

大规模茶叶细胞悬浮培养茶氨酸 合成工艺优化研究

吕 虎¹, 华 萍², 余继红¹, 冷和平³, 蒋献猷³, 华 东¹

(1. 江西师范大学 生命科学院, 南昌 330027; 2. 江西医学院 基础医学部,
南昌 330006; 3. 江西绿色制药有限公司, 南昌 330002)

摘 要: 以婺源绿茶为材料进行茶叶愈伤组织悬浮培养, 采用正交实验设计进行了大规模茶叶细胞悬浮培养合成茶氨酸工艺条件优化研究。结果显示, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 0.0/60.0 mmol/L、 K^+ 100.0 mmol/L、 Mg^{++} 3.0 mmol/L、 H_2PO_4^- 3.0 mmol/L、蔗糖 30.0 g/L、水解酪蛋白 2.0 g/L 条件下, 茶叶细胞生长量(速率)和茶氨酸积累量均达到最高值; 提高培养基中蔗糖和水解酪蛋白浓度可延长细胞对数生长期和稳定生长期, 从而有利于茶氨酸积累; H_2PO_4^- 浓度主要影响细胞生长速率和茶氨酸积累速率的同步性, 低 H_2PO_4^- 浓度环境中茶氨酸积累速率峰值滞后于细胞增长速率峰值, 高 H_2PO_4^- 浓度环境中早于细胞生长速率峰值出现时间; K^+ 和 Mg^{++} 对细胞生长的影响不明显, 但影响茶氨酸合成酶活性, 维持适量的 K^+ 和 Mg^{++} 有利于茶氨酸积累。先加入一定量盐酸乙胺再每天进行少量补充, 茶氨酸合成量比一次性加入的效果要好。从生产效率考虑, 培养周期以 19~22 d 为宜。

关键词: 茶氨酸; 茶叶; 悬浮培养; 生物合成

中图分类号: TQ460, Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)03-0457-05

Study on theanine biosynthesis in tea cell suspension culture

Lü Hu¹, HUA Ping², YU Ji-Hong¹, LENG He-Ping³,
JIANG Xian-You³, HUA Dong¹

(1. College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330027, China; 2. Basic Department,
Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China; 3. Jiangxi Green Pharmacy Co. Ltd., Nanchang 330002, China)

Abstract: The suspension culture on the callus obtained from Wuyuan tea were conducted in a fermenter and then the effects of different factors on the growth of tea cells and the amount of synthesized theanine were analyzed. The result showed; the theanine accumulation peaked between nineteenth day and twenty-second day in a culture period. The growth of tea cells and the amount of theanine presented an optimal increment, when there are $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 0.0/60.0 mmol/L, K^+ 100.0 mmol/L, Mg^{++} 3.0 mmol/L, H_2PO_4^- 3.0 mmol/L, sugar 30.0 g/L, protein 2.0 g/L in the medium. The log phase and the stationary phase were enhanced when the amount of sugar and protein raised in the medium. The simultaneity of tea cells growth and theanine accumulation was changed by the different amount of H_2PO_4^- in the medium. The activity of theanine-synthetase (L-glutamate: ethylamine ligase) was effected by K^+ and Mg^{++} . Accumulating-content of theanine could greatly raised when ethyl-amine($\text{ZtNH}_2\text{-HCl}$) added, with multi-addition $\text{ZtNH}_2\text{-HCl}$ performing better than the one-time addition of $\text{ZtNH}_2\text{-HCl}$ at a specific amount at first and then a smaller amounts.

Key words: theanine; tea; suspension culture; biosynthesis

收稿日期: 2005-06-30 修回日期: 2006-01-20

作者简介: 吕虎(1962-), 男, 江西永修人, 教授, 主要从事天然产物深度加工与综合利用研究。

茶氨酸(N-乙基-L-谷氨酰胺, N-ethyl-L-glutamine)主要存在于山茶科植物中,为茶叶的特征性氨基酸,也是茶叶的呈味物质之一,其含量与茶叶的品质和等级呈正相关(高小红等,2004)。茶氨酸可调节体内儿茶酚胺、5-羟色胺等神经递质分泌量、具有对咖啡因的拮抗作用、影响多巴胺释放等从而发挥降血压、静心安神、促进大脑功能等多方面的药理作用(高小红等,2004);并且可以干扰谷氨酰胺代谢等作用而抑制肿瘤细胞生长和肿瘤转移(高小红等,2004);作为食品添加剂,茶氨酸可抑制其它食品中的苦味和辣味物质、改善食品风味(高小红等,2004);在食品和医药行业中具有很高的应用前景。目前,已经探索过的茶氨酸制备方法主要有化学合成、微生物发酵、茶树愈伤组织培养和茶叶中提取等。近年来,茶树愈伤组织培养合成茶氨酸研究已日益为人们所重视。固体培养基和液体培养基摇瓶振荡培养研究表明,向培养基中添加初级胺类前体物质(高小红等,2004;杜荣茂等,2003;汤斌,2002;Takanobu 等,1992;Tsutomu 等,1990)、适宜的植物激素组合(成浩等,2004;汤斌,2002;钟俊辉等,1997)可大幅度提高愈伤组织茶氨酸合成量;培养基中宏量元素含量、碳源、氮源等因素都对茶树细胞生长量与茶氨酸合成量具有不同影响(成浩等,2004;高小红等,2004;钟俊辉等,1997)。但大规模液体培养的报道少见。本文采用婺源绿茶为材料进行茶叶愈伤组织悬浮培养,在单因素研究和机械搅拌式发酵罐培养放大研究的基础上,进行了大规模茶叶细胞悬浮培养合成茶氨酸工艺条件优化研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

由江西婺源县漳公山地区采集的婺源绿茶嫩叶,经10%次氯酸钙溶液15 min表面消毒后在固体培养基上诱导成为愈伤组织,取其中较为疏松的愈伤组织在含0.5%纤维素酶的MS液体培养基中消化30 min后接种到MS液体培养基中置摇床振荡培养(转速 100 ± 10 rpm,振幅2~3 cm),每7 d续代1次,接种量为原培养液:新鲜培养基=1:2。连续续代7次后将三角瓶静置30 min,取上层细胞液建立悬浮培养细胞系。

1.2 培养方法

搅拌式发酵罐(20 L, Bioengineering NLF22),

桨叶型板搅拌器,转速90 rpm,通气量1.0~1.2 vvm;接种量5g鲜细胞/100 mL培养基;于培养第5天加入25 mmol/L盐酸乙胺;培养温度 26 ± 1 °C。

1.3 基础培养基

MS培养基(含IBA 2 mg/L, 6-BA 4 mg/L)。

1.4 培养基成分对细胞生长与茶氨酸合成量的影响

采用正交实验设计,考察大规模培养过程中培养基中氮源、碳源、 K^+ 、 Mg^{++} 、 $H_2PO_4^-$ 、 NH_4^+/NO_3^- 等因素对细胞增长量和茶氨酸积累的影响。

表1 因素水平表
Table 1 Factors and levels

水平 Level	因素 Factor					
	NH_4^+ / NO_3^- (mmol/L)	K^+ (mmol/L)	Mg^{++} (mmol/L)	$H_2PO_4^-$ (mmol/L)	蔗糖 (g/L)	水解酪蛋白 (g/L)
	A	B	C	D	E	F
1	10.0/60.0	80.0	1.0	2.0	30.0	0.0
2	4.0/60.0	100.0	2.0	3.0	40.0	1.0
3	0.0/60.0	120.0	3.0	4.0	50.0	2.0

1.5 细胞总量与活细胞数测定

取定量悬浮培养液2 000 rpm离心10 min,取沉淀70 °C恒温箱中干燥至恒重精密称出细胞总重量。活细胞数参照郑国昌等(1993)的方法进行。

1.6 茶氨酸含量测定

精密称出定量经70 °C恒温干燥至恒重的细胞,粉碎后用80%乙醇溶液(75~80 °C)浸提2 h,浸提液经过滤后作为上样液。采用氨基酸分析仪(日立835-50型);分析条件为分离柱 $\phi 4 \times 150$ mm,树脂日立2619 F;滤氮柱 $\phi 4 \times 150$ mm,树脂日立2650;缓冲液I pH1.6,缓冲液泵流速0.45 mL/min,压力90 kg/cm²;印三酮流速0.30 mL/min,压力10 kg/cm²;进样量500 μ L。

2 结果

2.1 培养基成分对细胞生长与茶氨酸合成量的影响

表2中10~28thd列数据分别为培养不同天数取样检测结果;做3个平衡,结果取均值;检测结果显示,第一行数据为茶叶细胞总量(g/100mL),第二行数据为茶氨酸积累量(mg/gDW)。结果显示, NH_4^+/NO_3^- 、 K^+ 、 Mg^{++} 、 $H_2PO_4^-$ 、等宏量元素不同含量以及蔗糖、水解酪蛋白不同浓度的组合对茶叶细胞增长周期、生长量和茶氨酸积累量均产生影响。由此可见,培养液中茶叶细胞总量和茶氨酸积累有

密切关系;以茶叶细胞量和茶氨酸积累总量为考察指标,6种主要因素的最佳组合为 $A_3B_2C_3D_2E_1F_3$, 即 NH_4^+/NO_3^- 0.0/60.0 mmol/L、 K^+ 100.0 mmol/L、 Mg^{++} 3.0 mmol/L、 $H_2PO_4^-$ 3.0 mmol/L、蔗糖 30.0 g/L、水解酪蛋白 2.0 g/L 条件下,茶叶细胞生长量(速率)和茶氨酸积累量均达到最高值。结果显示,提高培养基中蔗糖和水解酪蛋白浓度可使细

胞对数生长期和稳定期得到延长,从而有利于茶氨酸积累; $H_2PO_4^-$ 浓度主要影响细胞生长速率和茶氨酸积累速率的同步性,低 $H_2PO_4^-$ 浓度环境中茶氨酸积累速率峰值滞后于细胞增长速率峰值,高 $H_2PO_4^-$ 浓度环境中茶氨酸积累速率峰值出现时间前移; K^+ 和 Mg^{++} 对细胞生长的影响不明显,但影响茶氨酸合成酶活性,维持适量的 K^+ 和 Mg^{++} 有利于茶氨

表 2 L18(3⁷)正交实验设计及结果表
Table 2 Design and results of orthogonal test

实验次数 No.	A	B	C	D	E	F	10 th d	13 th d	16 th d	19 th d	22 th d	25 th d	28 th d
1	1	1	1	1	1	1	5.73 31.04	8.99 74.74	14.06 81.00	14.99 137.44	13.96 138.69	12.54 101.01	11.79 93.71
2	1	2	2	2	2	2	5.98 29.22	8.79 99.16	14.36 153.24	14.72 179.90	14.48 183.37	13.93 150.32	12.99 150.11
3	1	3	3	3	3	3	5.77 30.64	9.33 87.71	13.75 109.45	14.61 108.36	14.02 102.22	14.00 103.13	13.67 96.99
4	2	1	1	2	2	3	6.01 31.97	10.43 90.02	12.60 98.33	13.90 133.93	13.81 134.44	13.82 120.92	13.18 118.07
5	2	2	2	3	3	1	6.33 28.80	11.01 84.14	14.07 109.81	13.61 109.81	13.53 100.10	12.26 97.77	11.04 96.39
6	2	3	3	1	1	2	5.65 29.11	9.74 92.10	15.00 17.34	14.67 149.01	14.01 156.43	13.66 120.09	12.20 106.66
7	3	1	2	1	3	2	5.60 29.92	10.59 104.59	13.97 136.87	15.84 196.32	15.02 206.00	14.41 197.33	13.16 194.04
8	3	2	3	2	1	3	5.96 30.07	10.22 51.26	14.39 107.05	16.09 204.11	16.33 205.57	16.19 201.00	14.84 192.82
9	3	3	1	3	2	1	5.88 28.35	9.87 164.42	15.02 201.09	15.64 196.74	13.97 183.15	12.05 180.00	11.63 156.40
10	1	1	3	3	2	2	5.69 27.43	9.95 151.39	14.99 189.99	15.31 183.63	14.05 183.01	13.33 178.56	13.19 179.70
11	1	2	1	1	3	3	5.57 28.01	10.01 99.35	15.34 148.57	15.77 160.33	14.61 166.05	14.00 160.00	13.06 158.12
12	1	3	2	2	1	1	5.90 30.00	10.04 98.96	15.22 130.11	15.01 147.37	14.02 132.70	11.96 121.29	10.81 105.05
13	2	1	2	3	1	3	5.99 31.03	9.99 117.64	15.46 150.48	15.46 150.10	15.03 145.04	13.44 141.74	13.16 129.96
14	2	2	3	1	2	1	5.41 30.77	8.94 79.46	14.43 101.37	14.22 128.92	13.79 159.38	13.05 130.67	12.77 124.99
15	2	3	1	2	3	2	5.55 31.21	9.38 110.00	14.57 140.04	14.54 173.14	14.55 170.90	14.17 167.77	12.00 168.12
16	3	1	3	2	3	1	5.76 29.55	9.43 106.54	14.11 151.02	14.00 197.25	13.37 196.50	13.04 183.37	12.83 169.56
17	3	2	1	3	1	2	5.48 26.53	10.00 111.21	14.70 150.67	14.59 150.70	13.75 149.31	12.99 144.51	12.57 145.69
18	3	3	2	1	2	3	5.93 27.44	10.27 89.78	14.32 160.09	15.01 197.28	15.00 187.01	14.20 174.43	13.01 161.55

注: (1)10~28thd 列数据分别为培养不同天数取样检测结果;做 3 个平衡,结果取均值。(2)检测结果中第一行数据为茶叶细胞总量(g/100mL),第二行数据为茶氨酸积累量(mg/gDW)。

Note: (1)The data were tested separately on 10 ~28thd during the culture. The result was valued by three samples. (2)The data in 1st line is cell quantity(g/100mL) during the culture. The data in second line is accumulation of theanine (mg/gDW) during the culture.

酸积累。

2.2 盐酸乙胺及其添加方式对茶叶细胞生长与茶氨酸积累量的影响

表 3 中做 3 个平衡,结果取均值;第一行数据为

不加盐酸乙胺;第二行数据为培养第 5 天加入 25 mmol/L 盐酸乙胺;第三行数据为培养第 5 天加入 20 mmol/L 盐酸乙胺,并且每天流加盐酸乙胺(1 mmol/L)。可见,添加茶氨酸合成前体物质盐酸乙

胺对茶叶细胞生长量影响较小,培养前期细胞增长量基本一致,培养后期添加前体的细胞增长量略有增加。但是,添加盐酸乙胺后对茶氨酸合成量的影响非常明显。在没有添加前体物质时,培养细胞中的茶氨酸合成量很少并且几乎没有增加;当添加了盐酸乙胺后,细胞中的茶氨酸合成速率从培养后第 10 天后开始迅速增加,培养到第 19~22 天达高峰,接着逐渐下降。以不同方式加入盐酸乙胺对茶氨酸

合成量影响也不相同;先加入一定量盐酸乙胺再每天进行少量补充,茶氨酸合成速率比一次性加入的效果要好,茶氨酸合成高峰时间在培养 22 d 出现。添加的前体物质能促进或诱导细胞中茶氨酸合成活性,使细胞充分利用前体进行茶氨酸合成;先添加特定量、然后再逐步补充前体物质可以在培养基中维持一定浓度的盐酸乙胺,有利于提高茶氨酸合成速率和积累量。

表 3 盐酸乙胺加入方式与茶叶细胞生长/茶氨酸积累的关系

Table 3 Growth dynamics of tea cell and accumulation of theanine with ethyl-amine added in different methods

培养时间 Cultured duration(d)	10 th d	13 th d	16 th d	19 th d	22 th d	25 th d	28 th d
细胞总量 (g/100mL)	6.07	10.89	14.34	15.87	16.00	15.47	14.52
Cell quantity	5.96	10.22	14.39	16.09	16.33	16.19	14.84
	5.99	10.05	15.00	16.27	16.09	15.80	14.77
茶氨酸积累量 (mg/gDW)	32.13	46.66	45.02	44.04	43.15	34.10	29.76
Accumulation of theanine	30.07	51.26	107.05	204.11	205.57	201.00	160.28
	30.01	68.72	122.33	207.05	206.16	197.64	172.31

注: 做 3 个平衡,结果取均值;第一行数据为不加盐酸乙胺;第二行数据为培养第 5 天加入 25 mmol/L 盐酸乙胺;第三行数据为培养第 5d 加入 20 mmol/L 盐酸乙胺,并且每天流加盐酸乙胺(1 mmol/L)。

Note: The result was valued with three samples from fermenter; the data in the 1st row without precursor; the 2nd row added with $ZtNH_2-HCl$ (25 mmol/L) on the 5th day during the culture; the 3rd row added with $ZtNH_2-HCl$ as 20 mmol/L on the 5th day and 1 mmol/L in every day during the culture.

3 讨论

近年来,茶树愈伤组织培养生产茶氨酸成为研究热点,在固体培养基和液体培养基摇床中小规模进行培养的报道较多,但采用发酵罐大规模进行培养的报道少见。本文在单因素研究基础上设计了本文中主要考察因素水平,通过正交设计进行发酵灌放大培养试验,结果显示,在一个培养周期中,茶叶愈伤组织细胞呈现几个不同的生长阶段,培养的第 10 天开始茶叶细胞生长进入加速期(acceleration phase),细胞数量逐渐增加;第 13 天开始进入对数生长期(log phase),细胞总量迅速增加;从第 19 天前后细胞增长速度减慢而转入稳定生长期(stationary phase)。茶氨酸的合成速度在细胞对数生长中后期开始迅速增加,积累速率略滞后于细胞增长,但将培养基中 H_2PO_4 浓度提高时,茶氨酸积累峰值前移;并且茶氨酸积累量与愈伤组织生长量密切相关。Takanobu 等(1992)和 Tsutomu 等(1990)的研究显示,根据培养前的条件、培养基性质不同,细胞延滞期、加速期、对数期和稳定期持续天数略有差异;茶氨酸积累量增长略滞后于细胞量增长;本文的研究结果验证了上述研究结果。本文研究中获得的 6 种

主要因素的最佳组合为 $A_3B_2C_3D_2E_1F_3$, 即 NH_4^+ / NO_3^- 0.0/60.0 mmol/L、 K^+ 100.0 mmol/L、 Mg^{++} 3.0 mmol/L、 H_2PO_4 3.0 mmol/L、蔗糖 30.0 g/L、水解酪蛋白 2.0 g/L 条件下,茶叶细胞生长量(速率)和茶氨酸积累量均达到最高值,与其它文献(Takanobu 等,1992; Tsutomu 等,1990; 张莹等,2003)报道的在摇瓶培养和固体中获得最佳组合各主要因素含量有一定的差异。提示,摇瓶培养获得的工艺参数不能直接用于放大培养;进行工业放大时应综合考虑各种因素影响。

研究表明,茶氨酸合成酶仅为茶树所特有,对 L-谷氨酸、乙胺和 ATP 有较高的特异性亲和力(Matsuura 等,1965);但在没有添加前体物质的条件下,来自根、茎、叶的愈伤组织中茶氨酸的合成能力较弱,其中以嫩叶的愈伤组织茶氨酸的合成能力相对较高(成浩等,2004)。当培养基中添加盐酸乙胺等初级胺类前体物质可大幅度提高愈伤组织中茶氨酸合成量(Takanobu 等,1992; Tsutomu 等,1990)。资料报道,当在培养基中添加 25 mmol/L 的乙胺时,茶叶愈伤组织的茶氨酸合成量处于最大值(钟俊辉等,1997; 汤焱,2002; 张莹等,2003)。本文研究通过对一次性添加和逐步流加方式补充前体物比较研究结果显示,培养基中盐酸乙胺浓度维持

在 20 mmol/L 以上时,茶叶愈伤组织的茶氨酸合成量和细胞生长量即可保持良好状态;大规模培养时以流加方式补充前体物可使细胞中茶氨酸合成酶活性水平处于较高状态,在细胞密度较高时更是如此;这可能是茶氨酸合成速率需要维持一个稳定的前体物质浓度才能处于最佳状态。

钟俊辉等(1997)报道,增加培养基中糖浓度有利于茶氨酸等次生代谢物的累积;暗培养条件下茶树愈伤组织细胞生长率虽然略低于光照培养,但茶氨酸积累却大幅度提高(由光照培养的 58.72 mg/gDW 提高到 167.87mg/gDW)。这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(钟俊辉等 1997)。茶树体内,在茶氨酸合成酶作用下利用谷氨酸和乙胺(消耗 ATP)合成茶氨酸;如果茶树光合作用旺盛,茶氨酸分解代谢就会加速,其碳架参与茶多酚形成及其它相关物质代谢;因此,当光合作用加强、大量进行碳素同化作用时细胞内茶氨酸含量降低,而碳素同化作用降低则茶氨酸积累量提高(汤斌,2002)。梁晓岚等(1994)报道,使用氮肥可以促进茶树茶氨酸合成。本文研究显示,提高培养基中蔗糖和水解酪蛋白含量可提高细胞内茶氨酸积累量,这种特征与茶树体内茶氨酸合成特征一致;其原因可能是由于降低了茶叶细胞碳素同化作用。因此,大规模悬浮培养茶叶细胞时应保持适当的有机碳和有机氮浓度,以利于茶氨酸大量积累。

日本学者 Matsuura 等(1965)首次报道从茶树根中分离出茶氨酸合成酶(theanine-synthetase, L-glutamate : ethylamine ligase),并证实该酶对谷氨酸、乙胺和 ATP 有较高的亲和力,酶分子中含有松散结合的金属离子。但是由于茶氨酸合成酶在细胞外较容易失活, K^+ 和 Mg^{++} 等金属离子对酶活性的作用机制研究被研究者所省略。资料报道(王镜岩等,2002),几乎 1/3 的酶催化活性需要金属离子,金属结合酶(metalloenzyme)含有紧密结合的过渡金属离子(如 Fe^{++} 、 Fe^{+++} 等),金属-激活酶含松散结合的碱和碱土族金属离子(如 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{++} 或 Ca^{++} 等);金属离子通过结合底物为反应定向、调节氧化还原反应、静电稳定或屏蔽负电荷等主要途径参加催化过程。可能茶氨酸合成酶是一类金属激活酶(metal-activated enzyme), K^+ 和 Mg^{++} 等金属离子通过形成 Mg^{++} -ATP 复合物产生静电屏蔽

效应促进反应,或通过水的离子化作用促进亲核催化等机制而对茶氨酸合成酶催化活性产生促进作用,使茶氨酸合成速率得到提高。

由于本文是在无反馈条件下观察,结果可能没有精确反映培养基中乙胺浓度对茶氨酸积累茶氨酸积累的影响,最佳的乙胺流加量和维持量有待于进一步研究。此外,本文研究中蔗糖和水解酪蛋白为一次性添加,进行大规模培养时以流加方式补充有机氮源、碳源对细胞增长量和茶氨酸积累的影响也有待于深入考察。

参考文献:

- 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 2002. 生物化学(第 3 版)[M]. 北京:高等教育出版社;393—394
- 郑国昌,谷祝平. 1993. 生物显微技术[M]. 北京:高等教育出版社;92—96
- Cheng H(成浩),Gao XY(高秀英). 2004. Dynamics of theanine biosynthesis in tea suspension(茶树悬浮细胞茶氨酸生物合成动态研究)[J]. *J Tea Sci*(茶叶科学),24(2):115—118
- Du RM(杜荣茂),Zhan TH(詹太华). 2003. Progress in studies of L-Theanine(茶氨酸的研究进展)[J]. *Fujian Tea*(福建茶叶),2:9—11
- Gao XH(高小红),Yuan H(袁华),Yu ZY(喻宗沅). 2004. Research progress of L-Theanine(茶氨酸的研究进展)[J]. *Chem Biotech*(化学与生物工程),1:7—9
- Liang XL(梁晓岚),Chen CL(陈春林). 1994. Progress in studies of theanine(茶氨酸的研究进展)[J]. *Sum Tea Sci Tech*(茶叶科技简报),2:2—5
- Matsuura T,Kakuda T,Kinosh KS,et al. 1965. The characteristics of L-glutamate,ethylamine ligase[J]. *Agric Biol Chem*,29(11):984—988
- Tang Y(汤斌). 2002. Biosynthesis, pharmacology and utilization in food of theanine(茶氨酸合成、药理及其在食品中的应用)[J]. *J Tea Business*(茶业通报),24(4):19—21
- Takanobu M,Takami K,Tatsuyaki K,et al. 1992. Theanine formation by tea suspension cells[J]. *Biosci Biotech Biochem*,56(8):1 175—1 181
- Tsutomu F,Yutaka O,Yumiko T. 1990. Caffeine and theanine from cultured cells of *Camellia sinensis*[J]. *Phytochem*,29(8):2 539—2 543
- Zhang Y(张莹),Shi ZP(施兆鹏),Shi L(施玲). 2003. Progress in studies of theanine(茶氨酸的研究进展)[J]. *Nat Product Res Devel*(天然产物研究与开发),15(4):369—372
- Zhong JH(钟俊辉),Tao WY(陶文沂). 1997. The callus cultured and the theanine accumulation(茶愈伤组织培养及其茶氨酸的积累)[J]. *J Wuxi Univ Light Industry*(无锡轻工大学学报),16(3):1—7