轉速 120 rpm 振盪培養，每二日將三角瓶懸浮細胞培養搖均勻後倒入三角瓶側管，靜置 1 小時測定 SCV (Sedimented cell volume)。
- 選擇較佳的接種量進行另兩種材料之懸浮細胞。分別測試 1/2 及 1/4 MS 基礎培養基、1%、3% 及 5% Sucrose 對細胞生長之影響。將 B 材料懸浮細胞培養逐漸放大至 50 mL 及 150 mL 培養。上述三種細胞懸浮培養每兩週繼代一次，繼代時懸浮細胞以 30 mesh 不銹鋼篩網過濾去除較大的細胞團，並接種約 1/5 至新的培養基繼續培養，剩下的可作形態觀察，或收集冷凍作多酚性化合物之分析。
3. 懸浮培養細胞之形態觀察：取方法 2 之材料，置於 Leitz Wild M3Z 解剖顯微鏡觀察形態並照相。另滴於載玻片，蓋上蓋玻片置於 Leitz Aristoplan 光學顯微鏡觀察細胞形態並照相記錄。
4. 多酚性化合物之檢測：為取青剛櫟新鮮葉片、枝條及堅果（預先秤其重量），以 80% 丙酮溶液覆蓋浸泡 48 小時，過濾，將濾液於 40°C 下減壓濃縮，所得之濃縮液加入適量二氯甲烷，振搖 5 分鐘，以 2500 g 之離心力離心 5 分鐘，移除二氯甲烷層，重複以二氯甲烷洗三次，收集萃取產物待測。分別精秤 3~5 g 青剛櫟癒合組織及懸浮培養細胞，於研鉢中磨碎後移至三角錐瓶中，加入適量 80% 丙酮溶液，振搖 50 分鐘，過濾。重複萃取三次，收集所得濾液，將濾液於 40°C 下減壓濃縮，所得之濃縮液如前述以適量二氯甲烷洗三次，收集萃取產物待測。以高效液相層析儀 (HPLC, High performance liquid chromatography) 分析材料中 (+)-catechin(CA)、(-)-epicatechin(EC)、(+)-gallocatechin(GC)、(-)-epigallo-catechin(EGC)、rutin、procyanidin-B-4(B4) 及 gallic acid 含量 (戴世傑, 2001)。

5. 生物反應器初步培養試驗：首先將青剛櫟材料 B 懸浮培養細胞 20 mL，移至盛有 130 mL 之 250 mL 小型生物反應器中，置於 FIRSTEK SCIENTIFIC Orbital shaker Model S102 以轉速 120 rpm 振盪培養，以 LTH DPD23 pH 電極及 ABLE DO INDICATOR MODEL M-1032 DO 監測記錄其 pH 值及 DO 值變化，並記錄細胞增生 SCV 之資料。將放大培養至 150 mL 之材料 B 懸浮培養細胞 100 mL，接種至盛有 1100 mL 液態培養基之 2L 生物反應器 (BELLCO, spinner flask, USA) 中，注入以 0.22 $\mu$ m 濾膜過濾之無菌空氣 (EYELA aeration unit MAU-1, TOKYO RIKAKIKAI CO., L.T.D., air pressure 0.1 kg/cm<sup>2</sup>, air flow 0.4646 NL/min) 及以具有三葉片之磁石攪拌 (Stuart Scientific magnetic stirrer SM11, UK.) 培養，攪拌速度開始用 50 rev/min，至培養體積不再增加時調整為 70 rev/min。以 LTH DPD23 pH 電極及 ABLE DO INDICATOR MODEL M-1032 DO 監測記錄其 pH 值及 DO 值變化，並記錄 SCV 之變化。

### III、結果

#### (I) 癒合組織材料之繼代

青剛櫟未成熟胚、無菌苗之葉片及莖所衍生成之癒合組織均可一直繼代培養增生，但有少部分繼代後形成白色濕軟癒合組織，則無法再繼代培養，其繼代時不會繼續增殖且漸漸褐化，故繼代時避免挑選這樣的癒合組織。未成熟胚誘導的癒合組織，繼代時仍可見到一些體胚形成。

#### (II) 懸浮細胞培養之建立及繼代

青剛櫟無菌苗之葉片所衍生成之癒合組織經移至液態培養基進行懸浮培養時，以接種量 0.5 g 癒合組織效果較佳 (圖 1)。分別於培養基中添加 1~5% Sucrose 時，3% Sucrose 培

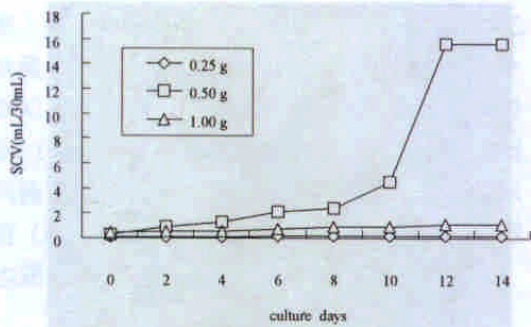


圖 1 青剛櫟無菌苗葉片衍生癒合組織接種量對細胞懸浮培養之生長速率

Fig.1 The influence of inoculate size in aseptic seeding leaf-derived callus of *Cyclobalanopsis glauca* on growth rate of cell suspension culture

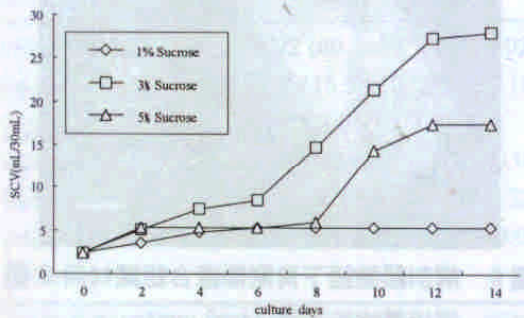


圖 2 蔗糖濃度對青剛櫟無菌苗葉片衍生癒合組織之細胞培養生長影響

Fig.2 The effect of sucrose concentration on initial growth rate in cell suspension of *Cyclobalanopsis glauca*

養的效果較佳(圖 2)。將培養液體積增加為 50 mL (盛於 250 mL 三角瓶) 進行培養, 3% Sucrose 的培養效果仍比 5% Sucrose 好(圖 3)。以不同濃度的 MS 基礎培養基培養, 結果顯示全量 MS (1 MS) 及半量 MS (1/2 MS) 均優於 1/4 量(圖 4)。無菌苗之莖所衍生癒合組織方面, 全量 MS 的培養則比 1/4 MS 及 1/2 MS 效果為佳(圖 5)。未成熟胚培植體衍生癒合組織之細胞懸浮培養生長極緩慢, 故無法擴大增殖。懸浮細胞材料 B 及 C 均每兩星期繼代一次, 至今仍穩定增殖, 未有退化現象。材料 C

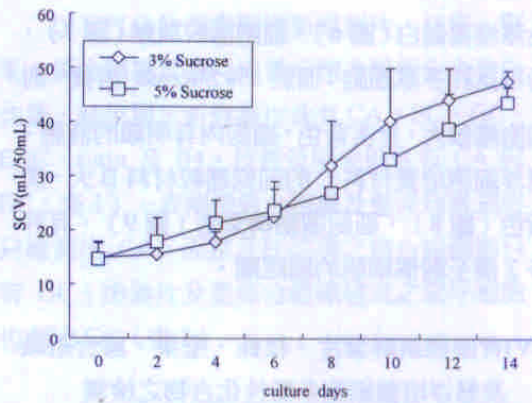


圖 3 蔗糖濃度對青剛櫟細胞懸浮培養繼代(50 mL)生長率之影響

Fig.3 The effect of sucrose concentration on growth rate in subculture suspension cells of *Cyclobalanopsis glauca*

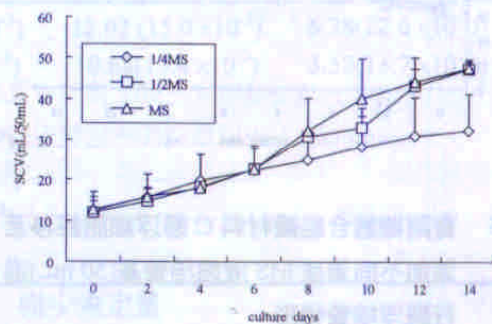


圖 4 基礎培養基本培養基?類濃度對青剛櫟懸浮細胞培養生長之影響

Fig.4 The effect of salt concentration on growth rate in subculture suspension cells of *Cyclobalanopsis glauca*

則每 4~6 週繼代一次。將材料 B 之懸浮細胞培養放大至盛有 150 mL 培養液之 500 mL 三角瓶中培養, 經培養二週後測定其 SCV, 結果顯示培養細胞體積由 20 mL 增加為 99 mL ( $\pm 13.5$  mL)。

### (III) 懸浮培養細胞之形態觀察

三種不同培植體逆分化後建立細胞系生長比較, A 懸浮培養細胞生長極緩慢, 細胞團較緊密, 亦較小。材料 B 懸浮培養細胞較大,

色澤淺褐偏白(圖6),細胞團較疏鬆(圖7),仍可見許多單細胞;而於5% Sucrose 培養,則細胞團較大,呈淡黃色,細胞內有明顯的液胞。懸浮細胞培養材料C的細胞團較材料B大,淡黃色(圖8),細胞團結構緊密(圖9),有許多2個至數個細胞的細胞團。

(IV)青剛櫟新鮮葉片、枝條、堅果、癒合組織及懸浮培養細胞多酚性化合物之檢測

以 HPLC 檢測青剛櫟新鮮葉片、枝條、堅

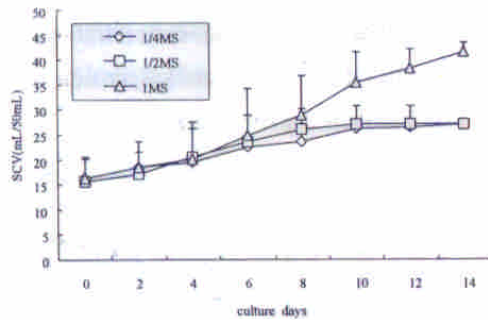


圖5 青剛櫟癒合組織材料C懸浮細胞經移至添加不同濃度MS液態培養基(50 mL)進行懸浮培養情形

Fig.5 Suspension cells of *Cyclobalanopsis glauca* callus type C were inoculated to 50 mL of different concentration MS liquid medium for suspension culture

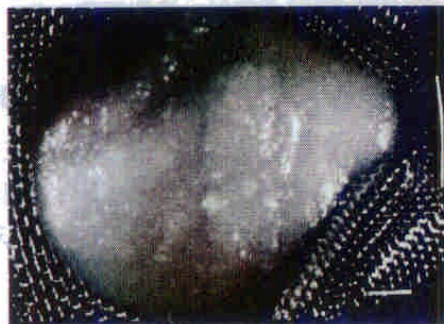


圖6 解剖顯微鏡下青剛櫟癒合組織材料B懸浮培養細胞形態(bar=2 mm)

Fig.6 Suspension culture cells of *Cyclobalanopsis glauca* callus type B under dissection microscope

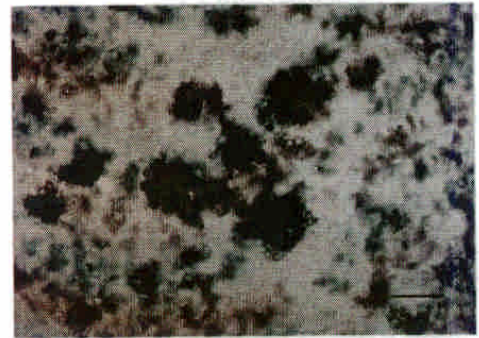


圖7 光學顯微鏡下青剛櫟癒合組織材料B懸浮培養細胞形態(bar=0.5 mm)

Fig.7 Suspension culture cells of *Cyclobalanopsis glauca* callus type B under light microscope



圖8 解剖顯微鏡下青剛櫟癒合組織材料C懸浮培養細胞形態(bar=2 mm)

Fig.8 Suspension culture cells of *Cyclobalanopsis glauca* callus type C under dissection microscope

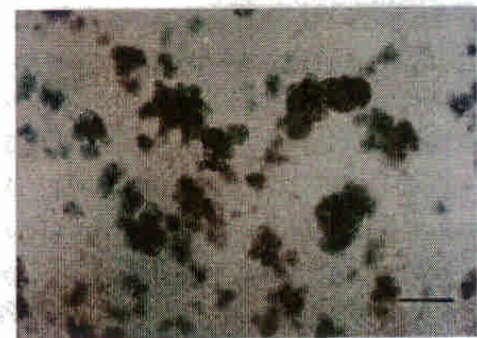


圖9 光學顯微鏡下青剛櫟癒合組織材料C懸浮培養細胞形態(bar=0.5 mm)

Fig.9 Suspension culture cells of *Cyclobalanopsis glauca* callus type C under light microscope

果、癒合組織及懸浮培養細胞多酚性化合物之含量，結果顯示新鮮葉片含有 CA、EC、GC、EGC、rutin 及 B4，枝條及堅果則含有 CA 與 EC (表 1)，青剛櫟癒合組織及懸浮培養細胞只檢測出 CA，而莖及胚誘導之癒合組織則只有 GC，由葉片及莖癒合組織建立之懸浮細胞也測出 GC (表 2)。

以 HPLC 檢測青剛櫟新鮮葉片、枝條、堅果、癒合組織及懸浮培養細胞多酚性化合物之含量，結果顯示新鮮葉片含有 CA、EC、GC、EGC、rutin 及 B4，枝條及堅果則含有 CA 與 EC (表 1)，青剛櫟癒合組織及懸浮培養細胞只檢測出 CA，而莖及胚誘導之癒合組織則只有 GC，由葉片及莖癒合組織建立之懸浮細胞也測出 GC (表 2)。

(IV) 青剛櫟新鮮葉片、枝條、堅果、癒合組織及懸浮培養細胞多酚性化合物之檢測

表 1 不同枝條部位與種子多酚性化合物成分分析 (mg (%)) (引用自戴世傑, 2001)

Table 1 The compounds of polyphenolic compounds in various vegetative parts and seeds of fresh *Cyclobalanopsis glauca*

成分	檢體(g) 葉片 a (3.16) leaf a	葉片 b (1.40) leaf b	枝條 a (80.05) shoot a	種子 a (30.02) seed a
(+)-catechin	1.92 (60.7x10 <sup>-3</sup> )	1.02 (72.6 x10 <sup>-3</sup> )	12.02 (15.0 x10 <sup>-3</sup> )	6.78(22.6 x10 <sup>-3</sup> )
(-)-epicatechin	0.49(15.5 x10 <sup>-3</sup> )	0.18(12.6 x10 <sup>-3</sup> )	10.68(13.4 x10 <sup>-3</sup> )	3.52(11.7 x10 <sup>-3</sup> )
(+)-gallocatechin	0.25(8.0 x10 <sup>-3</sup> )	+	-	-
(-)-epigallocatechin	0.1(3.2 x10 <sup>-3</sup> )	0.03(2.2 x10 <sup>-3</sup> )	+	-
Rutin	0.92(29.2 x10 <sup>-3</sup> )	0.22(15.7 x10 <sup>-3</sup> )	-	-
procyanidin B-4	0.1(3.1 x10 <sup>-3</sup> )	0.07(4.6 x10 <sup>-3</sup> )	-	-
gallic acid	-	-	+	+

a 採自北醫校園； b 採自台大盆栽； - 未檢出； + 極少未定量  
a and b represent the samples collected from TMS and NTU campus respectively

表 2 青剛櫟不同培植體衍生之癒合組織及懸浮培養細胞其多酚性化合物分析 (含量 μg (%)) (引用自戴世傑資料, 2001)

Table 2 The compounds in polyphenolic compounds of callus and suspension cells of *Cyclobalanopsis glauca*

成分	檢體(g) 葉片誘導 癒合組織 (4.48) leaf-derived callus	葉片 懸浮細胞 (4.11) leaf-derived sus- pension callus	莖誘導 癒合組織 (2.13) shoot-derived callus	莖懸浮細胞 (5.13) shoot-derived suspension callus	胚誘導 癒合組織 (1.03) embryo-derived callus
(+)-catechin	10.53 (0.2x10 <sup>-3</sup> )	102.1 (2.5 x10 <sup>-3</sup> )	16.8 (0.8 x10 <sup>-3</sup> )	47.4 (0.9x10 <sup>-3</sup> )	3.5 (0.3 x10 <sup>-3</sup> )
(-)-epicatechin	-	-	-	-	-
(+)-gallocatechin	-	22.4 (0.5 x10 <sup>-3</sup> )	4.7 (0.2 x10 <sup>-3</sup> )	15.4 (0.3 x10 <sup>-3</sup> )	8 (0.2 x10 <sup>-3</sup> )
(-)-epigallocatechin	-	-	+	-	-
rutin	+	-	-	-	-
procyanidin B-4	-	-	-	-	-
gallic acid	-	+	-	+	+

- 未檢出； + 極少未定量

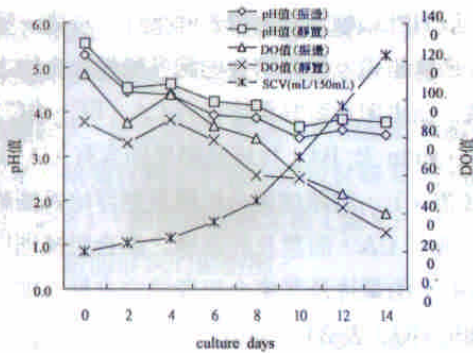


圖 10 青剛櫟細胞懸浮培養移於有 150 mL 之 250 mL 小型生物反應器其 pH 值、溶氧及生長量變化特性

Fig.10 The pH, OD value and growth rate changes in cell suspension culture of *Cyclobalanopsis glauca* under 250 mL bioreactor with 150 mL solution stirring and stationary conditions

(V)生物反應器初步培養試驗

將青剛櫟材料 B 懸浮培養細胞，移至盛有 150 mL 之 250 mL 小型生物反應器中進行培養，結果顯示 pH 值及 DO 值均隨細胞體積及培養時間增加而降低（圖 10）。培養於 2L 生物反應器亦有同樣的情形，培養三天後增加打氣，pH 值及 DO 值出現明顯增加現象，但隨即又隨細胞體積及培養時間增加而降低（圖 11）。由於剛開始打氣是將空氣直接打入培養液中，使得氣泡自液面逸出，易把細胞推到 pH、DO 電極棒壁、打氣管壁及生物反應器內壁上，造成細胞堆積，這些細胞將因無法接觸到培養液而逐漸褐化，故於培養 12 天後將打氣管抽離培養液於液面繼續打氣，此時可見 DO 值明顯下降（圖 11），但培養細胞並未褐化，仍繼續增殖。培養至 27 天細胞體積不再增加，將攪速度增加為 70 rev/min，則可見細胞體積仍有再增加現象（圖 11）。

IV、討論

建立細胞懸浮培養時，接種的癒合組織量

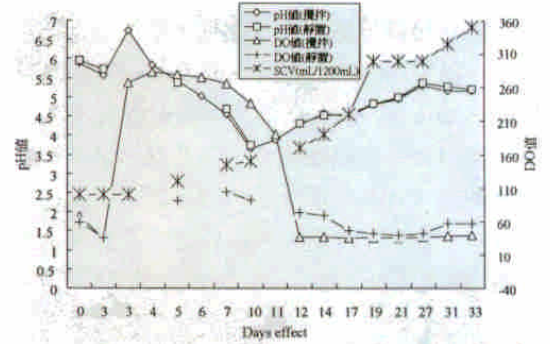


圖 11 青剛櫟細胞懸浮培養於 2 L 生物反應器攪拌寂靜置條件下其 pH 值、溶氧及生長變化特性

Fig.11 The pH, OD value and growth rate changes in cell suspension culture of *Cyclobalanopsis glauca* under 2L bioreactor with stirring and stationary conditions

會影響細胞生長。一般接種量太低時，細胞生長停滯期增長，最終細胞濃度亦較低。主要是由於接種量低造成細胞對環境調節能力變差，細胞間訊息傳遞減弱，此種現象稱為稀釋效應（dilution effect）（Ozeki and Komamine, 1985）。本研究於建立青剛櫟葉衍生癒合組織之懸浮培養時亦發現有類似現象，以接種 0.5 g 癒合組織效果較佳，較低或較高之接種量則生長不良。碳源方面，一般使用 1~8%，培養基中碳源種類及濃度對細胞生長及二次代謝物生產均有明顯的影響，碳源濃度過高，使培養基滲透壓增高而抑制細胞生長（Kimball et al., 1975; Rokem and Goldberg, 1985）；本研究亦顯示適當之 sucrose 濃度為 3%。

植物細胞於液態培養基之增殖速率比微生物慢，菸草是植物細胞中增殖較快者，倍增時間為 18 小時（Noguchi and Sankawa, 1982）。本研究之青剛櫟懸浮細胞增殖速率 30 mL 者可於 2 週增加 11 倍，50 mL 者增加 3.5 倍，150 mL 則增加 5~6 倍，而 1200 mL 者於四週增加 3.5 倍。

以 HPLC 檢測青剛櫟新鮮葉片、枝條、堅果、癒合組織及懸浮培養細胞中多酚性化合物



含量，初步證實癒合組織及懸浮培養細胞確實含有多酚性化合物，由於試驗期間分析方法仍在改進當中，未能檢測出已知的九種多酚性化合物。但檢測的幾種多酚性化合物中，癒合組織及懸浮培養細胞均含有 CA，葉及莖癒合組織所建立的懸浮培養細胞則含有 GC，懸浮培養細胞所含的多酚性化合物均較原來的癒合組織高。如何能增加懸浮培養細胞中多酚性化合物含量，將是日後努力的重點，多酚性化合物分析方法及懸浮培養細胞中多酚性化合物之萃取純化亦有待確立。

## V、謝誌

本研究之經費由行政院國家科學委員會補助 (NSC89-2313-B-002-226)，特此致謝。試驗期間，試驗材料多酚性化合物之分析，均由台北醫學大學藥學系許秀蘊教授與碩士班研究生戴世傑先生協助，特致謝忱。

## VI、引用文獻

陳禧瑩 (1994) 以 *Stizolobium hassjoo* 細胞培養生產二次代謝產物 L-DOPA 之最佳培養條件及生物反應器探討。國立臺灣大學化學工程研究所碩士論文。106 頁。

陳禧瑩 (1998) 以植物細胞培養生產二次代謝產物 L-DOPA 之培養條件及生物反應器操作策略探討。國立臺灣大學化學工程研究所博士論文。201 頁。

戴世傑 (2001) 青剛櫟之細胞培養株中多酚性成分分析方法的探討。台北醫學大學藥學研究所碩士論文。

Atkinson, B. and F. Mavituna (1991) *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook Second Edition*, Stockton Press, New York.

Bärbara F. G., C. Celestino and M. Toribio (1995) Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in

somatic embryos from leaves of *Quercus suber*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41:99-106.

Capuana, M. and P. C. Debergh (1997) Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48:23-29.

Chang, W. S., Y. J. Lee and H. C. Chiang (1993) Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* 13:2165-2170.

Chang, W. S., Y. H. Chang, F. J. Lu and H.C. Chiang (1994) Inhibitory effects of phenolic on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* 14:501-506.

Gingas, V. M. and R. D. Lineberger (1991) Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*. *HortScience* 26(9):1217-1218.

Hermann, L. and H. W. Kohlenbach (1988) Callus formation from mesophyll protoplasts of *Fagus sylvatica* L. *Plant Cell Reports* 7:485-488.

Ho, C. T., Q. Chen, H. Shi, K. Q. Zhang and R. T. Rosen (1992) Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Prev. Med.* 21(4):520-525.

Jørgensen, J. (1988) Embryogenesis in *Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*. *J. Plant Physiol.* 132:638-640.

Jaziri, M., A. Zhiri, Y. W. Guo, J. P. Dupont, K. Shimomura, H. Hamada, M. Vanhaelen and J. Homes (1996) *Taxus* sp. Cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: A literature survey. *Plant Cell Tiss. Org. cult.* 46:59-75.

Jordan, M., J. Velozo and A.M. Sabja (1996) Organogenesis *in vitro* of *Nothofagus alpina* (P.et E) Oerst. Fagaceae. *Plant Cell Reports* 15:795-798.

- Kargi, F. and M. Roesenberg (1987) Plant cell bioreactors: Present status and future trends. *Biotechnology Progress*. 3(1):1-6.
- Kato, K., Y. Shiozawa, A. Yamada, K. Nishida and M. Noguchi (1972) A jar fermenter culture of *Nicotiana tabacum* L. cell suspensions. *Agric. Biol. Chem.* 36:899-902.
- Kimball, S. L., W. D. Beversdorf and E. T. Bingham (1975) Influence of osmotic potential on the growth and development of soybean tissue cultures. *Crop Sci.* 15(6):750-752.
- Komamine, A., M. Misawa and F. DiCosmo (1991) *Plant Cell Culture in Japan*, CMC Co., Ltd., pp.39-44, 72-78.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Noguchi, H. and U. Sankawa (1982) Formation of germichryson by tissue cultures of *Cassia torosa*: induction of secondary metabolism in the lag phase. *Phytochemistry* 21(2):319-323.
- Osakabe, N., M. Yamagishi, C. Sanbongi, M. Natsume, T. Takizawa and T. Osawa (1998) The antioxidative substances in cacao liquor. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 44(2):313-21.
- Ozeki, Y. and A. Komamine (1985) Effects of inoculum density, zeatin and sucrose on anthocyanin accumulation in a carrot suspension culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 5 (1):45-53.
- Payne, F. G., V. Bringi, C. L. Prince and M. L. Shuler (1991) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid System*, Hanser Publisher, Munich Vienna, New York, pp.3-9.
- Puddephat, I. J., P. G. Alderson and N. A. Wright (1997) Influence of explant source, plant growth regulators and culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. in vitro. *Journal of Experimental Botany* 309:951-962.
- Puigderrajols, P., B. Fernandez-Guijarro, M. Toribio and M. Molinas (1996) Original and early development of secondary embryos in *Quercus suber* L. *Int. J. Plant Sci.* 157(6):674-684.
- Rancillac, M., A. Klinguer and S. Klinguer (1991) Plant biotechnologies applied to a forest tree, the American red oak (*Quercus rubra* L.). *Acta Horticulturae* 289:341-342.
- Reinert, J. (1959) Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta* 53:318-333.
- Rodriguez, A. P. M. and H. Y. Wetzstein (1994) The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. *Plant Cell Reports* 13:607-611.
- Rokem, J. S. and I. Goldberg (1985) Secondary metabolites from plant cell suspension cultures: methods for yield improvement. *Adv. Biotechnol. Processes*. 4:241-274.
- Routier, J. B. and L. G. Nickell (1956) Cultivation of plant tissue culture. U.S. Pat. 2 747 334.
- Sheu, S. Y., F. L. Hsu and Y. C. Lin (1992) Two gallates from *Quercus glauca*. *Phytochemistry* 31:2465-2468.
- Sheu, S. Y., Y. H. Tsuang, F. L. Hsu, F. J. Lu and H. C. Chiang (1997) Superoxide anion scavenge effect of *Quercus glauca* Thunb. in whole blood of patients with ankylosing spondylitis. *Am. J. Chin. Med.* 25(3-4):307-315.
- Tulecke, W. (1987) Somatic embryogenesis in woody perennials. *Cell and Tissue Culture in Forestry* 2:62-91.

Tulecke, W. and L. G. Nickell (1959) Production of large amounts of plant tissue by submerged culture. Science (Washington, D.C.), 130, 863-864.

Vennat, B., A. Pourrat, H. Pourrat, D. Gross, P. Bastide and J. Bastide (1988) Procyanidins from the roots of *Fragaria vesca*: Characterization and pharmacological approach. Chem Pharm Bull (Tokyo) 36(2):828-833.

Vieitez F. J., M. C. San-Jose, A. Ballester and A. M. Vieitez (1990) Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos in chestnut. J. Plant Physiol. 136:253-256.

Vieitez F. J., B. Antonio and M. V. Ana (1992) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of *Fagus sylvatica* L. Plant Cell Reports 11:609-613.

Yong, W. K., B. C. Lee, S. K. Lee, and S. S. Jang (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Quercus acutissima* Plant Cell Reports 13:315-318.

## PRIMARY MEASUREMENT ON INTERCEPTION OF RAINFALL IN *MACHILUS ZUIHOENSIS* WOODS

Chi Tang<sup>1</sup>, Fan-Chieh Yu<sup>2</sup>, San-Hsiung Hsu<sup>2</sup>, Chin-Yu Lo<sup>1</sup>

(Received August 15, 2001, Accepted April 3, 2002)

**[Abstract]** This study focuses on the canopy interception ( $I_c$ ) of *Machilus zuihoensis* woods. Measurements for stemflow (SF), throughfall (TF) and gross rainfall (GR) were conducted during the study period from May to October, 1993 in experimental watershed in National Tsinghua University of Science and Technology. The results showed that canopy depth of the stand could be negatively correlated with canopy openness and they could be used as an indicator of canopy interception. Because an inverse relationship between gross rainfall and the ratio of interception to canopy depth ( $I_c/D$ ) indicated that maximum  $I_c/D$  ratio would reach a value of 0.2 across. Regression relationship between  $I_c/D$  and gross rainfall also showed a non-linear curve and implied the canopy interception would have a limited value as the gross rainfall increased. The maximum value of  $I_c$  ratio across the canopy depth might indicate maximum canopy interception of the studied woods is 17.4mm.

**[Key words]** interception, rainfall, *Machilus zuihoensis*

### 1. 前言

雨水透過森林的表層面積，直接落到林下

面時，會有部分被森林冠層或林內樹冠層攔截，其量稱為冠層攔截量 (Interception)。冠層攔截量與森林冠層結構、冠層葉面積及冠層葉面積之總量等，均有密切的關係。

<sup>1</sup> 國立清華大學林學系，新竹市，300

<sup>2</sup> Institute, Department of Soil and Water Conservation, National Tsinghua University of Science and Technology, Hsinchu, 300, Taiwan, Republic of China

通訊作者：E-mail: ctyang@twins.com.tw

<sup>1</sup> Institute, Department of Soil and Water Conservation, National Tsing Hua University, Taichung, 400, Taiwan

<sup>2</sup> Institute, Department of Soil and Water Conservation

<sup>2</sup> Institute, Department of Soil and Water Conservation, National Tsinghua University of Science and Technology, Hsinchu, 300, Taiwan