

几种激素对茶愈伤组织合成茶氨酸的影响

陈 瑛

陶文沂

(绍兴文理学院, 绍兴 312000) (无锡轻工大学, 无锡 214036)

摘要 根据生长素(IAA), 吲哚 酸(IBA), 萘乙酸(NAA), 以及2, 4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D)和6-⁺基腺嘌呤(6-BA), 激动素(KT), 玉米素(ZT)及三十烷醇(TA)等的不同浓度和不同组合, 测定茶愈伤组织生长和茶氨酸的积累情况, 以求得茶愈伤组织生长和茶氨酸积累的较佳培养条件。试验证明, 以4 mg/L 6-BA + 2 mg/L IAA 或3 mg/L 6-BA + 1.5 mg/L IAA + 2 mg/L TA 的组合, 添加于MS培养基上, 茶愈伤组织生长和茶氨酸积累均良好, 茶氨酸含量最高可达170 mg/g。

关键词 组织培养; 激素; 愈伤组织; 茶氨酸; 食品添加剂

中图分类号 Q946.2

0 前 言

茶氨酸(N-乙基- γ -L-谷氨酰胺)是一种茶树特有的氨基酸, 具焦糖香和类似味精的鲜爽味, 能缓解苦涩味, 增加茶汤的香甜味^[1], 在日本已作为食品添加剂。茶氨酸在医学上还具有拮抗咖啡碱和降血压等多种功效^[2~4], 应用前景广阔。为了获得更多的茶氨酸, 作者采用了组织培养的方法, 通过一系列条件的优化, 使茶氨酸含量从茶叶中的1%~2%提高到愈伤组织含量的10%~20%^[5]。在组织培养中, 激素对愈伤组织的生长和茶氨酸的产量影响较大, 作者对生长素(IAA), 萘乙酸(NAA)及吲哚丁酸(IBA), 2, 4-二氯苯氧乙酸(2, 4-D)和6-⁺基腺嘌呤(6-BA), 玉米素(ZT), 激动素(KT)及三十烷醇(TA)的不同浓度、不同配比进行试验, 对各组不同情况下茶愈伤组织的生长和茶氨酸产量进行了比较研究。

1 实验器材

1.1 材料

愈伤组织 从中国农科院杭州茶叶研究所提供的碧云嫩叶诱导;
激素IAA; IBA; NAA; 2, 4-D; 6-BA; KT; ZT 均由中科院上海生化研究所提供;
茶氨酸标样 日本Kasei工业公司提供。

1.2 仪器

氨基酸自动分析仪 日立835-50型, 日本制;
光照培养箱 LRH-250A, 广州医疗器械总厂产品。

2 实验方法

2.1 愈伤组织培养

用 MS 培养基, 配以不同浓度和种类的激素, 在26℃光照培养箱中培养, 光强3 000 lx, 12 h 光照, 周期21 d.

2.2 氨基酸总量的测定

用80%的乙醇在26℃下浸提干燥的愈伤组织24 h, 然后用茚三酮比色法在721分光光度计570 nm 处比色测定。

2.3 茶氨酸含量的测定

愈伤组织80%乙醇提取液经过滤后上氨基酸自动分析仪测定, 测定条件为: 分离柱 $\varnothing$ 4 $\times$ 150 mm, 树脂为日立2619F; 滤氨柱 $\varnothing$ 4 $\times$ 50 mm, 树脂为日立2650; 缓冲溶液为 IPH-1.6, 缓冲液泵流速为0.45 ml/min, 压力8826 kPa; 茚三酮流速0.3 ml/min, 压力980 kPa; 进样量500 μ l.

3 结果与讨论

3.1 生长素类对茶愈伤组织生长和茶氨酸含量的影响

参照资料^[1~5]与本实验室经验, 用4 mg/L 6-BA 分别配以0.1, 0.5, 1, 2, 4 mg/L 系列质量浓度的 NAA, IAA, IBA 和2, 4-D 进行培养, 根据愈伤组织生长情况确定以表1中的质量浓度进行进一步试验和测定, 得结果如下:

表1 生长素类对茶愈伤组织生长和茶氨酸含量的影响

	NAA/mg•L ⁻¹			2, 4-D/mg•L ⁻¹			IBA/mg•L ⁻¹			IAA/mg•L ⁻¹		
	0.3	0.6	0.9	0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6	1	2	3
鲜重/g	2.07	2.48	3.01	2.05	2.06	2.24	2.50	2.41	2.09	1.66	2.58	2.01
鲜重增长倍数	5.16	6.08	7.38	4.88	6.20	5.32	5.91	5.70	4.99	4.02	6.14	4.78
干重/g	0.23	0.26	0.30	0.23	0.22	0.23	0.24	0.24	0.20	0.20	0.27	0.22
总氨基酸含量/mg•g ⁻¹	183	202	184	185	185	175	208	197	188	180	206	182
茶氨酸含量/mg•g ⁻¹	126	144	130	128	133	124	150	142	128	124	160	135
茶氨酸占总氨基酸(%)	69	71	71	69	72	71	72	72	68	69	78	74

注: 数据为3个平行样的平均数。

结果说明: 1) 氨基酸含量与鲜重增长倍数的相关性仅0.522, 说明愈伤组织的生长和茶氨酸积累并非完全同步, 这与茶氨酸在细胞内并不参与蛋白质组成, 而是作为氨的贮存和运输形式有关^[6]。2) 在试验浓度下, 各种生长素对愈伤组织生长的影响差别不大, 都能促进愈伤组织良好生长, 但各自峰值位置不一: NAA以0.6mg/L较为合适, 2, 4-D是0.4 mg/ml, IBA 是0.2 mg/L, 而IAA 则是2 mg/L。3) 不管哪一种生长素, 质量浓度过高则抑制生长, 质量浓度过低则起不到促进作用, 生长也受抑, 但相对每克干重愈伤组织中总氨基酸含量和茶氨酸含量来说影响不显著, 这可能是由于生长素对生长的促进作用较为直接, 而对茶氨酸合成等的代谢作用的影响较为间接且更为复杂的缘故。4) 从表1可看出, 茶氨酸平均占了总氨基酸量的71%。总氨基酸量是用茚三酮比色法测定的, 其中包括氨和胺类, 用氨基酸分析仪对各氨基酸的量进行测定, 发现如除去氨和胺类, 则茶氨酸占了实际氨基酸总量的95%以上, 其他氨基酸量均极微, 这合乎实验初衷——获得更多的茶氨酸。5) 实验数据表明以2 mg/L IAA 的结果最为理想, 故为以后的实验所采用。

©1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.2 细胞分裂素类对茶愈伤组织生长和茶氨酸积累的影响

同样, 事先对实验所用的6-BA, KT, ZT 在一定的质量浓度范围进行选择试验, 确定进一步试验的质量浓度, 各质量浓度下愈伤组织生长和茶氨酸积累情况见表2.

表2 细胞分裂素类对茶愈伤组织生长和茶氨酸积累的影响

	6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			KT/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			ZT/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		
	2	4	6	0.2	0.5	1.0	0.5	1	2
鲜重/g	2.01	2.98	2.34	2.49	2.99	3.36	1.96	2.09	2.46
鲜重增长倍数	4.02	5.96	4.88	4.00	5.54	6.56	4.98	5.53	5.05
干重/g	0.23	0.31	0.26	0.24	0.28	0.29	0.23	0.24	0.27
总氨基酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	189	218	192	162	169	188	170	198	187
茶氨酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	129	170	136	111	125	137	119	140	135
茶氨酸占总氨基酸(%)	68	78	71	68	74	73	70	71	72

注: 母体培养基为MS+ 2 mg/L IAA; 表中数据为3个平行样的平均数。

实验表明, 细胞分裂素对茶愈伤组织生长和茶氨酸积累均有较大影响, 鲜重增长率以KT 影响最为显著, 而对愈伤组织中氨基酸合成来说6-BA 效果优于KT 和ZT, 尤以质量浓度4 mg/L 的6-BA 效果最为突出, 茶氨酸占总氨基酸的比率也最高(78%). 相对来说各种激素处理对干重增长的影响较小。

可以说细胞分裂素在促进细胞分裂, 促进细胞对营养成分吸收的同时, 也影响着细胞内的代谢过程, 在合适的质量浓度下, 不仅细胞生长快, 而且茶氨酸合成能力增强。至于细胞分裂素在茶氨酸合成代谢的哪一步起作用, 有待于进一步研究。

3.3 三十烷醇对茶愈伤组织生长和茶氨酸的积累的影响

三十烷醇(TA) 在作物上的应用已有很多, 能促进植物的营养增长和提高抗逆性, 与生长素、细胞分裂素和赤霉素等还有协同作用, 故设计了如下的浓度配比进行试验, 结果见表3.

表3 三十烷醇对茶愈伤组织生长和茶氨酸的合成的影响

	6-BA+ IAA+ TA / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$									
	2+ 1+ 1	2+ 1+ 1	2+ 1+ 4	3+ 1.5+ 1	3+ 1.5+ 2	3+ 1.5+ 4	4+ 2+ 1	4+ 2+ 2	4+ 2+ 4	
鲜重/g	1.54	1.69	1.70	2.15	2.62	1.30	1.73	1.48	1.04	
鲜重增长倍数	3.75	4.12	4.14	5.12	6.33	3.17	4.21	3.60	2.53	
干重/g	0.25	0.26	0.25	0.28	0.31	0.23	0.27	0.23	0.18	
总氨基酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	169	170	181	203	212	177	174	172	161	
茶氨酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	115	121	128	150	168	122	122	115	106	
茶氨酸占总氨基酸(%)	68	71	71	74	80	69	70	67	66	

注: 数据为3个平行样的平均数。

从前面的实验结果可知, MS+ 2 mg/L IAA+ 4 mg/L 6-BA 是最适合茶愈伤组织生长和茶氨酸积累的培养基, 而且几次重复平行性很好, 但在此培养基上再添加TA, 却反而起一定的抑制作用, 愈伤组织块生长慢而且变褐。当适当减少6-BA 和IAA 质量浓度时添加适量的TA, 则茶愈伤组织生长较快, 鲜重增长率(6.33) 较仅6-BA+ IAA 最适质量浓度时的鲜重增长率(6.14; 5.96) 略高。可见TA 的影响是显著的, 这时除了TA 的直接作用外, 还可能是TA 促进了细胞内生长素和细胞分裂素的产生, 在合适的激素质量浓度下添加TA 使细胞内激素质量浓度过高而起抑制作用, TA 添加量越多, 抑制作用越明显, 这一结果与夏民州等的报道相符。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://

在实验过程中, 作者发现愈伤组织对不同培养基有一个适应过程。常需在同一培养基上继代2~3次后各种指标才稳定下来, 故表中数据除 MS+ 2 mg/L IAA+ 4 mg/L 6-BA 培养基以外, 其余均为经过3代培养后测定的结果。

4 结 语

激素是组织培养中的一个重要影响因素, 通过实验, 认为 MS 培养基中添加2 mg/L IAA 和4 mg/L 6-BA 或 MS 培养基中添加1.5 mg/L IAA, 3 mg/L 6-BA 及2 mg/L TA, 对茶愈伤组织的生长和茶氨酸的积累最为有利。同时本实验室对组织培养的其他条件如光强、温度、氮源的种类与浓度及前体物的添加等展开了一系列研究, 通过各种条件优化, 已使茶愈伤组织中茶氨酸含量提高到200 mg/g 以上, 并使杂质含量不断减少, 以利于最终对茶氨酸的提取。

参 考 文 献

- 1 食品添加剂手册编写组. 食品添加剂手册. 北京: 化学工业出版社, 1989
- 2 Tsunoda T, Matsura T. Theanine for inhibition of stimulation induced by caffeine and manufacture or preparation of theanine. 日本, Jpn Kokai Tokyo koho, JP 04, 253, 916. 1991, 10
- 3 Sagesaka Y, Kakuda T. Pharmacological effect of theanine. The Organizing Committee of ISTS, 1992: 362~365
- 4 沈原孝宣, 角田隆巳. 细胞培养生产茶氨酸. 食品工业, 1994, 12(30): 18~24
- 5 钟俊辉, 陶文沂. 茶愈伤组织培养及其茶氨酸的累积. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(3): 1~7
- 6 竹尾忠一. 以滋味成分茶氨酸为中心的茶树氮代谢. 茶叶试验场研究报告, 1981, (17): 1~68
- 7 夏民州, 汪安琳. 三十烷醇对湿地松苗内源激素含量的影响. 植物生理学通讯, 1995, 31(6): 427~428

Influences of Plant Hormones on the Synthesis of Theanine from Tea Callus

Chen Ying (Shaoxing College of Art and Science, Shaoxing 312000)

Tao Wenyi (Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract Theanine an amide that enhances the taste of infused green tea, was first found in shoot tips of tea plants. It possesses broad prospects on the development of finished tea products and medicine. Theanine is usually chemically synthesized, but it is expensive. In order to get more theanine at low prices, we have tried to produce theanine by cell mass culture technique. The influences of IAA, IBA, NAA, 2, 4-D, 6-BA, Zeatin, Kinetin and triacontanol on the synthesis of Theanine from tea callus have been studied in this paper. The growth and theanine accumulation of tea callus were investigated under different contents and constitution of hormones. The operation condition is MS medium containing 4 mg/L 6-BA and 2 mg/L IAA or MS medium containing 3 mg/L 6-BA, 1.5 mg/L IAA and 2 mg/L TA. The theanine content has been increased up to 170 mg/g drywt.

Key-words tissue cultures; hormones; tea callus; theanine; food additive

(责任编辑: 秦和平)