

# 番茄红素的生产工艺研究进展

王永生 袁其朋\*

(北京化工大学化学工程学院 北京 100029)

**摘要:** 综述了番茄红素的物理化学性质、生理功能, 并对番茄红素的生产工艺, 天然提取法和利用基因工程菌发酵法作了介绍。

**关键词:** 番茄红素, 生产, 生理功能

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0060-05

番茄红素 (lycopene) 是一种重要的类胡萝卜素。在自然界中主要存在于番茄、西瓜、红色葡萄柚以及红色棕榈油中; 在人体中番茄红素分布在血清以及组织中。近年来的研究表明番茄红素具有很多重要的功能: (1) 在所有的类胡萝卜素中, 它具有最强的消除单线态氧的功能, 其对单线态氧的消除能力是  $\beta$ -胡萝卜素的两倍<sup>[1]</sup>; (2) 清除自由基的能力也优于其它类胡萝卜素<sup>[1]</sup>; (3) 具有抗氧化作用, 可以减缓低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化, 从而防治动脉硬化<sup>[2]</sup>; (4) 能有效抑制癌细胞的繁殖<sup>[3]</sup>。因而番茄红素在食品、化妆品以及医药领域有重要的应用。

## 1 番茄红素的物理化学性质

1873 年 Hartsen 首次分离得到番茄红素; 1903 年 Schunck 正式将这种与其它类胡萝卜素相比具有不同的吸光度的物质命名为番茄红素; 1910 年, Wilstatter 和 Escher 测定了番茄红素的分子式; 1930 年 Karrer 等人公布了番茄红素的分子结构。

番茄红素的分子式为  $C_{40}H_{56}$ , 分子量为 536.88; 针状深红色晶体 (从二硫化碳和乙醇混合液中的析出物); 熔点为  $174^{\circ}\text{C}$ , 可燃; 易溶于二硫化碳 (1g/50mL)、沸腾乙醚 (1g/3L)、正己烷 (1g/14L,  $0^{\circ}\text{C}$ ), 溶于氯仿和苯, 微溶于乙醇和甲醇, 不溶于水; 无毒。

番茄红素在自然界中主要以全反式结构存在, 是一种具有 11 个碳碳共轭双键的不饱和脂肪族烯烃 (图 1)。番茄红素具有两大特点。(1) 易氧化性。光照、与氧接触、pH 降低以及表面活性剂的作用均可使番茄红素降解, 而且温度的升高会加速降解; (2) 异构化性。番茄红素有 72 种顺式异构体结构。顺式结构与反式结构相比, 物理化学性质的差异主要包括熔点的降低和消光系数的减小等, 特别是消光系数的减小对于番茄红素的定量分析有一定的影响。

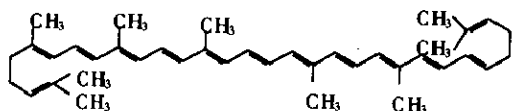


图 1 番茄红素的全反式结构

## 2 番茄红素的生理功能

番茄红素是一种脂溶性类胡萝卜素, 与 (-)-胡萝卜素相比, 它不是维生素 A 的前体, 因而对番茄红素的早期研究主要集中在它的对热稳定性上。但随着人们对番茄红素生

\* 联系人

收稿日期: 2001-03-29, 修回日期: 2001-06-29

理功能的认识,番茄红素的研究逐渐成为热点。1989 年 Di Mascio 等发现番茄红素在所有的类胡萝卜素中具有最强的消除单线态氧的作用<sup>[1]</sup>;1995 年 Levy 等报道,与  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素相比,番茄红素对癌细胞的生长具有更强的抑制作用<sup>[3]</sup>。

**2.1 防癌、抗癌的作用** 近年来关于番茄红素具有防癌、抗癌功能的报道越来越多。1994 年 Franceschi 等报道了食用大量的番茄可以防癌<sup>[4]</sup>;1999 年,在 Giovannucci 的综述中提到番茄红素对肺癌、胃癌、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌等癌症均有抑制作用<sup>[5]</sup>;美国哈佛药物学校和哈佛公众健康学校经过 6 年对 47894 名男性作跟踪调查表明在 46 种水果和蔬菜中,只有番茄产品对前列腺癌具有统计学意义上的抑制作用。虽然番茄红素对癌细胞繁殖的抑制作用在体外和动物的实验中均得到证实,但人们依然不十分清楚它的抗癌机理。现在普遍认为番茄红素的抗氧化作用、消除自由基、对细胞间信息传递的诱导作用以及对肿瘤细胞的调控可能是抗癌作用的潜在机理。

**2.2 防治血管硬化和冠心病作用** 流行病学、临床医学、以及生化研究表明血清中低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化可能会造成动脉硬化,因而如何防止低密度脂蛋白氧化成为人们研究的热点。研究表明番茄红素的抗氧化作用可以减缓动脉硬化的进程,它通过阻止低密度脂蛋白氧化物的形成从而防止血管硬化,同时番茄红素也阻止 DNA 和脂蛋白的氧化作用,所以它在防治动脉硬化疾病过程中起重要作用,流行病学研究表明通过日常饮食所摄入的类胡萝卜素 (特别是番茄红素) 对减小冠心病的发病率和死亡率起重要作用,而且血清和脂肪组织中番茄红素的浓度和冠心病发病率呈负相关性<sup>[2]</sup>。

3 番茄红素的生产工艺

鉴于番茄红素具有防癌、抗癌以及防治心脑血管疾病等功能,研究人员在深入研究其治病机理的同时,也在努力开发番茄红素的生产工艺。迄今为止,已见于报道的生产工艺包括天然提取法和基因工程菌发酵法。

**3.1 天然提取法** 1) 有机溶剂萃取 番茄红素是一种脂溶性的类胡萝卜素,因而可利用它的溶解特性从番茄或番茄产品的废弃物中提取粗产品,再采用一些高精度的分离手段将其纯化。同时,这种方法也应用于发酵法后处理工艺中。一般以石油醚、丙酮或其他有机溶剂为萃取剂,其大致过程:萃取→滤液→饱和的氯化钠溶液洗涤→10%的碳酸钾溶液→水洗涤→硫酸钠干燥→真空浓缩。这样所得的粗产品主要包括番茄红素和其它类胡萝卜素。其纯化过程可采取柱层析和半制备高效液相色谱等技术。James Goodrich 等<sup>[6]</sup>采用柱层析技术从番茄中提取番茄红素。Sari. H. Hakala 等<sup>[7]</sup>报道了采用色谱技术的精制工艺。其结果见表 1。

表 1 番茄红素在不同纯化步骤的收率和纯度

| 纯化步骤      | 番茄红素的收率 (mg/100g) | 番茄红素的纯度 (%) | 顺式结构的比例 (%) |
|-----------|-------------------|-------------|-------------|
| 石油醚萃取     | 30                | 87          |             |
| 固相萃取      | 21                | 93          | 13          |
| HPLC 一次纯化 | 9                 | 95          | 15          |
| HPLC 二次纯化 | 7                 | 95          | 18          |
| HPLC 三次纯化 | 6                 | 97          | 20          |

从表中可以看出,这种方法的纯度高,但是收率比较低。因而找到合适的精制方法是分离纯化过程的关键。2) 超临界萃取 孙庆杰等<sup>[8]</sup>以新疆番茄厂的副产品 (番茄皮

和番茄籽)为原料,采用超临界萃取生产番茄红素。当萃取压力在  $1.5 \times 10^6 \text{ Pa} \sim 2.5 \times 10^6 \text{ Pa}$ , 温度  $40^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ , 流量  $20 \text{ Kg/h}$ , 萃取  $1 \text{ h} \sim 2 \text{ h}$ , 可提取 90% 以上的番茄红素。1999 年 Cadoni 等人<sup>[9]</sup>亦采用超临界萃取制取番茄红素。他们将番茄皮和籽在  $35^\circ\text{C}$  干燥后, 保存在  $-5^\circ\text{C}$  条件下。把  $2.5 \text{ g}$  样品在压力  $2.45 \times 10^8 \text{ Pa} \sim 3.92 \times 10^8 \text{ Pa}$ 、温度  $40^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$  条件下进行萃取。当萃取条件在  $80^\circ\text{C}$ ,  $3.92 \times 10^8 \text{ Pa}$  时, 93% 的  $\beta$ -胡萝卜素和 84% 的番茄红素从番茄样品中萃取出来, 萃取液中含 65% 的番茄红素和 35%  $\beta$ -胡萝卜素; 进一步优化条件即先在  $40^\circ\text{C}$ 、 $3.92 \times 10^8 \text{ Pa}$  条件下萃取后, 再在  $80^\circ\text{C}$ 、 $3.92 \times 10^8 \text{ Pa}$  条件下进行萃取。最终产品中含 87% 的番茄红素和 13%  $\beta$ -胡萝卜素。

**3.2 基因工程菌发酵法** 由于番茄中的番茄红素含量较低 ( $10 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ), 而且天然提取法价格昂贵, 产率低, 无法满足需求。因而利用微生物发酵生产番茄红素一直是研究人员研究的方向。迄今为止, 能够生产番茄红素的微生物包括能自身合成番茄红素的革兰氏阴性菌 (*Erwinia uredovora* 和 *Erwinia herbicola*)、三孢布拉氏霉菌 (*Blakeslea trispora*)、以及基因工程菌。特别是随着转基因技术的迅速发展, 利用基因工程菌生产番茄红素成为研究的热点。

从 1990 年到 1999 年, 在开发基因工程菌生产番茄红素的过程中, 主要利用的基因工程菌是一些能合成法呢基焦磷酸 (FPP) 的微生物, 因为法呢基焦磷酸不仅是甾醇、多萜醇、醌类化合物的前体, 同时也是合成类胡萝卜素的前体。其合成代谢途径如下:

乙酰 CoA  $\rightarrow$  乙酰乙酰 CoA  $\rightarrow$  3-甲基-3, 5-二羟基戊酸  $\rightarrow$  异戊二烯焦磷酸 (IPP)  $\rightarrow$  牻牛儿焦磷酸 (GPP)  $\rightarrow$  法呢基焦磷酸 (FPP)

研究人员通过对革兰氏阴性菌 (*Erwinia uredovora* 和 *Erwinia herbicola*) 代谢途径的研究发现从法呢基焦磷酸合成番茄红素是由 3 个 *crt* 基因 (*crtE*, *crtB*, *crtI*) 控制的<sup>[10]</sup>, 如图 2 所示。

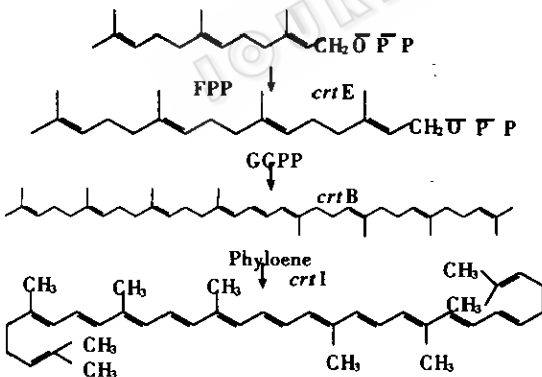


图 2 番茄红素的生物合成途径

因此, 1994 年 Shige-yuki Yamano 等人提出将生物合成番茄红素和  $\beta$ -胡萝卜素的基因 *crtE*, *crtB*, *crtI* 和 *crtY* 插入酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中, 经发酵、提取所得番茄红素的含量为  $113 \mu\text{g/g}$  细胞干重<sup>[11]</sup>; 1998 年 Yutaka Miura 等人报道了将外源基因 *crtE*, *crtB*, *crtI* 通过转基因技术插入产蛋白假丝酵母 (*Candida utilis*) 中, 最后可得番茄红素  $758 \mu\text{g/g}$  细胞干重<sup>[12]</sup>; 同年 Hiroshi Shimada 也采用类似的方法生产番茄红素, 产量可达  $7.8 \text{ mg/g}$  细胞干重<sup>[13]</sup>。1) 通过

酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 生产番茄红素 1993 年, S. Yamano 等<sup>[11]</sup>报道在酿酒酵母 *S. cerevisiae* R7 中插入质粒 Y5143, 该质粒不仅插入外源 *crtE* (GGPP 合成酶), *crtB* (八氢番茄红素合成酶), *crtI* (八氢番茄红素脱氢酶) 和 *crtY*, 还插入上述 4 个基因的启动子和终止子; 这些启动子或终止子基因来源于酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的染色体 DNA。据此构建的基因工程菌可产生红色或黄色的色素。将该工程菌在选择性培养基

(2%的葡萄糖、0.67%的酵母浸膏(不含氨基酸)、20mg/L 精氨酸-盐酸、20mg/L 的组氨酸-盐酸、30mg/L 异亮氨酸、30mg/L 的赖氨酸-盐酸、20mg/L 酪氨酸、20mg/L 的色氨酸、20mg/L 尿嘧啶、pH 为 5.8), 30℃的条件下培养 3d; 通过离心过滤将得到的细胞冷冻干燥, 再加入丙酮, 采用球磨法将细胞破碎; 用丙酮萃取 4 次。最后将丙酮蒸干得到番茄红素。虽然这种生产方法的产率不是很高, 但它为通过基因工程技术改变真核生物细胞的代谢途径生产新的代谢产物提供了新的思路。2) 通过酵母菌 *Candida Utilis* 生产番茄红素 产蛋白假丝酵母 (*Candida utilis*) 是工业生产上应用很广泛的酵母菌, 可以用于生产单细胞蛋白、谷胱甘肽以及 RNA; 但其自身也不能合成番茄红素。但研究发现在该酵母的生长稳定期可以积累大量的麦角固醇。1998 年 Miura 等<sup>[12]</sup> 提出引入外源基因使得合成麦角固醇的碳源能向一个新的路径即合成类胡萝卜素的路径流动的的思路, 这种新的思路为代谢工程在微生物发酵生产番茄红素的理论研究作出了一定的尝试。其大致过程为质粒 pCR16 编码合成番茄红素的基因 (*crtE*, *crtB*, *crtI*), 质粒 pGAPPT10, pPGKPT5 和 pPMAPT1 分别含有上述三个基因的启动子和终止子, 而这三个启动子和终止子分别来源于 *C. utilis* 中编码 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAP), 磷酸甘油酸激酶 (PGK) 和腺苷三磷酸酶 (PMA) 的调控基因, 将上述质粒的基因通过连接插到一个带有抗药性标记的质粒 pCLEB113-2 中, 以酵母菌为宿主, 采用转基因技术构建出生产番茄红素的基因工程菌。将该酵母在 YPD 培养基 (1%的酵母浸膏, 2%的蛋白胨, 2%的葡萄糖, 包括 40mg/L 的放线菌酮), 在 30℃条件下培养 2-3d。菌体内番茄红素的含量约为 758 $\mu$ g/g 细胞干重, 而所产的麦角固醇占非转化菌所产麦角固醇的量的 65%, 这说明了该基因工程菌产生了新的代谢途径, 实现了转基因的目标。

然而, 随着代谢工程概念的拓展, 为了实现目标产物的高产, 寻求能够高效表达目标产物的前体的微生物同样是可行的。1998 年, Shimada 等<sup>[13]</sup> 就进行了有益的尝试 1) 增加代谢流通量, 从而使前体易于转化为目标产物, 2) 减少前体在其他代谢途径上的消耗。

Shimada 等<sup>[15]</sup> 研究发现通过改变  $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基-戊二酸单酰辅酶 A 还原酶和氧化合成酶的活性可达到提高番茄红素含量的目的。这两种酶是合成麦角固醇的限速合成酶。 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基-戊二酸单酰辅酶 A 还原酶是由基因 HMG 编码的; 同时氧化合成酶是由基因 ERG9 编码的。研究人员发现当  $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基-戊二酸单酰辅酶 A 还原酶充分表达时番茄红素的含量达到 2.1mg/g 细胞干重。而打断基因 ERG9 不会造成产量的变化, 但重组子中含断裂 ERG9 基因片段和高表达 HMG 催化区片段的融合体时, 番茄红素产量达到 7.8mg/g 细胞干重。

#### 4 番茄红素研究发展趋势

目前, 以色列、日本、俄罗斯等国家以及罗氏、巴斯夫等跨国公司在番茄红素研究领域具领先地位。以色列 LYCORED 公司多年前就从事番茄红素的开发研究并已取得世界领先地位。该公司制定了一项综合的开发番茄红素的计划, 该计划为一个多学科的、行业与行业相互渗透紧密联系的高新技术工程, 其三个主要基础是: 农业技术、生产加工技术、商业化产品开发及市场。近年来, 我国科技界也开始重视和加强番茄红素的研究开发。1998 年, 无锡轻工业大学采用临界 CO<sub>2</sub> 萃取番茄红素的研究工作取得了一定进展, 还对番茄红素的稳定性等问题进行了研究。但总体而言, 国内对番茄红素的

研究开发刚刚起步, 和国外的差距还很大, 至今国内市场上番茄红素的生产和应用尚属空白。

在本文综述的生产工艺中, 有机溶剂萃取方法的收率低, 溶剂消耗大而且会造成污染; 超临界萃取虽然收率较高, 但要实现工业化可能比较困难, 并且这两种方法受原料的影响较大, 产品质量会受到影响; 采用基因工程菌发酵法生产番茄红素的方法现仍处于小试水平; 但从发展趋势来看, 采用发酵法能降低成本, 污染相对较小; 在优化发酵条件和保证菌株高产的前提下, 可以得到较高的收率, 是实现工业化生产较理想的一条途径。

### 参 考 文 献

- [1] Paolo Di Mascio, Stephan Kaiser, Helmut Sies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1989, **274** (2): 532 ~ 538.
- [2] Sanjiv Agarwal, A Venkatesh Rao. *Lipids*, 1990, **33** (10): 981 ~ 984.
- [3] Levy J, Bosin E. *Nutr Cancer*, 1995, **24**: 257 ~ 266.
- [4] Minhthuy L Nguyen, Steven J Schwartz. *Food Technology*, 1999, **53** (2): 38 ~ 45.
- [5] Giovannucci E, Ascherio A, Rimm E B, *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 1995, **87**: 1767 ~ 1776.
- [6] James Goodrich, Chris Parker, Ruff Phelps. *Journal of Chemical Education*, 1993, **70** (6): 158.
- [7] Sari H Hakala, I Marina Heinonen. *J Agric Food Chem*, 1994, **42**: 1314 ~ 1316.
- [8] 孙庆杰, 丁霄霖. *食品与发酵工业*, 1998, **24** (1): 3 ~ 6.
- [9] Enzo Codone, M Rita De Giorgi, Elena Medda. *Dye and Pigment*, 2000, **44**: 27 ~ 32.
- [10] Norihiko Misawa, Masaya Nakagawa, Kazuo Kobayashi, *et al.* *Journal of Bacteriology*, 1990, **172** (12): 6704 ~ 6712.
- [11] Shigeyuki Yamano, Toshiyuki Ish, Masaya Nakagawa, *et al.* *Biosci Biotech Biochem*, 1994, **58** (6): 1112 ~ 1114.
- [12] Yutaka Miura, Keiji Kondo, Hiroshi Shimada, *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1998, **58** (2&3): 306 ~ 308.
- [13] Hiroshi Shimada, Keiji Kondo, Paul D Fraser, *et al.* *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64** (7): 2676 ~ 2680.