

茶叶生物技术研究现状与展望

毛清黎 王星飞 孝感学院生物系 432100

施兆鹏 湖南农业大学食品科技学院 410128

摘 要 提出了茶叶生物技术的基本概念,综述酶工程、细胞工程、基因工程及发酵工程四大生物工程技术在茶学领域的应用现状,并据此提出了今后进一步开展这方面研究的方向。

关键词 茶叶生物技术 酶工程 细胞工程 基因工程 发酵工程

Abstract In this paper, the concept of tea biotechnology and the application of biotechnology such as enzyme engineering, cell engineering, genetic engineering and fermentation engineering in tea were studied. Then based on these, the fields to be further were suggested.

Key words Tea biotechnology Enzyme engineering Cell engineering Genetic engineering Fermentation Engineering

1 茶叶生物技术的概念

生物技术 (Biotechnology) 即利用生物及其代谢过程 ("Bio") 来解决各种问题及取得有用的产品 ("technology") 的工程技术^[1]。实际上人类利用微生物的生物过程来制造有用的食物,如面包、奶酪及保存乳品及粮食,已有 6000 年的历史。到了 20 世纪七十、八十年代,人类不仅能利用生物整体,且能在细胞及分子水平上利用生物。现在,生物技术更准确的定义应具有“现代”的概念,即在细胞及分子水平上利用生物的代谢过程来解决人类面临的问题及制造产品的技术。20 世纪生命科学的飞速发展表明,生物技术产业将成为 21 世纪的支柱产业,生物技术将为最终解决人类面临的人口、食物、资源 and 环境等重大问题发挥巨大作用。

茶学是一门较成熟的传统学科,目前,我国茶叶工作者在其常规技术研究方面已取得丰硕成果,并在茶叶生产领域发挥了很大的作用,然而,要使我国茶业在质量、产量、新产品开发及综合利用等方面有较大的突破,传统的茶叶技术已显得十分乏力,必须进行技术创新。那么,利用酶工程及基因工程等现代生物技术可望解决传统茶业面临的许多难题,这样便形成了传统茶学与现代生物技术“杂交”的新兴学科——茶叶生物技术,这一新兴技术将赋予茶学这一传统学科以新的活力。

2 茶叶生物技术研究现状

2.1 酶工程的应用

利用酶的高效生物催化功能,促进茶叶内不利及无效成分的有益转化,改善茶叶的色香味形品质及营养价值等综合品质,是茶叶酶工程的重要内容。20 世纪 70 年代 Y. Takino^[2]和 G. W. Sanderson 等^[3]以及施兆鹏^[4]分别对单宁酶和果胶酶提高速溶茶制率、减少冷后浑及改善速溶茶汤色进行了研究。80 年代毛清黎等^[5-9]先后承担国家自然科学基金项目及湖南

省科委的重点项目对外源纤维素酶、果胶酶及多酚氧化酶提高红碎茶品质进行了较系统的研究,肯定了外源酶在固形茶加工中的增质效果,并提出了适于茶叶加工应用的粗酶制剂的生产方法及制茶工艺配套技术。这方面的研究几乎与原苏联及日本同步^[10],而先于印度近 10 年^[11]。1990 年加藤和冈本顺子^[11]在红茶发酵过程中添加 1% 的微生物多酚氧化酶,可使红茶汤改善,发酵时间缩短。游小清等^[12]的研究结果表明:从楮叶种中提取的 β -糖苷酶粗品可使夏季烘青绿茶中芳樟醇及香叶醇的含量提高 1-3 倍,明显改善夏季绿茶香气。据曾晓雄报道^[13],在红碎茶加工中添加蛋白酶可使氨基酸含量提高 21.5%,茶红素提高 20% 以上,茶褐素明显下降,使滋味增强且更醇和,汤色变亮,香气变好。对于外源水解酶提高茶叶品质的生化机理,毛清黎等^[14]通过电镜及 HPLC 分析研究认为:外源酶水解叶组织细胞壁中不溶性多糖产生的生化破坏作用,使发酵茶胚酸化,提高多酚氧化酶活性,促使茶黄素形成及叶绿素降解,同时提高成茶有效成分的浸出率,从而较全面地改善红茶内外品质。

在固定化酶的应用方面,首先是一项以硅藻土固定单宁酶处理红茶“冷后浑”的技术获得英国专利^[13, 15]。日本的一项专利技术则是将单宁酶固定在聚砜中空纤维超滤膜上,用以解决红茶“冷后浑”而获得澄清的茶汁^[16]。程琦报道,采用壳聚糖固定单宁酶,可水解茶多酚提取液中 96% 以上的酯型儿茶素^[17]。李荣林等对多酚氧化酶的固定化技术进行了研究,利用海藻酸钠包埋和戊二醛交联两种固定化技术共同作用对多酚氧化酶进行固定,并对其化学性质进行了研究^[18]。

关于酶传感器的应用,日本的青木智^[19]和崛江秀树等^[20]在 1980 年代和 1990 年代分别研究了用葡萄糖氧化酶、过氧化物酶、抗坏血酸酶及单宁酶膜传感器测定茶树及茶汤中的葡萄糖、氨基酸、维 C 和儿茶素等。

2.2 细胞工程的应用

细胞工程就是在细胞水平研究开发利用各类生物细胞的工程技术。主要有细胞培养、细胞融合及细胞代谢物的生产等。

国内外的大量研究结果表明：茶叶儿茶素在食品、医疗、保健及日用化工方面有广阔的应用前景。但儿茶素的生产目前主要采取成茶提制工艺法，此法存在工艺复杂、成本较高及原料受地域季节影响等弊端；而利用茶树细胞培养生物合成法生产儿茶素因其具有不受地域季节限制、不与传统饮料茶叶争原料、便于产业化等优点，近年来受到了国内外的重视。中国茶科所的成浩等^[21-25]90年代以来在这方面进行了较系统的研究，证实茶树培养细胞在一定的条件下不仅能够保持其次生代谢产物的合成能力，而且可以通过培养基组分调节等方法大幅度提高儿茶素含量。为了解决细胞培养生物合成过程中酯型儿茶素含量极低及产业化等问题，湖北孝感学院生物系与湖南农业大学食品科学系的教授专家们正合作进行“儿茶素细胞培养生物合成机理及其发酵生产技术研究”，并得到了湖北省科技厅教育厅的重点支持，该项研究旨在通过对儿茶素细胞培养生物合成机理研究探索一条产业化的有效途径。

利用“植物细胞具有的全能性”的组织培养进行植物繁殖，具有繁殖系数高、易保持亲本的优良性状及占地面积小易于产业化等特点。茶树属多年生的异花授粉植物，利用组织培养进行茶苗微繁殖并结合人工种子技术，这将在茶树育种研究及茶叶生产实际中都具有广阔的应用前景。最早的茶树微繁殖研究报道于1984年Phukan和Mitra对茶茎外植体的培养^[26]，之后，Arulpragasam和Latiff也报道了茶茎尖和带芽茎段培养中新梢的形成^[27]。Nakamura在1987年第一次报道了在茎尖培养中得到了生根和再生植株^[28]。1990年Sarathchandra和Arulpragasam采用来自田间植株的茎节作为外植体，建立了实用的茶树体外繁殖方法，一年中从50个外植体得到了36153个新梢。微繁殖也可通过不定芽或不定胚的途径进行^[29]。国外的Kato^[30]和Nakamura^[31]分别在1985年和1989年通过茎段培养得到了不定芽，我国的刘德华^[32]则报道了在下胚轴培养中不定芽的形成。1991年Nakamura^[33]详述了通过芽增殖、不定芽形成和不定胚形成等途径进行茶树外繁殖的方法，不仅有效，而且简便可靠。利用该方法一年内一支材料可繁殖出50000株茶苗，为良种快繁提供了有效途径。2000年孙仲序等^[34]报道了山东茶树良种组织培养及繁殖能力的研究，结果表明：通过组织培养获得的茶苗移栽成活率达85%，一个外植体经三次继代培养可繁殖47棵苗。

以上国内外的研究均表明：利用组织培养进行茶树微繁殖的繁殖高，即可在很短的时间内从很少的材料快速地繁殖出大量植株。因此，该技术的应用可快速繁殖优良无性系，大大缩短茶树育种进程以及建立离体基因库以替代占大量土地的茶树资源圃。

2.3 基因工程的应用

基因工程是采用类似工程设计的方法，按照人类的特殊需

要，将具有遗传性的目的基因（DNA片段）在离体条件下进行剪切、组合、拼接（需要工具酶），在将人工重组的基因（重组DNA），通过载体（微生物质粒、噬菌体和病毒）导入受体细胞，进行无性繁殖（克隆），并使目的基因在受体细胞中高速表达，产生出人类所需要的产品或组建成新的生物类型。

相对于酶技术等其它生物技术而言，基因工程技术在茶业上的应用较滞后，目前还处于基因组DNA提纯和鉴定阶段，还未见有关转基因茶树新品种育成的报道。不过，由Williams等^[35]（1990年）创建的RAPD（Randomly Amplified Polymorphic DNA）分子标记技术，因其具有快速、简便、高效、大容量等特点，近年来在茶树遗传育种研究方面十分活跃。利用RAPD技术进行亲缘关系鉴定方面，Wachair FN等^[36-38]研究了属于茶、普洱茶和尖萼茶等38个无性系的遗传多态性，他们认为来自中国的茶和柬埔寨的尖萼茶类型内的变异变化比印度的普洱茶大。陈亮等^[39]对中国的5份茶树优质资源进行了RAPD分析，其多态性达84.9%。这项研究表明中国茶树具有丰富的遗传多态性，这与我国是茶树的原产地和起源中心有密切的关系。梁月荣等^[40]应用RAPD分子标记分析“晚绿”品种的杂交亲本结果表明：包括“静在16”在内的4个供试品种都不是“晚绿”的真正父本，同时证明了不同生态条件下生长的同一无性系茶树品种的基因组DNA具有遗传保守性。目前，RAPD技术已在茶树遗传育种研究中得到广泛应用，亲子鉴定研究^[41]，品种识别^[42]，连锁遗传图谱构建^[43]以及茶树品种资源的评价^[44, 45]等。AFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）是从RAPD技术发展来的一种较先进分子标记技术，AFLP其特点是把RFLP和PCR结合了起来。既具有RAPD自动化程度高，操作简单，不受时间、地点、环境等因素的干扰的优点外，同时又克服了RAPD标记只作为显性标记的缺点，可提供更多的共显性标记。这项技术在茶树育种研究上已开始应用，Paul等（1997）^[46]利用AFLP分子标记技术研究揭示了印度与肯尼亚茶群体之间的多样性与遗传差异。

植物育种中分子标记辅助选择是通过分析与目的基因紧密连锁的分子标记来进行目的基因的定位和追踪。利用这一技术已对茶树萌芽期^[47, 48]、茶氨酸含量^[47, 49]、茶多酚含量^[47]、抗炭疽病^[47, 50]、抗寒性^[47, 51]及叶色深浅等目的基因都进行了连锁的分子标记，为进一步克隆和转移这些目的基因奠定了科学基础。

至于有关基因克隆研究，奚彪等（1997）^[52]和Matsumoto, S等（1998）^[53]分别利用农杆菌介导成功地进行了茶树遗传基因的转化。据陈亮等报道^[54]：目前咖啡碱合成的关键酶基因和在茶叶香气形成过程中起重要作用的 β -D-葡萄糖苷酶及 β -樱草糖苷酶基因的克隆正在研究中，这些研究将为茶树基因工程育种，从根本上解决茶叶产质量问题提供了理论依据和应用基础。

2.4 发酵工程的应用

发酵工程是生物工程技术的重要组成部分，是生物技术产

业化的重要环节,是一门利用微生物的生长和代谢活动来生产各种有用物质的工程技术。由于它以培养微生物为主,所以又称为微生物工程。

发酵工程技术是应用于茶业上最早的生物技术,我国传统的黑茶加工中的渥堆过程就是通过微生物分泌的胞外酶及释放的生物热,促使茶叶中内含物发生复杂的变化,从而形成黑茶特有的品质风味。目前对黑茶的发酵技术已有了较深入的研究,温琼英(1990, 1991)^[55, 56]和刘作易等(1991, 1993)^[57, 58]探讨了制茶过程中微生物的优势菌种及演变规律与生长繁殖的最适环境条件及其与成茶品质的关系。王华夫等(1991)^[59]通过无菌渥堆与传统渥堆处理的比较研究结果表明:黑茶在无菌渥堆处理中,是以使脂质等自动降解的湿热作用为主;而在传统渥堆处理中,能产生萜烯醇类化合物及酚类化合物的微生物作用较为突出,这样便赋予了黑茶以特征香气。

近年来,利用食用菌及有益微生物发酵开发具有特殊风味及营养保健功效的新型茶叶制品也受到了人们的重视,并对其加工过程中微生物种群的变化及发酵微生物的分离与鉴定进行了研究。如阿波番茶^[60]、石茶^[61]、红茶菌^[62]、茶酒^[63]等。苏树盛(1996年)^[64]利用发酵技术发明了一种真菌营养保健茶,这种茶以一般茶叶为主料,接种食用真菌进行菌丝培养,然后将带菌丝体的茶叶按常规加工方法进行低温烘焙,即得营养丰富的真菌保健茶成品。医学研究证明:低聚糖对人体具有改善消化系统功能、降压降脂、增强机体免疫力及延缓衰老等保健功能,1999年王振康等^[65]利用发酵技术研制的灵芝菌茶和川杰菌茶富含低聚糖,是一类很有开发前景的新型茶类。

红茶饮料加工中传统的提制法存在制率低品质较差等诸多问题,后来尝试以茶鲜叶(萎凋叶或发酵叶)榨汁直接进行红茶饮料的生产。结果表明:同传统的工艺相比,采用鲜叶榨汁法生产红茶饮料,不仅能简化工艺、降低成本、提高制率,而且所制产品具有新鲜的茶味感、汤色明亮和耐热性好,其缺点在于难以从茶鲜叶中获取多酚氧化酶,茶渣中残留的许多有效成分和酶类不能被充分利用,这样对红茶饮料的品质带来一些不利的影响。为了解决这些问题,1999年夏涛等^[66]采用发酵工程原理,建立了茶鲜叶匀浆悬浮发酵(简称悬浮发酵)体系,并从工艺学及红茶品质形成机理角度进行了相应的基础研究。寻找到了能真实反映悬浮发酵过程中红茶品质变化规律的工艺监测参数,为悬浮发酵生产红茶饮料并实现品质在线控制奠定工艺基础。

在茶的综合利用方面,毛清黎等^[67]利用茶叶下脚料固体发酵技术生产出的果胶酶和纤维素酶不仅活性高且抗酚性强成本低,特别适于酶法制茶工艺应用。用茶叶下脚料还可发酵生产木糖酶和过氧化物酶等多种酶制剂^[68]。用固体发酵法可从速溶茶废料制取高蛋白质饲料^[69]。

3 我国茶叶生物技术研究的发展

茶树是多年生作物,基因工程及细胞工程等生物技术在茶树遗传育种研究方面的应用具有广阔的前景,它将大大缩短茶树育种时间,提高茶树育种效率,对茶叶生产的发展具有重要作用。因此,应加快这方面的研究步伐。虽然,目前茶树转基因育种研究相对落后,但可借鉴其它转基因作物的相关技术,并充分利用通过 RAPD 分子标记已获得的茶树目的基因成果,以加速这方面的研究。对于茶树转基因育种目标,除了考虑产质量及抗性外,还应十分重视儿茶素及茶氨酸等营养保健功能成分含量,以适应现代市场经济发展的需要。

茶氨酸是茶叶的特征氨基酸,近年的医学研究表明:它不仅具有缓解人体紧张、消除疲劳增进思维的功能,还具有明显的降压功效,其降压作用是儿茶素及色氨酸的 10-15 倍^[70]。它将成为继儿茶素以后的又一研究热点。那么,在进一步完善儿茶素的细胞发酵生产技术研究并促进其产业化发展的同时,茶氨酸的细胞培养生物合成研究将成为细胞工程在茶业上应用研究的新课题。

农残是制约我国茶叶出口的主要因素,特别是 2000 年 7 月 1 日欧盟实施农残新标准后,问题更加严重,茶叶降残就成为了我国茶叶科研急需解决的一大难题^[71]。农残的来源主要是农药的直接施用及土壤的污染,具研究后者将近占农药污染的 70%。那么,要达到茶叶降残的目的,除采取常规的技术和管理措施外,利用现代生物技术至少有三条途径很值得研究:1) 茶树抗病虫转基因育种研究;2) 发酵生产高效无毒或低毒农药研究;3) 研制高效茶树降残菌肥。

酶技术是一条解决茶叶品质问题及开发茶叶新产品的有效途径,利用酶的高效生物催化性及特异性,几乎可按照人们的意愿“塑造”茶叶品质,这是被科学理论和科研实践都证明的事实。为了使该技术在茶叶生产中推广应用,发挥其应有的经济效益,需从以下几方面充实和完善:首先,要加快适于茶叶加工应用的酶源微生物的分离筛选研究,特别是对多酚氧化酶及 β -葡萄糖苷酶等几种目前还没有找到合适产酶微生物的研究更应重视,在选育时还要注意安全性(最好从现有的 GRAS 菌中筛选)和抗酚性(因茶多酚对酶有一定的抑制性)两个问题;另外,不同的茶类不同的加工方法,工艺过程提供的生化环境各异,具体应用时,还需研究相关的配套工艺技术参数,以利充分发挥酶技术增质效果。

通过基因工程技术研究确定儿茶素和茶氨酸等茶叶保健功能成分的目的基因,并将其转入某些工程菌,然后,采用发酵工程技术高效生产。这种基因工程和发酵工程等各大生物工程技术的综合研究,将为茶叶保健功能成分的开发利用开辟辉煌的前景。

我国是茶叶的发源地,是世界产茶大国,但与世界茶叶先进水平相比,仍有很大的差距。我们要充分利用世界生物技术迅猛发展的契机,重视茶叶生物技术研究,利用现代生物技术,促进我国传统茶业的改革及产业化,实现我国茶业

“高产高质高效低耗 (三高一低)”的可持续发展战略,巩固和提高我国茶叶的国际地位及市场竞争力。

参考文献

- BIO Guide to Biotechnology (Feb. 2000) <http://www.bio.org/aboutbio/guide2000/guide00-toc.html>.
- G. W. Sanderson and W. S. Simpson; U. S. Patent 3,787,582; January 22, 1974.
- Y. Takino; U. S. Patent 3,959,497; May 25, 1976.
- 施兆鹏茶叶通讯,1980 (4):22~26.
- 毛清黎,贾海云,谭正初等,中国茶叶,1991 (4):8~9.
- 毛清黎,彭继光,贾海云等,茶叶通讯,1991 (1):1~6,50.
- 毛清黎,彭继光,贾海云等,茶叶通讯,1991 (2):9~12,23.
- 毛清黎,彭继光,贾海云等,茶叶通讯,1992 (1):24~28.
- 谭正初,毛清黎,贾海云等,福建茶叶,1990 (2):18~21,17.
- 加藤みゆき等,日本农芸化学会,1987 61 (6):599~601.
- Marimuthu S and Manivel L.J. Plant Crops 1997 (4):14~18.
- 游小清,王华夫,茶叶科学,1994,14 (1):70.
- 曾晓雄,罗泽民,食品工业科技,1993 (6):24~27.
- 毛清黎,韩雅珊,食品科学,2001,22 (3):13~16.
- 曾晓雄,茶叶通讯,1989, (3):42~44.
- Takino Yoshinori (CoCo-Cola Co) US, 3,959,497 (Cl. 426~52; A23F3/00), 1976~05~25.
- 程琦等,生物化学杂志,1996,12 (4):423~426.
- 李荣林,方辉遂,茶叶科学,1997,17 (增刊):147~154.
- 青木智,日本作物,学会记事 1985 54:235~240.
- 小林,利彰,渥美和彦,静岡茶试研技,1993,17 49.
- 成浩等,茶叶科学,1993,13 (2):109~114.
- 成浩,王玉书,杨素娟等,茶叶科学,1994,14 (1):31~36.
- 成浩,王玉书,杨素娟等,中国茶叶,1995, (4):2~4.
- 成浩等,茶叶科学,1995,15 (2):111~116.
- 成浩,杨素娟,王玉书等,茶叶科学,1996,16 (1):75~76.
- Phukan M. K and Mitra G. C Current Science, 1984 53 (16):874~876.
- Arulpragasam, P. V. and Latiff, R. S. L. J. Tea Science, 1986, 55 (1), 44~47.
- 中村顺行(Nakamura, Y) 静冈县茶业试验场研究报告 1987, 13 23~27.
- Sarathchandra and Arulpragasam S. L. J. Tea Science, 1990, 59 (2):62~64.
- Kato, M Japan J. Breed, 1985, 35, 317~322.
- 中村顺行, (Nakamura, Y) 茶业研究报告,1989,70,41~49.
- 刘德华,廖利民,福建茶叶,1989 2,13~16.
- 中村顺行, (Nakamura, Y) 茶业研究报告,1991,74,31~38.
- 孙仲序等,茶叶科学,2000,20 (2):129~132.
- Williams J. G. K, Kubelik A. R, Livak K. J et al. Nucl Acid Res 1990, 18, 6531~6535.
- Wachira, F. N, Waugh, R., Hackett, C. A et al Genome, 1995, 38, 201~210.
- Wachira, F. N Tea, 1996, 17 (2), 60~68.
- Wachira, F. N Tea, 1997, 18 (1), 11~20.
- 陈亮,虞定莲,杨亚军,茶叶科学,1999,19 (1),13~16.
- 梁月荣等,茶叶科学,2000,20 (1):22~26.
- 田中淳一,山口聪,野菜茶业试验场研究报告, (茶业), 1996, 9, 31~36.
- 田中淳一,山口聪,育种学杂志,1995,45 (1):241.
- 田中淳一,泽井右典,山口聪,育种学杂志,1995,45 (2), 198.
- 陈亮,高康,杨亚军,茶叶科学,1998,18 (1),16~20.
- 陈亮,陈大明,高其康,茶叶科学,1997,17 (2),177~181.
- Paul, S Wachira, F. N Theor Appl Genet, 1997, 94 (2), 255~263.
- 田中淳一,茶业研究报告,1996,84 (另册) 44~45.
- 田中淳一,涂木裕一郎,山口,茶业研究报告,1996,84 (另册) 47~49.
- 田中淳一,渡部育夫,茶业研究报告,1996,84 (另册) 46~47.
- 涂木裕一郎,田中淳一,伊藤阳子,茶业研究报告,1996,84 (另册) 50~51.
- 大前英,田中淳一,茶业研究报告,1996,84 (另册) 52~53.
- 奚彪等,茶叶科学,1997,17 (增刊),155~156.
- Matsumoto, S Fukui, M JARQ, 1998, 32 (4), 287~291.
- 陈亮,杨亚军,茶叶文摘,1999 (5):1~6.
- 温琼英,中国茶叶,1990, (6):2~3.
- 温琼英,刘素纯,茶叶科学,1991,11 (增刊):10~16.
- 刘作易等,西南农业学院学报,1991,4 (1):73~77.
- 刘作易,贵州茶叶,1993, (2):33~35.
- 王华夫,李名君,茶叶科学,1991,11 (增刊):42~47.
- Indrati R Hurishima Daigaku Seibutsu Seisangakubla Kiyo, 1990, 29 (1):1~9.
- 冈田早苗,日本食品科学工学会志,1996,43 (1):12~20.
- 冈田早苗,日本食品科学工学会志,1996,43 (2):1019~1027.
- Sievers, M. et al, Systematic and Applied Microbiology, 1996, 18 (4), 590~594.
- 苏树盛, CN1118657A 专 1996 3 20.
- 王振康,王秀萍,严兰芬,中国茶叶,1999 (4):24.
- 夏涛,高丽萍,茶叶科学,1999,19 (1).
- 毛清黎,彭继光,贾海云等,茶叶通讯,1991 (4):14~18.
- Kokhreidze N. G, Applied Biochemistry and Microbiology, 1993, 29 (2), 169~173.
- 范代忠,贵州茶叶,1993, (2):1~4.
- 陈宗懋,中国茶叶,1997, (2):27.
- 徐永成,茶报,2000, (2):25~26.