

茶愈伤组织培养及其茶氨酸的累积

钟俊辉 陶文沂

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 对不同的培养条件下茶愈伤组织生长及其茶氨酸累积情况进行了研究。结果表明, 激素 IAA 和 6-BA 结合作用时, 存在着相互效应, 其中以 IAA 2 mg/L 和 6-BA 4 mg/L 时对茶氨酸累积最有利。不同碳源对于愈伤组织生长和茶氨酸累积的影响相近。增加糖浓度有利于次生代谢物的累积, 茶氨酸组织的最适培养温度和茶氨酸累积温度都是 25℃。暗培养比有光培养更有利于茶氨酸的累积。茶氨酸的累积曲线与愈伤组织生长密切相关, 调节培养基成分使茶氨酸在茶愈伤组织(干质量)中的含量达到了 201.6 mg/g。

关键词 愈伤组织; 茶氨酸; 培养; 茶

中图分类号 Q946.2

0 前 言

茶氨酸(theanine, γ -glutamylethylamide)属酰胺类化合物。化学学科中命名为 N-乙基-L-谷氨酰胺(N-ethyl- γ -L-glutamine)。茶氨酸主要存在于山茶科(theacea)植物中, 在茶(*Camellia sinensis*)中含量最高, 占干茶称重的 1%~2%, 占氨基酸总量的 50% 以上。一般学者认为它是茶叶的一种特征氨基酸。它与绿茶的品质相关, 相关系数达到 0.787~0.876^[1,2]。茶氨酸水溶液呈微酸性, 具有焦糖香和类似味精的鲜爽味。日本已经将其列为食品添加剂。另据 Tsunoda T. 等报道, 茶氨酸用量为 1 740 mg/kg 时, 可显著抑制咖啡碱引起的神经系统的兴奋。此外, 咖啡碱缩短由环己巴比妥导致的睡眠时间, 而茶氨酸可抵消咖啡碱的这种作用。因此, 口服和腹腔注射茶氨酸可以拮抗咖啡碱对中枢神经系统的刺激^[3~5]。众所周知, 离体培养的高等植物细胞具有合成天然产物的能力, 利用这一特性, 不仅可以在稳定的环境条件下, 采用植物培养细胞研究其生化机制, 而且可以通过大量细胞培养生产植物的次生代谢产物。本文中较系统地研究了激素、不同碳源、蔗糖浓度、外界培养条件、外加前体等因素对茶树愈伤组织生长和茶氨酸累积的影响, 以及茶树愈伤组织生长和茶氨酸累积的动态变化。

1 材料和方法

1.1 实验材料的建立与培养

愈伤组织诱导与继代培养均采用 MS 基本培养基。外植体材料为龙井茶的春梢嫩叶,经表面消毒后培养于固体培养基上诱导愈伤组织,每隔一个月继代培养一次。

1.2 培养方法与试验点设置

- 1) 在 MS 培养基上, 吡啶乙酸(IAA)、6-BA 和 pH 值, 采用三因素、三水平的响应面系实验, 共设置了 15 个试验点。
- 2) 在 MS 培养基上, 据不同碳源对茶愈伤组织培养和茶氨酸积累的影响, 设置了葡萄糖、蔗糖、乳糖的影响。
- 3) 在 MS 培养基上设置 4 个不同蔗糖浓度对茶愈伤组织培养和茶氨酸积累的影响。
- 4) 考察了外界条件如温度、光照等对茶愈伤组织培养和茶氨酸积累的影响。
- 5) 外加前体盐酸乙胺对茶愈伤组织培养和茶氨酸积累的影响。
- 6) 根据以上结果, 采用改良培养基进行继代培养, 测定愈伤组织在培养基上鲜重的增长与茶氨酸累积的动态变化。

1.3 茶氨酸总量的测定

茶氨酸的测定采用滴定法^[6]。茶氨酸提取: 称取 2 g 鲜重愈伤组织, 研磨后用 20 ml 100℃热水提取 30 min, 过滤后加 5% 的中性醋酸铅处理, 过滤, 减压浓缩至干, 用甲酸和冰醋酸溶解, 加结晶紫, 用高氯酸滴定。每毫升 0.1 mol/L 高氯酸相当于茶氨酸 17.42 mg。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导与培养

茶树春梢嫩叶经琼脂培养基培养后, 随培养基激素组成的不同, 分别在 10~20 d 内从切口处逐渐形成愈伤组织, 并呈现白色、乳黄色、浅绿色、深绿色等几种色泽。愈伤组织初期长得较慢, 组织较为坚实, 需经过好几代培养后才逐渐疏松, 生长速度加快。而且不同品种来源的愈伤组织, 其生长状态和茶氨酸的积累能力大不相同, 反映了由不同基因型导致的培养材料生理生化上的差异。研究表明, 在很大范围内的激素组合都诱导产生愈伤组织, 但激素浓度太高易使外植体上直接生根。

2.2 激素浓度组合、pH 值对茶愈伤组织生长及茶氨酸积累影响的响应面分析

2.2.1 实验设计 作者采用响应面分析方法对影响茶愈伤组织生长及茶氨酸积累的激素浓度、pH 值进行优化。以 6-BA, IAA, pH 三个因素为自变量, 以生长速率与茶氨酸含量为响应值, 设计了三因素三水平的实验。见表 1。

根据 Box 中心组合设计原理, 设计了三因素三水平的响应面分析实验。共有 15 个实验点, 其中 12 个为析因子, 3 个为零点。零点实验进行 3 次, 以估计误差。用生长速率及茶氨酸含量为响应值。

表 1 三因素三水平实验设计

因 素	编 码	因素取值	水 平
6-BA (mg/L)	X_1	+ 1	6
		0	4
		- 1	2
IAA (mg/L)	X_2	+ 1	3
		0	2
		- 1	1
pH	X_3	+ 1	6.2
		0	5.8
		- 1	5.4

实验以随机次序进行, 重复两次, 实验获得的生长速率和茶氨酸含量的平均值用 SAS RSREG (Response Surface Regression) 程序进行分析^[8], 并由此得出响应面分析图和方差分析表。

2.2.2 实验分析 根据表 1 中对实验因素与水平的设计, 采用不同的 6-BA, IAA 浓度和 pH 值进行 15 次实验。每次实验得到的茶氨酸含量和生长速率见表 2。

采用回归方程:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3$$

表 2 响应面分析实验结果

编号	X_1	X_2	X_3	茶氨酸(mg/g)	生长速率(/d)
1	- 1	- 1	0	182. 7	0. 063 2
2	- 1	0	- 1	180. 8	0. 062 8
3	- 1	0	+ 1	152. 5	0. 063 9
4	- 1	+ 1	0	133. 2	0. 023 9
5	0	- 1	- 1	233. 8	0. 060 3
6	0	- 1	+ 1	189. 4	0. 064 8
7	0	+ 1	- 1	205. 2	0. 028 6
8	0	+ 1	+ 1	194. 6	0. 031 9
9	+ 1	- 1	0	173. 1	0. 052 2
10	+ 1	0	- 1	184. 6	0. 040 8
11	+ 1	0	+ 1	176. 1	0. 044 2
12	+ 1	+ 1	0	143. 5	0. 028 4
13	0	0	0	228. 0	0. 071 7
14	0	0	0	211. 1	0. 069 8
15	0	0	0	232. 3	0. 070 9

由表 2 数据, 在用 SAS RSREG 程序计算出回归方程中各系数(见表 3) 的基础上, 对茶氨酸含量和生长速率两回归模型进行数学分析, 结果见表 4。

表 3 回归系数取值

系数	茶氨酸取值	生长速率取值
a_0	223. 13	0. 070 8
a_1	3. 51	- 6. 024E-03
a_2	- 12. 81	- 0. 015 837
a_3	- 11. 47	0. 001 412
a_{11}	- 48. 63	- 0. 011 3
a_{22}	- 16. 37	- 0. 017 57
a_{33}	- 1. 00	- 6. 5749E-03
a_{12}	4. 97	3. 8741E-03
a_{13}	4. 95	5. 749E-04
a_{23}	8. 45	- 5. 501E-04

表 4 回归模型的数学分析

响应值变量	6-BA (mg/L)	IAA (mg/L)	pH	计算值	点的类型
茶氨酸	4. 20	2. 06	5. 83	228. 37	最大值
生长速率	4. 01	1. 98	6. 01	0. 070 5	最大值

对回归模型的进一步分析和计算发现: 1) 两模型的 F 值均大于 $f_{0.01}(9, 5)$. 线性相关系数分别达到了 0. 982 和 0. 969(见表 5), 由此说明方程的应变变量与全体自变量之间线性关系明显。2) 由于两个方程失拟项很小(见表 6), 因此可以用回归模型对试验结果进行分析和预测(结果见表 4)。同样从表 6 可以看出, 茶氨酸方程的一次项影响茶氨酸累积显著, 生长速率方程的一次项、二次项对生长速率的影响很显著, 说明各个具体试验因子对响应值影响不是简单的线性关系, 并且各个因子之间交互作用的影响不很显著。

表 5 回归方程的方差分析

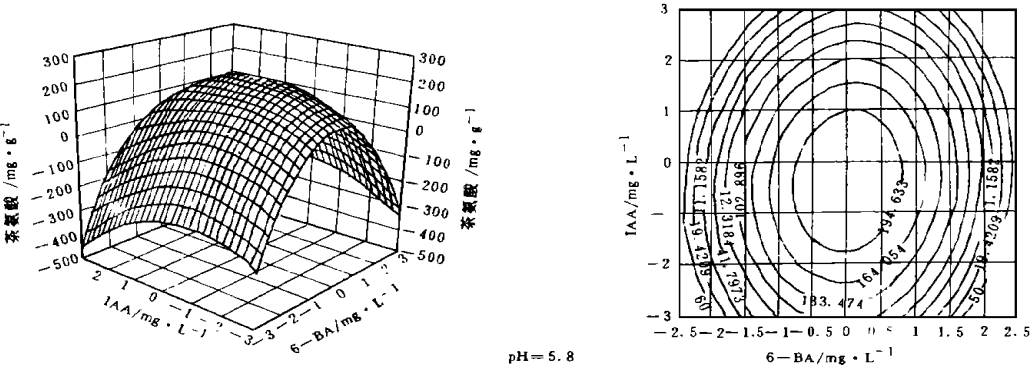
方差来源	自由度	茶氨酸			生长速率		
		平方和	均方差	F 值	平方和	均方差	F 值
回归	9	12 822. 29	1 369. 144	19. 27	3. 959E-03	4. 3996E-04	13. 976
残差	5	738. 176	147. 63		1. 574E-04	3. 1478E-05	
总离差	14	13 060. 47			4. 117E-03		
线性相关系数		0. 982			0. 969		

表 6 回归方程各项的方差分析表

方差来源	自由度	茶氨酸含量			生长速率		
		均方	F 值	显著性	均方	F 值	显著性
一次项	3	821.79	7.47		7.709E-04	847.2	* *
二次项	3	3 124.76	28.4	*	5.280E-04	580.2	* *
交互项	3	160.87	1.463		2.086E-05	22.9	*
失拟项	3	17.277	0.155 4		5.185E-06	5.686	
误差	2	10.99			9.100E-07		

注: * * $f_{0.01}(3, 2) = 99.2$; * $f_{0.05}(3, 2) = 19.2$, $f_{0.1}(3, 2) = 9.16$

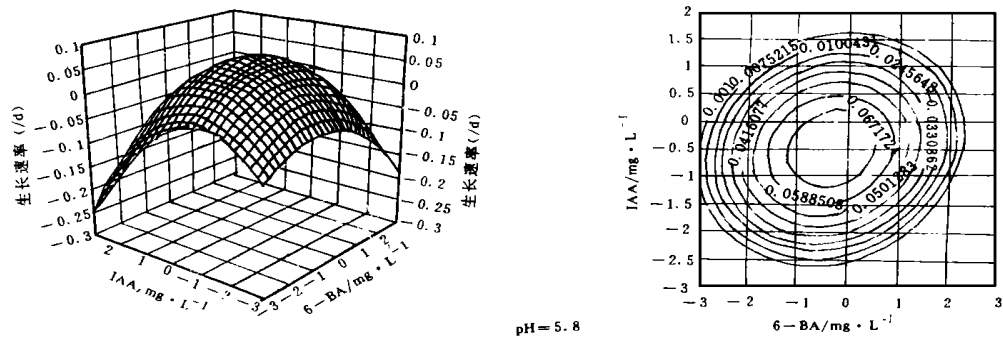
图 1 和图 2 分别为茶氨酸含量和愈伤组织生长速率的响应面分析图,从响应面看 X_3 的作用不如 X_1, X_2 显著。另外,从图中可以看出 X_1 的最适范围在 4.0 mg/L 左右, X_2 的最适范围在 2.0 mg/L 左右,最适 pH 值为 5.8。这与对回归方程取一阶偏导数等于零所得的值很接近,说明与试验得出的结论基本相符,也说明了 RSA 分析方法的可靠性。



$Y = f(x_1, x_2)$ 茶氨酸含量的响应面立体图

$Y = f(x_1, x_2)$ 茶氨酸含量的响应面平面图

图 1 茶氨酸含量的响应面分析图



$Y = f(x_1, x_2)$ 生长速率的响应面立体图

$Y = f(x_1, x_2)$ 生长速率的响应面平面图

图 2 愈伤组织生长速率的响应面分析图

2.3 不同碳源对茶愈伤组织生长和茶氨酸积累的影响

培养基中碳源不同,愈伤组织的生长速率及其茶氨酸含量的差异并不显著。从图 3 可以看出,用蔗糖、葡萄糖等作碳源培养基,其生长速率、茶氨酸含量接近,只有乳糖作为碳源时,其生长速率、茶氨酸含量才都低于蔗糖、葡萄糖为碳源的培养基。这说明,可能是茶细胞利用

乳糖的能力低于利用蔗糖、葡萄糖的能力。所以通常情况下都用蔗糖作为植物细胞培养的主要碳源。

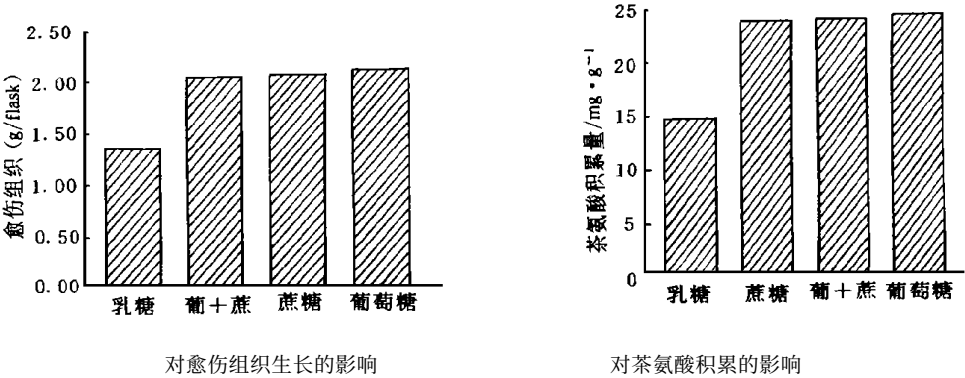


图 3 不同碳源对茶细胞生长和茶氨酸积累的影响

2.4 不同蔗糖浓度对茶愈伤组织生长和茶氨酸积累的影响

以不同浓度蔗糖作为碳源进行茶细胞培养时,其结果见图 4,随着蔗糖浓度的增加,愈伤组织生长逐渐上升,到 6% 时生长最好,随后下降,而茶氨酸的积累量继续逐渐上升,到浓度为 8% 时,其茶氨酸的含量是 2% 蔗糖浓度时的 2.5 倍,表明提高糖浓度有利于茶细胞次生代谢产物的形成。

2.5 温度、光照对茶愈伤组织生长和茶氨酸积累的影响

从图 5 可见,利于茶细胞生长的最佳温度为 25℃. 在 32℃ 或 35℃ 时,愈伤组织褐变、枯死。这一结果跟茶树生长的最适温度相一致。见图 6,茶氨酸在愈伤组织中的积累以温度 20~28℃ 之间较好,最佳积累茶氨酸的温度是 25℃. 这些结果表明,温度对茶愈伤组织生长和茶氨酸的积累的影响较明显。

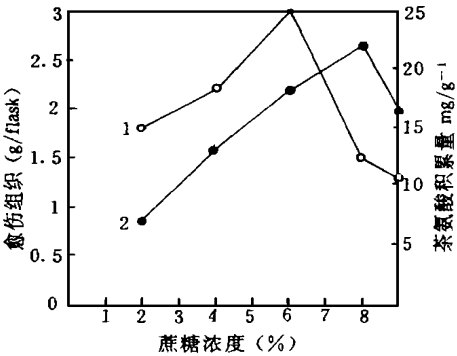


图 4 不同蔗糖浓度对愈伤组织生长和茶氨酸积累的影响
1 愈伤组织 2 茶氨酸

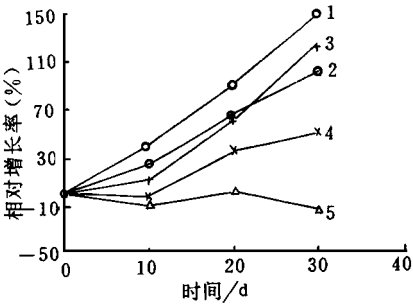


图 5 温度对茶愈伤组织生长的影响

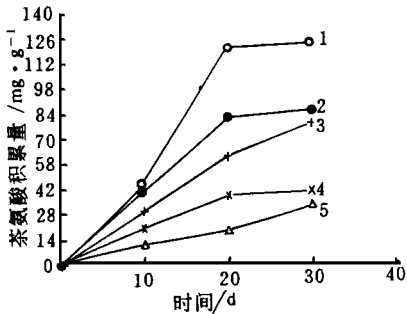


图 6 温度对茶氨酸积累的影响

光照对茶愈伤组织生长和茶氨酸积累的影响见表 7。光照有利于愈伤组织生长,但对茶氨酸积累不利。相反,尽管暗培养条件下愈伤组织的生长不如光照条件下,但茶氨酸积累却大幅度提高。导致茶氨酸积累增加,可能是代谢形成的茶氨酸不会被茶细胞很快利用掉而贮存起来的结果。

2.6 外加前体盐酸乙胺对茶氨酸积累的影响

盐酸乙胺是合成茶氨酸的前体物质,对于提高茶氨酸的产量影响显著,其最适盐酸乙胺浓度为 25 mmol/L 时,茶氨酸产量达到 132.3 mg/g (茶氨酸产量以每克干质量茶愈伤组织中所含的茶氨酸毫克数计,下同),见图 7。

2.7 愈伤组织生长与茶氨酸积累的动态分析

根据以上结果,设定在暗条件下蔗糖浓度为 6%, IAA 2 mg/L, 6-BA 4 mg/L, 前体浓度 25 mmol/L, 进行茶愈伤组织的培养, 结果发现愈伤组织的生长周期和茶氨酸的积累曲线几乎同步, 见图 8。茶氨酸在第 5 周达到高峰, 其量达到 201.6 mg/g。

表 7 光照对茶愈伤组织生长和茶氨酸积累的影响

处理内容	愈伤组织生长速率 (%)	茶氨酸含量 (mg/g)
光照培养	123	58.72
暗处培养	98	167.83

注:光照条件是 3 000 lx, 16h/d;暗条件是全黑。

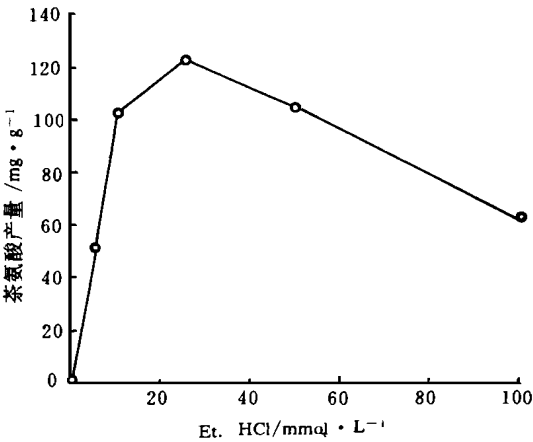
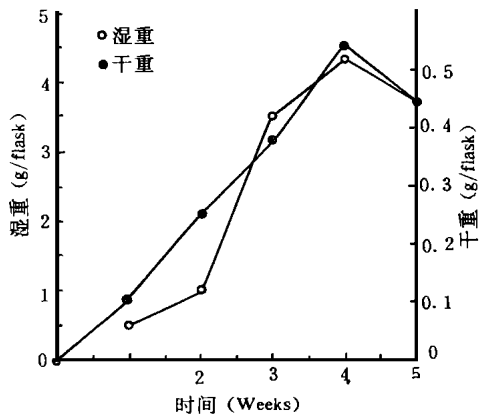
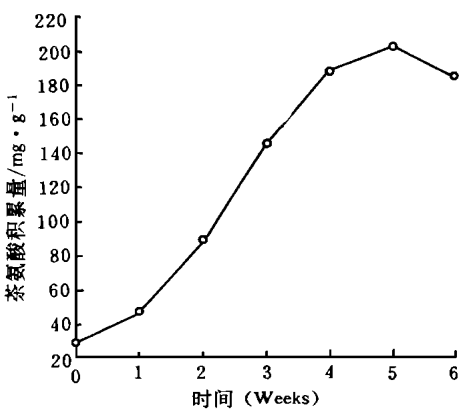


图 7 盐酸乙胺对茶氨酸积累的影响



愈伤组织生长曲线



茶氨酸累积曲线

图 8 愈伤组织生长与茶氨酸积累的动态分析

3 讨 论

由以上结果推论,茶树愈伤组织不仅能够保持其茶氨酸次生代谢物质的合成能力,而且在适宜的培养条件下,其积累可以达到比原来植株更高的水平。通过以上一系列条件的优

化,已使茶愈伤组织的茶氨酸含量提高到 201.6 mg/g. 在同一生长周期中,茶氨酸积累量的变化曲线与愈伤组织生长曲线密切相关,在直线生长期间,茶氨酸含量随生长量的增加而增加,到直线生长期末、静止期初为最高。至于 MS 培养基的各种元素、有机物质等条件的变化对茶愈伤组织的生长及茶氨酸积累的影响,还有待进一步研究。由于茶树愈伤组织结构紧密,分裂较慢,如果建立悬浮培养体系进行培养,使茶细胞分裂更快,必将有利于缩短生长周期。

参 考 文 献

- 1 赵和涛. 红绿茶加工过程中氨基酸变化与品质. 氨基酸杂志, 1990, 3
- 2 Tsunida T, Matsura T, et al. Theanine for inhibition of the stimulation induced by caffeine and manufacture or preparation of theanine, CA, 1993, 118(5): 37923
- 3 Sagesaka Y, Kakuda T, et al. Pharmacological effect of theanine, The Organizing Committee of ISTS, 1992, 362~365
- 4 Sakato Y. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 1950, 23: 262
- 5 Matsuura T, Kakuda T. Agric. Biol. Chem. 1990, 54: 2283~2286
- 6 食品添加剂手册. 北京: 化学工业出版社, 1989
- 7 Box G. E. P, Behnken, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics, 1960, 2: 455~476
- 8 SAS Institute Inc., The RSREG product, In SAS/STAT use guide, version 6, vol2(4th. edn.) SAS.

Tea Callus Culture and the Theanine Accumulation

Zhong Junhui Tao Wenyi

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi, 214036)

Abstract The growth and theanine accumulation of tea callus were investigated under different culturing conditions. Results showed that the effects of IAA and 6-BA were different when they were used together. The combination of 2 mg/L of IAA and 4 ml/L of 6-BA was found to be the best for the theanine accumulation. The effects of different carbon source for the growth and theanine accumulation of tea callus were almost similar. Increasing of sucrose concentration was beneficial to the accumulation of the secondary metabolism. The optimum temperature (25°C) for theanine accumulation was same as that for growth of callus. Dark culture was better than illumination for the accumulation of theanine. During a growth cycle, the accumulation of theanine was strongly dependent on the increasing of the callus fresh weight. The theanine content of the callus could be raised to 201.6 mg/g weight by adjusting the medium compositions for the cultures.

Key-words callus; theanine; culture; tea

(责任编辑: 秦和平)