

# 产茶叶碱和咖啡碱的重组基因工程菌及其构建方法及应用

金彦羽

云南农业大学 农学与生物技术学院

DOI:10.12238/as.v8i11.3493

**[摘要]** 茶叶碱与咖啡碱作为重要的天然生物碱,在医药和食品工业中需求广泛,传统生产依赖于植物提取,该方式受限于季节、资源及环境压力。采用基因工程技术构建高效菌株生产这两种生物碱,是解决传统生产方式瓶颈的重要途径。重组基因工程菌具备遗传背景清晰、可操作性强及利于规模放大等优势。研究聚焦于开发一种能同时高效合成茶叶碱和咖啡碱的重组工程菌株,旨在突破天然来源限制,建立环境友好且高效可控的生物制造新路线,为相关产业提供可持续的物质基础支撑。

**[关键词]** 重组基因工程菌; 茶叶碱合成; 咖啡碱生产; 生物技术应用

中图分类号: F304 文献标识码: A

## Recombinant genetically engineered bacteria for producing theanine and caffeine, and construction method and application thereof

Yanyu Jin

Yunnan Agricultural University College of Agronomy and Biotechnology Kunming

**[Abstract]** As important natural alkaloids, theanine and caffeine are widely needed in medicine and food industry. Traditional production depends on plant extraction, which is limited by seasons, resources and environmental pressures. It is an important way to solve the bottleneck of traditional production methods to construct efficient strains to produce these two alkaloids by genetic engineering technology. Recombinant genetically engineered bacteria have the advantages of clear genetic background, strong maneuverability and easy scale-up. The research focuses on the development of a recombinant engineering strain that can simultaneously and efficiently synthesize theanine and caffeine, aiming at breaking through the limitation of natural sources, establishing a new route of environmentally friendly and efficient bio-manufacturing, and providing sustainable material support for related industries.

**[Key words]** recombinant genetically engineered bacteria; Alkali synthesis of tea; Caffeine production; Biotechnology application

### 引言

重组基因工程菌是经定向遗传修饰、具有特定代谢途径的工程化微生物系统。利用其生产茶叶碱与咖啡碱的核心优势在于代谢路径可控优化以及发酵工艺规模化潜力。宿主菌选择需兼顾生长速度、产物耐受性及遗传可塑性,如大肠杆菌或酵母菌常用于此类研究。目的基因源于植物或微生物中编码咖啡因合成酶(如咖啡碱合成酶)或茶碱转化相关酶系的基因片段。阐明关键酶基因功能及其在合成途径中的调控作用,为构建高效合成细胞工厂提供依据。

### 1 产茶叶碱和咖啡碱的重组基因工程菌概述

#### 1.1 基因工程菌的定义和特点

基因工程菌指经分子生物学技术改造获得异源代谢途径的微生物体系,其在生物碱合成领域展现显著优势。这类菌株通过

引入外源酶基因重建或优化天然合成路径,突破传统植物提取的周期限制与资源依赖。遗传背景明确的工程菌具有代谢通量定向调控的潜力,便于采用发酵工艺实现茶叶碱和咖啡碱的连续高效合成。细胞工厂概念赋予工程菌可预测的代谢行为与环境可控性,同时降低副产物积累干扰。工程化菌株的代谢网络调整可针对性地提高黄嘌呤衍生物转化效率,其发酵周期缩短显著提升了生产经济性。规模化培养中稳定的遗传特性与适应性进化潜力进一步保障工业化应用的可行性<sup>[1]</sup>。

#### 1.2 重组基因工程菌的选择依据

宿主筛选需综合考量生理特性与工程适配度,大肠杆菌系统因遗传操作成熟、生长快速成为典型选择,酵母宿主则凭借真核表达优势利于复杂酶功能实现。宿主细胞须具备基础嘌呤代谢能力及产物耐受性,避免合成路径与内源代谢冲突。目标基因

来源于茶树咖啡碱合成酶基因簇,涉及关键甲基转移酶与N-脱甲基酶编码序列,其功能决定前体黄嘌呤向目标产物的转化特异性。基因选型侧重催化效率与宿主兼容性,咖啡碱合成酶需识别7-甲基黄嘌呤底物完成甲基化反应,而茶叶碱形成依赖黄嘌呤氧化酶对1,3-二甲基黄嘌呤的特异性修饰。多酶共表达体系需解决辅因子再生问题,适配宿主氧化还原稳态确保催化循环可持续性。启动子强度与质粒拷贝数的精细调控直接影响终产物积累水平。

## 2 重组基因工程菌的构建方法

### 2.1 目的基因的获取

产茶叶碱与咖啡碱所需的关键酶基因主要源于植物基因组资源,茶树咖啡碱合成酶基因(如CaMXMT)及黄嘌呤氧化酶编码序列是核心目标片段。植物组织RNA提取后经反转录获取cDNA模板,设计特异性引物进行PCR扩增产生足够拷贝的目的片段。需注意引物设计需包含适配限制性内切酶位点,便于后续克隆操作。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离纯化,胶回收试剂盒处理后获得高纯度基因片段。对于部分甲基转移酶基因,必要时采用基因合成技术获得密码子优化序列,从而增强其在原核宿主中的表达效率<sup>[2]</sup>。功能验证通常先行于异源表达系统,譬如将候选基因克隆至原核表达载体测试催化活性,避免后续构建中的无效表达风险。

### 2.2 载体的选择和构建

表达载体的适配性直接影响基因工程菌的代谢效率,需协同考量启动子强度、选择标记及复制子特性。下表归纳关键载体选型要素:

表1 重组表达载体的核心功能组件选型原则

组件类型	功能要求	代表性元件
启动子	诱导型调控且转录效力强	T7/lac、araBAD
选择标记	与宿主抗生素耐药性匹配	Amp <sup>r</sup> 、Kan <sup>r</sup>
复制子	拷贝数稳定性与负载能力平衡	pUC ori (高拷贝)
多克隆位点	兼容目的基因酶切位点	MCS区域≥6种酶切位点
融合标签	可选的纯化辅助模块	His-tag、GST-tag

载体构建始于质粒骨架线性化,采用限制性内切酶双酶切处理避免自连。纯化的载体骨架与目的基因片段在DNA连接酶作用下完成定向连接,连接产物转化至感受态细胞进行初步扩增。重组质粒经菌落PCR初步验证后,需进行测序分析确保基因序列完整无误读,同时确认开放阅读框与载体读码框相位一致。

### 2.3 宿主菌的转化

宿主细胞的生理状态决定转化效率,制备感受态细胞需严格把控对数生长期收获时机。大肠杆菌体系中,化学转化法依赖氯化钙处理增加细胞膜通透性,热激环节的温度梯度与时长需

经验性优化。电穿孔转化适用于较大质粒或难转化宿主(见图1),电场强度设定在12-15 kV/cm区间,脉冲时间精确至毫秒级可维持细胞存活率。转化混合液复苏阶段采用丰富营养培养基,振荡培养促进膜结构修复及抗性基因表达。针对酵母宿主如毕赤酵母,原生质体转化或醋酸锂法需辅以细胞壁消化酶预处理,转化子再生培养需添加渗透压稳定剂维持结构完整。



图1 btx gemini x2细胞/活体电穿孔转化仪

### 2.4 重组基因工程菌的筛选和鉴定

转化产物涂布于含对应抗生素的平板,培养后通过菌落形态初筛潜在阳性克隆。蓝白斑筛选适用于含lacZ $\alpha$ 基因的载体系统,重组子因插入片段中断 $\beta$ -半乳糖苷酶活性呈现白色菌落特征。基因型验证首先采用菌落PCR技术,特异性引物扩增可确认目的基因整合情况。阳性克隆扩大培养后提取质粒进行限制性酶切分析,片段大小与理论值比对确定载体完整性。必要阶段实施基因测序检测点突变或移码风险,转录水平评估依赖RT-PCR检测目标mRNA表达丰度。功能验证需在发酵体系中添加前体物质(如7-甲基黄嘌呤),采用HPLC检测终产物积累量直接反映工程菌活性,代谢组学分析可追溯中间产物转化效率以修正代谢瓶颈。

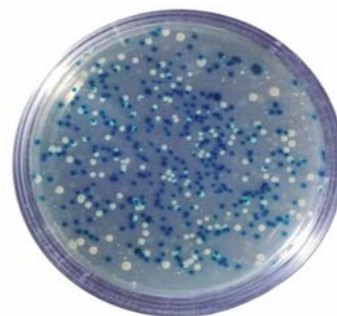


图2 蓝白斑实操图

## 3 重组基因工程菌的培养和发酵条件优化

### 3.1 培养基的选择和优化

工程菌生长与产物合成强烈依赖于培养基组分的精准配比,碳源类型深刻影响菌体代谢流向。葡萄糖虽可快速满足生物量增殖需求,但高浓度却易引发代谢抑制,需要采用梯度优化补给策略。复杂碳源如甘油能延缓发酵酸化并提供稳定能量供应,适用于生产阶段的碳架供给。有机氮源酵母浸粉富含核苷酸

前体,协同蛋白胨提供必需氨基酸,强化甲基转移反应效率。微量元素组合中,镁离子作为激酶辅因子不可或缺,铁锰复合物对氧化还原酶活性具有稳定作用。营养缺陷型宿主需专项补充特定生长因子,前体物质黄嘌呤衍生物的脉冲添加可减少代谢分流促进终产物定向累积。

### 3.2 培养条件的研究

发酵罐内物理参数存在动态耦合关系,温度设定需权衡酶活性峰值与蛋白变性阈值选择折中点。大肠杆菌体系在37℃生长最佳而产物合成期宜降至30℃维持膜结构完整性。pH反馈调节系统通过氨水与酸液自动滴定将氢离子浓度控制在6.8-7.2狭窄区间,该范围保障甲基转移酶空间构象稳定。溶氧水平利用级联转速调控结合进气氧浓度补偿,维持30%饱和度避免氧化磷酸化解耦导致的能荷失衡。剪切力敏感型菌株需采用叶轮低转速与挡板组合设计,泡沫控制依赖生物消泡剂与机械消泡耙协同作用。分批培养阶段与生产阶段环境参数的差异化设定要求自动化程序无缝切换<sup>[3]</sup>。

### 3.3 发酵过程的控制

代谢稳态监测依赖多参数在线传感系统,生物量浊度探头与尾气二氧化碳分析联动判断菌体代谢活性曲线。底物浓度质谱检测器实时反馈前体消耗速率,据此进行指数流加补料维持生长限制状态。产物积累期需识别二次生长拐点调整氮源供给模式,磷酸盐浓度抑制策略可有效阻断旁路代谢。基于代谢流动态学模型实施的补料分批发酵,依据细胞比生长速率调控碳源脉冲频率防止乙酸盐过量累积。连续发酵模式采用两级反应罐串联体系,第一罐调控细胞高密度增殖而第二罐专设产物合成最优条件。发酵终止时机根据产物比生产速率下降点确定,避免无效培养周期增加成本负担。

## 4 重组基因工程菌的应用

### 4.1 茶叶碱和咖啡碱的生产

工程菌发酵系统提供稳定可控的生物碱生产平台,彻底摆脱植物资源季节性限制与化学合成污染问题。发酵罐级联放大需重点解决氧传递效率与散热均匀性矛盾,高密度培养采用指数补料技术将生物量提升至植物提取无法企及的浓度基准。生产流程整合酶诱导时机控制策略,在菌体对数生长后期添加IPTG启动目标酶高效表达,同步脉冲前体物质7-甲基黄嘌呤强化甲基化反应进程。下游处理阶段采用膜分离与离子交换层析联用技术,利用生物碱两性电解质特性实现茶叶碱与咖啡碱梯度分离。色谱纯化过程中流动相pH精准控制可区分两者解离常

数差异,结晶干燥环节低温真空条件最大限度保留生物活性。工艺验证数据表明工程菌发酵周期可比传统方法缩短三分之二,产物杂质谱显著简化减轻药品监管合规压力。

### 4.2 其他应用领域的探索

医药领域生物碱价值延伸颇具想象空间,茶叶碱长效缓释制剂通过肺泡毛细血管快速吸收发挥支气管扩张功能,其腺苷受体拮抗特性为慢性阻塞性肺病提供新治疗方案。咖啡碱中枢神经刺激作用在抗疲劳药物开发中持续受到关注,微胶囊包埋技术改善口服生物利用度同时降低胃肠刺激风险。功能性饮料创新聚焦天然来源生物碱优势,工程菌合成咖啡碱经环糊精包合后苦味阈值改善三倍以上,更适配运动饮料适口性要求<sup>[4]</sup>。化妆品应用依托黄嘌呤衍生物的脂质过氧化抑制能力,茶叶碱脂质体透皮系统经皮吸收效率提升证明其自由基清除活性。近期研究发现咖啡碱可协同水杨酸增强角质层代谢速率,为抗衰老产品开发开辟跨学科技术融合路径。工业领域将废弃咖啡因转化为高附加值化学品尝试初显成效,化学-酶法催化制备茶碱乙酯技术可能创造新市场增长点。

## 5 结语

构建高活性产茶叶碱与咖啡碱的重组基因工程菌,需系统整合宿主选择、基因精准编辑、发酵工艺适配及产物提纯策略。工程菌构建依赖目的基因的高效克隆与稳定表达载体的构建,转化过程需优化选择压力与筛选标记确保重组子活性。发酵条件精细化调控直接决定产率,涵盖碳氮源配比、环境参数精确控制及动力学代谢反馈调节。后续应用需拓展其生产稳定性和经济性评估,同步探索工程菌在功能食品添加剂、中枢神经系统药物前体制备等高附加值领域的深度开发潜力。

### [参考文献]

- [1]李欣颖,王晶晶,魏春.基因工程技术生产重组乳铁蛋白的研究进展[J].发酵科技通讯,2025,54(03):130-134+153.
- [2]王天云,贾岩龙,杨赞.基因工程[M].化学工业出版社,2023.07.390.
- [3]栗银婕.产番茄红素基因工程菌重组酶的互作及在乳糖检测中的初步研究[D].青岛大学,2021.
- [4]焦学诗玛,周文煊,陈文欣,等.重组醇脱氢酶基因工程菌的构建[J].台州学院学报,2020,42(03):29-34.

### 作者简介:

金彦羽(2001--),男,汉族,浙江温州人,本科在读,学生,研究方向:生物技术。