

石彬, 邓小敏. 生物技术合成番茄红素的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2023, 42(4): 244-253.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.04.028

生物技术合成番茄红素的研究进展

石彬¹, 邓小敏²

1. 武汉软件工程职业学院(武汉开放大学), 武汉 430205; 2. 中国热带农业科学院橡胶研究所/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海口 571101

摘要 番茄红素作为一种高价值类胡萝卜素, 具有抗氧化、清除人体自由基、预防心脑血管疾病等生理功能, 被广泛应用于食品、药品等领域。目前番茄红素主要来源于天然番茄提取, 产能不足导致其市场应用受限。而以合成生物学为代表的生物技术为番茄红素的工业生产带来了曙光。本文基于国内外相关文献资料总结了番茄红素的理化性质、生理功能和生产方法, 重点分析了当前利用生物技术生产番茄红素的代谢工程改造策略、发酵和提取方法的最新研究进展, 并对目前番茄红素的合成生物学研究现状进行系统梳理, 最后对未来生物技术生产番茄红素的研究方向及存在问题提出展望, 旨在为番茄红素的生物合成技术研究提供参考。

关键词 番茄红素; 类胡萝卜素; 合成生物学; 解脂耶氏酵母; 三孢布拉霉菌; 代谢工程; 发酵优化
中图分类号 TS202.3; Q819 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2023)04-0244-10

番茄红素是一种重要的类胡萝卜素, 属于萜类家族中的四萜化合物, 在自然界中主要存在于番茄及西瓜、葡萄柚等水果中, 是成熟番茄中的主要色素。番茄红素作为一种强抗氧化剂, 具有抗氧化、抗癌、降血脂等生理学功能, 被广泛应用于保健食品、医药、化妆品等领域^[1-2]。目前番茄红素已被许多国家列为营养增补剂和着色剂而广泛使用^[3]。番茄红素原料全球累计销售额近 20 亿美元(<https://www.industryarc.com/Report/16581/lycopene-market.html>), 并且在逐年增高, 市场前景广阔。

番茄红素生产主要依赖植物提取和化学合成 2 种方法。植物提取法受季节限制, 且植物生长周期较长、产品含量低, 无法保证产品的集约化、规模化生产。化学合成法存在化学试剂残留、多种异构体形式以及环境污染等问题。生物技术合成法具有成本低、周期短、能稳定供应、环境友好、可持续发展等优势, 近年来越来越受到研究人员的重视。

目前生物技术合成番茄红素的研究已取得较大进展, 例如微生物宿主细胞的多样化选择、代谢工程改造途径的研究创新、发酵工艺和放大技术的探索, 使生物技术合成番茄红素的产量有明显提升。然而大多研究还停留在某单一技术领域的突破, 对番茄

红素的生物技术合成的系统性研究和总结较少。

因此, 本文对番茄红素的理化性质、当前生产技术进行综述, 系统总结以合成生物学为代表的生物技术合成番茄红素的研究, 重点关注不同菌株的发酵方法对比以及番茄红素的精准定量方法, 并提出生物技术生产番茄红素存在的问题及未来的研究方向, 以为番茄红素的生物技术工业化生产以及其他高附加值天然产物的生物技术合成提供参考。

1 番茄红素的理化性质及应用

番茄红素属于四萜化合物, 是一种不饱和烯烃化合物, 也是一种不含氧原子的类胡萝卜素。番茄红素的分子式为 $C_{40}H_{56}$, 相对分子质量为 536.85, 在分子结构上有 11 个共轭双键和 2 个非共轭双键, 常存在顺反异构体。自然界中天然番茄红素主要是全反式结构, 极少量是顺式结构。

番茄红素是脂溶性色素, 不溶于水, 易溶于脂类和非极性有机溶剂, 其分子结构中含有发色基团, 对应在紫外-可见光吸收光谱中有 1 个独特的吸收区域, 根据番茄红素浓度不同而表现出从橙黄到暗红的不同颜色深度, 并且会随着溶剂不同而略有变化。例如, 番茄红素的晶体溶于葵花籽油中呈现肉眼可

收稿日期: 2023-03-13

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目(320RC734); 武汉市知识创新项目曙光计划(2022022020801020440)

石彬, E-mail: 2015203060030@whu.edu.cn

见的深红色,而溶解在石油醚中则呈黄色。由于分子中具有较多的双键,番茄红素的性质十分活泼,在光照、氧、高温条件下易发生氧化反应、结构异构化反应而导致生理活性降低^[4]。因此,在提取番茄红素时,常加入维生素C、维生素E、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、特丁基对苯二酚(TBHQ)等抗氧化剂^[5]。

不同于 β -胡萝卜素,由于番茄红素没有维生素A原的活性,在早期其应用并不受重视。但近年来由于番茄红素的生理学功能逐步为人们所知,番茄红素的应用越来越广泛。番茄红素作为一种极强的抗氧化剂,能清除人体的氧自由基、淬灭单线态氧,其抗氧化能力约是维生素E的100倍、 β -胡萝卜素的2倍^[6-9],还被证实具有抗肿瘤、预防前列腺疾病和降低心血管疾病风险的作用^[10-11],广泛应用于化妆品、保健品和食品等领域。

目前番茄红素已获得欧盟的“新颖食品”准入和美国的“GRAS(generally recognized as safe)”身份。随着人们生活水平的提高和对健康的愈发重视,美国预估番茄红素的销售额将以每年35%的速度增长(<https://www.industryarc.com/Report/16581/lycopene-market.html>)。因此,番茄红素的高效生物合成技术极具市场应用价值。

2 番茄红素的生产方法

2.1 番茄红素生产方法及特点

目前,番茄红素的生产方法有3种:植物提取法、化学合成法、生物合成法。植物提取法主要从成熟的植物果实如番茄中提取纯化得到番茄红素,但此方法受到地域、季节、番茄品种及成熟度等多种因素的影响而不稳定。在我国主要是选取新疆地区种植(日照时间长)的番茄来提取番茄红素,但番茄红素在番茄中的含量十分低,一般只有20 mg/kg,即使在局部含量较高的番茄皮中也不足0.4 g/kg^[12],提取成本居高不下,提取物中常含有其他类胡萝卜素,影响产品的纯度,并且由于含量较低,提取过程耗费大量有机溶剂,对环境污染较大。化学合成法主要是由辛三烯二醛和三苯基氯化磷或三苯基碘化磷发生烯化反应(Wittig反应)来合成番茄红素^[13]。化学合成法具有收率高(65%以上)、原料廉价且可回收、反应条件温和等特点。化学合成法虽然收率高、成本低,但是由于番茄红素结构中有较多的双键而容易出现异构体,且产品有溶剂残留可能,存在安全性风险。生物合成法是指微生物利用糖类、玉米浆、无

机盐等丰富易得的原料进行发酵生产番茄红素的过程。微生物发酵法不仅具有植物提取法的安全性(都是天然生物代谢来源、非人工合成),还具有化学合成法的成本低、可大规模生产的优势,被认为是未来生产番茄红素的理想方法。

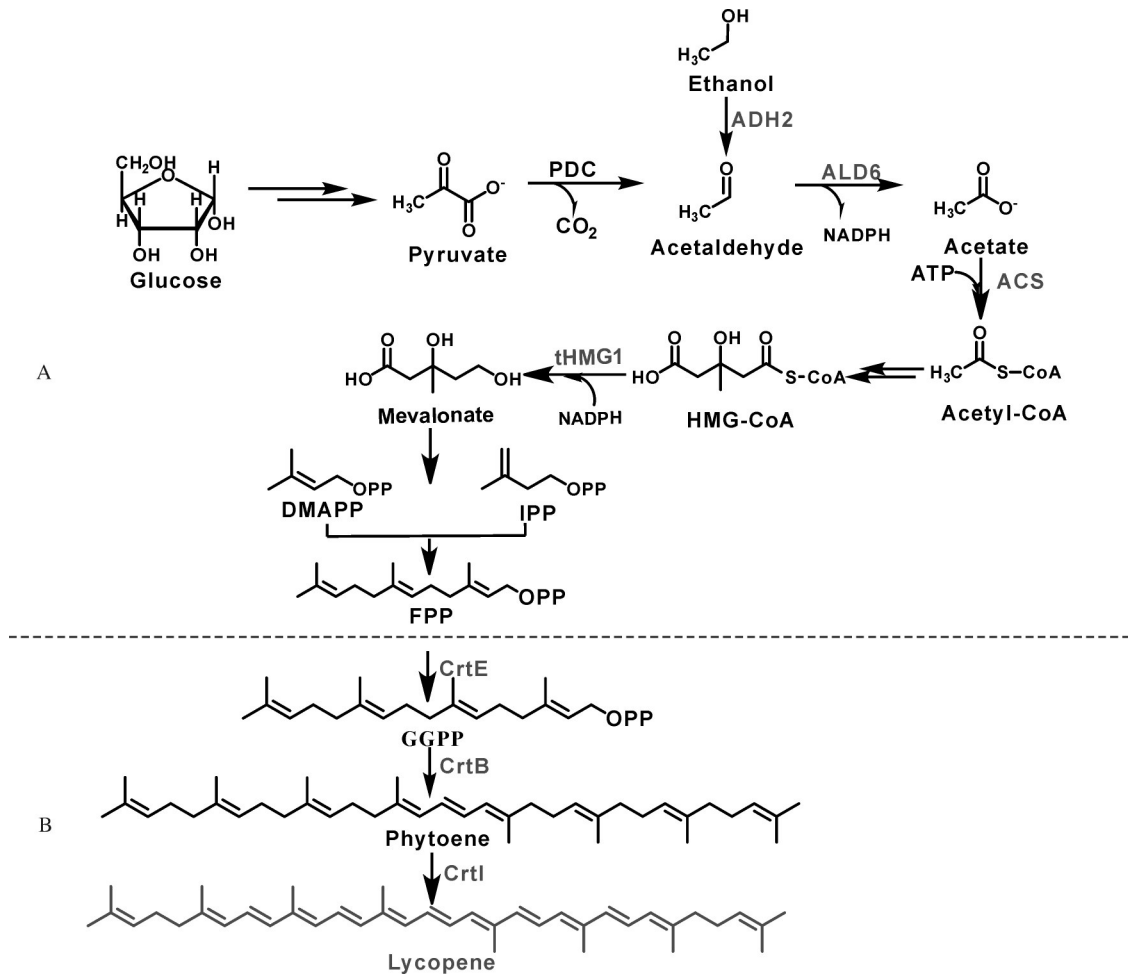
2.2 番茄红素的生物合成路径

番茄红素作为四萜化合物,与其他萜类化合物相似,其生物合成的共同前体是IPP(异戊烯焦磷酸)和DMAPP(二甲基烯丙基焦磷酸)这2个异戊二烯基单元,IPP和DMAPP互为同分异构体^[14]。目前自然界中有2种途径可以合成IPP和DMAPP,一是原核生物和植物中的MEP(2-甲基赤藓糖醇-4-磷酸)途径,二是真核生物中的MVA(甲羟戊酸)途径。

MEP途径是以丙酮酸与3-磷酸甘油醛作为起始底物来合成IPP和DMAPP^[15],而MVA途径是以乙酰辅酶A作为起始底物经七步酶催化反应来合成IPP和DMAPP^[16]。相比MEP途径,MVA途径研究得更早,反应机制也更透彻。番茄红素的生物合成途径可以分为2个模块,上游模块是合成到前体物质IPP和DMAPP的过程,下游模块是由IPP和DMAPP合成到番茄红素的过程(图1)。IPP和DMAPP在异戊烯基转移酶的作用下逐步发生缩合反应生成GGPP(牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸),之后GGPP在八氢番茄红素合酶(phytoene synthase, CrtB)的作用下生成八氢番茄红素,再经过八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, CrtI)的作用生成番茄红素。

2.3 合成番茄红素的微生物

目前已知的发酵法生产番茄红素的微生物包括:自身能合成番茄红素的泛球菌、三孢布拉霉菌以及经过代谢工程改造的酿酒酵母、解脂耶氏酵母和大肠杆菌等。其中研究比较多的是三孢布拉霉菌(*Blakeslea trispora*)^[17],也是唯一能够实现 β -胡萝卜素工业化生产的菌株。而番茄红素作为 β -胡萝卜素合成的中间产物,在发酵过程中加入番茄红素环化酶阻断剂就可以实现番茄红素的积累。多项研究表明三孢布拉霉菌产生番茄红素的产量不断提高,已有公开报道的番茄红素产量最高是3.4 g/L^[18]。但三孢布拉霉菌在传代过程中容易发生退化,导致产量不稳定,且生长周期较长使得生产效率较低,生产过程中还需要加入阻断剂,以上因素使三孢布拉霉菌发酵生产番茄红素的工艺受到很大限制^[19]。



A: 上游模块; B: 下游模块。A: Upstream module; B: Downstream module.

图1 番茄红素经由甲羟戊酸途径的生物合成路径

Fig.1 The synthesis pathway of lycopene via MVA pathway

3 生物技术合成番茄红素的研究

3.1 工程改造合成番茄红素的主要微生物

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是萜类化合物异源合成常用的微生物宿主之一,其清晰的遗传背景、快速细胞生长以及丰富遗传操作工具等优势使大肠杆菌成为工业化产品开发的理想宿主平台。有学者通过代谢工程和合成生物学技术成功地实现工程改造大肠杆菌异源高产类胡萝卜素的工艺^[20-21]。但是由于大肠杆菌易感染噬菌体、存在内毒素等风险^[22],目前利用大肠杆菌生产番茄红素还有一定的食品安全隐患,其工业化应用受到较大限制。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是一种真核模式生物,其基因组已被测序,细胞生物学特性也得到很好的表征,并且有成熟的遗传操作工具和手段。在酿酒酵母大规模发酵过程中不存在噬菌体污染的隐患,相对于大肠杆菌它通常被认为是安全的,因此

利用代谢工程改造酿酒酵母异源生产番茄红素被认为非常有应用前景。与大肠杆菌一样,酿酒酵母自身无法合成类胡萝卜素,必须引入相关合成基因^[23-26]。

解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)是一种非常规的微生物宿主,可产生大量脂质,被认为是安全的。虽然不能直接合成类胡萝卜素,但可以产生大量前体乙酰辅酶A,再通过引入外源关键酶来实现类胡萝卜素的合成。解脂耶氏酵母被认为是较有希望通过MVA途径生产类胡萝卜素的宿主^[27-28],目前科研人员开发了许多遗传操作工具对其工程化改造。

真核微藻类作为自养型微生物能利用光能和二氧化碳产生生物质,因此在可持续生产萜类化合物方面具有巨大的代谢潜力。但是目前高水平的藻类代谢工程改造研究远落后于其他宿主,在一定程度上限制了其应用^[29]。

红酵母(*Rhodospiridium toruloides*)可以生成色

素,如 β -胡萝卜素、 γ -胡萝卜素的细胞内生物合成。研究人员通过优化培养条件和诱变来增强红酵母生产类胡萝卜素的能力。但目前对红酵母的研究非常有限,可能是由于现有基因组数据的局限性以及关键基因的功能性注释不足,很大程度上阻碍了高产类胡萝卜素的代谢工程改造^[30]。其他的非类胡萝卜素酵母,例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*),具有能高密度生长又不积累乙醇的特点,也被工程化改造以合成类胡萝卜素,但产量较低,还有待研究^[31]。

3.2 工程改造微生物合成番茄红素的策略

1)上游模块(前体IPP/DMAPP的供应)的增强。为实现番茄红素等类胡萝卜素的高产,增加类异戊二烯合成通用前体IPP和DMAPP是有效策略。IPP和DMAPP合成涉及2个天然途径,即MEP途径和MVA途径。(1)MEP途径主要存在于原核生物中,DXS和IDI通常被认为是该途径主要的限速酶,并且被过表达以增强类异戊二烯的合成^[32]。Li等^[33]研究发现*IspA*、*ispH*和*ispE*进一步增加了*dxs*和*idi*过表达菌株的途径通量。*ispG*的过表达可有效降低细胞内MEC的流出,导致下游类异戊二烯产量的显著增加^[34]。基于此,Li等^[35]通过激活*IspG*和*IspH*消除MEP中间产物的积累,使番茄红素产量成功提升77%。(2)MVA途径主要存在于真核生物中,HMG-CoA还原酶是类异戊二烯经MVA途径生物合成的第一步^[36]。酿酒酵母中HMG-CoA还原酶催化区域(*tHMG1*)的过表达可以增加番茄红素的产量^[24]。此外,尽管通过优化MEP途径在类胡萝卜素的生产方面取得了一些进展,但MEP途径中天然宿主的调节机制限制了其应用^[37]。为绕过该途径,朱发银等^[20]将完整的MVA途径和外源基因引入大肠杆菌中,通过分批补料、发酵优化得到番茄红素产量为1.44 g/L。

2)下游模块(番茄红素异源合成途径)的研究。常见策略是将异源途径基因引入非类胡萝卜素宿主来生产类胡萝卜素,将萜类合成前体IPP和DMAPP转化成类胡萝卜素。Verwaal等^[38]在大肠杆菌中表达了1种质粒,含有编码香叶基香叶基焦磷酸合酶和八氢番茄红素合酶的基因以及编码八氢番茄红素去饱和酶的cDNA,并最终观察到番茄红素的积累。在合成类胡萝卜素的酵母细胞中引入拷贝的*CrtI*和*tHMG1*会使 β -胡萝卜素含量增加。为实现异源途径基因的高水平、遗传稳定的表达,Tyo等^[39]建立了化学诱导的染色体进化的无质粒、高基因拷贝表达系

统,并用于工程化大肠杆菌,相较于质粒表达系统,最终使番茄红素的产量提高60%。研究表明优化番茄红素的合成途径对异源高产番茄红素非常重要。

3)旁路途径的下调。合成番茄红素的前体FPP也是许多酵母代谢产物(例如泛醌、萜醇、角鲨烯等)的常见前体,但直接敲除这些前体竞争途径基因(如角鲨烯的合成基因)会对细胞生长造成很大的影响。因此,许多学者致力于下调这些竞争途径来增强番茄红素的合成通量。用弱启动子替代天然启动子来下调竞争的角鲨烯合酶基因*sqs1*可使解脂耶氏酵母中 β -胡萝卜素的滴度产量从(453.9 \pm 20.2) mg/L增加至(797.1 \pm 57.2) mg/L^[40]。Xie等^[41]在酿酒酵母中使用高葡萄糖诱导/低葡萄糖抑制的启动子pHXT1控制实现了*erg9*基因和类胡萝卜素途径基因的顺序表达以响应培养物中葡萄糖浓度的变化,使得酵母中番茄红素产量明显增加。Hong等^[42]在酿酒酵母中敲除*dpp1*和*lpp1*基因以抑制产生法尼醇的竞争途径,并通过下调*erg9*表达抑制麦角固醇的产生,同样可以增加番茄红素的产量。以上研究充分表明下调竞争途径是提高番茄红素产量的有效策略。

4)底盘细胞的改造。在高产番茄红素的研究中,除了优化番茄红素异源合成途径,还需要对宿主底盘细胞进行改造以匹配异源途径。底盘细胞的改造包括:乙酰辅酶A前体通量的加强^[43]、ATP和NADPH等辅因子供应的加强、某些非必需基因的敲除、菌株自适应进化等。乙酰辅酶A是类胡萝卜素生物合成的底物。Chen等^[24]在酿酒酵母中详细研究了*yp1062w*基因的作用机制,敲除*yp1062w*可以增强乙酰辅酶A的通量并最终增加番茄红素的产量,高达1.65 g/L。Zhou等^[26]利用酿酒酵母菌株自适应进化结合代谢工程技术,使番茄红素的分批补料发酵产量达8.15 g/L。作为能量的ATP和还原力的NADPH的供给是影响类胡萝卜素合成的重要因素。通过改造碳源同化的中心代谢模块(EMP和PPP途径),增强ATP和NADPH的供应,工程大肠杆菌可以在分批补料发酵中合成2.1 g/L的 β -胡萝卜素^[44]。调节*sucAB*和*sdhABCD*基因的表达可以增加TCA循环的碳通量并增加ATP的供应,此外,调节*talB*基因可以增加NADPH的供应,使大肠杆菌合成番茄红素的产量提高至3.52 g/L^[45]。

5)系统代谢工程改造酿酒酵母高产番茄红素。归纳总结如图2、3所示。Shi等^[25]通过系统代谢工

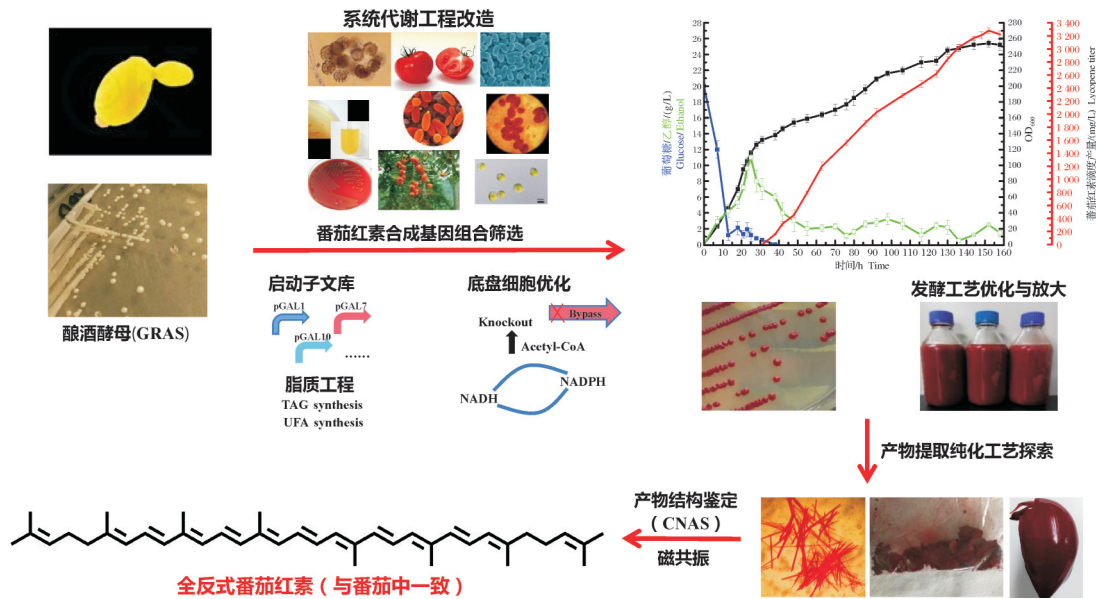


图2 系统代谢工程改造酿酒酵母高产番茄红素

Fig.2 The system metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lycopene production



图3 酿酒酵母高产番茄红素中试放大至6000 L规模
Fig.3 High lycopene production from *Saccharomyces cerevisiae* scaled up to 6000 L

程改造酿酒酵母高效生物合成番茄红素,列举了4个关键问题:(1)次级代谢产物积累和宿主细胞生长需要进行平衡;(2)番茄红素异源合成途径需要在酵母中强化;(3)酵母底盘细胞需要改造,提供更多的前体物质和还原力;(4)酵母发酵技术需要优化。并提出了对应的解决思路,包括:(1)筛选一批能合理控制番茄红素异源合成途径的GAL启动子,将酵母细胞生长和番茄红素产物积累在时间顺序上区分开,并且启动子强度在产物合成时期也和组成型强启动子相当;(2)对番茄红素异源合成途径的3个关键基因来源进行综合筛选,得到在酿酒酵母中高效运转的最佳组合 $PaCrtE$ 、 $PagCrtB$ 、 $BtCrtI$;(3)对酿酒酵母底盘细胞进行系列改造,为番茄红素的合成提供充足的前体物质乙酰辅酶A和还原力NADPH(还原型辅酶II),并敲除某些影响番茄红素积累的内源非必需基因来进一步提升番茄红素产量;(4)通过这些系统代谢工程手段,再结合酿酒酵母全合成培养基

发酵的优化,番茄红素产量高达3.28 g/L,已初步达到工业化水平,目前中试的发酵规模已经成功放大至6000 L。此外,所开发的系统代谢工程改造酿酒酵母的策略还成功拓展到其他萜类化合物的生物技术合成,例如 β -法尼烯^[46]、佛手烯^[47]、 β -石竹烯等倍半萜。其中,Deng等^[47]采用该系统工程策略,成功将代谢工程改造酿酒酵母菌株生产佛手烯的产量提高至34.6 g/L。

3.3 番茄红素工程菌的发酵工艺

目前在微生物高产番茄红素发酵方面的研究也取得很大的进展,不同菌株所使用的发酵原料、发酵过程和规模会有所不同(表1)。发酵过程中使用的底物基质随微生物种类的不同而变化。番茄红素异源合成较成熟的发酵宿主一般是大肠杆菌和酿酒酵母,一般而言,大肠杆菌的发酵以甘油为碳源^[20,45],而酿酒酵母主要以葡萄糖作为碳源^[23-26]。

Zhu等^[20]利用甘油作为工程大肠杆菌的碳源,使用全合成培养基在5 L发酵罐上得到番茄红素产量为1.44 g/L,随后将发酵规模扩大到150 L,产量也达到1.32 g/L,说明菌株发酵可放大生产。Sun等^[45]用工程大肠杆菌在7 L发酵罐中以甘油为碳源进行分批补料发酵,最终获得3.52 g/L番茄红素。Chen等^[24]使用工程酿酒酵母在5 L发酵罐中使用葡萄糖和乙醇为碳源,酵母抽提物和蛋白胨为氮源进行分批补料发酵,获得了1.65 g/L的番茄红素滴度产量。Shi等^[25]使用工程酿酒酵母在7 L发酵罐中使用葡

表1 番茄红素菌株发酵过程和相应产量

Tabel 1 Fermentation process and corresponding titer of different lycopene production strain				
宿主 Host	发酵罐规模/L Fermentor scale	发酵原料/过程 Feedstocks/Process	番茄红素滴度产量/ (g/L) Lycopene titer	参考文献 Reference
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	7	底料: 甘油, 磷酸二氢铵 Batch: glycerol, (NH ₄) ₂ HPO ₄ 补料: 甘油, 蛋白胨, 酵母抽提物 Feeding: glycerol, peptone, yeast extract 30 °C, pH 7.0	3.52	[45]
	5~150	底料: 甘油, 硫酸铵 Batch: glycerol, (NH ₄) ₂ SO ₄ 补料: 甘油 Feeding: glycerol 30 °C, pH 7.2	1.32~1.44	[20]
	5	底料: 葡萄糖, 硫酸铵, 蛋白胨, 酵母抽提物; Batch: glucose, (NH ₄) ₂ SO ₄ , peptone, yeast extract 补料: 葡萄糖, 甘油 Feeding: glucose, glycerol 30 °C, pH 5.0	1.61	[23]
酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	5	底料: 葡萄糖, 硫酸铵, 胰蛋白胨, 酵母抽提物 Batch: glucose, tryptone, yeast extract 补料: 葡萄糖, 乙醇 Feeding: glucose, ethanol 30 °C, pH 6.0 保持葡萄糖残留量在2 g/L以下, 乙醇残留量在5 g/L以下 Keeping the glucose concentration under 2 g/L, ethanol concentration below 5 g/L	1.65	[24]
	7	底料: 葡萄糖, 硫酸铵 Batch: glucose, (NH ₄) ₂ SO ₄ 补料: 葡萄糖, 乙醇 Feeding: glucose, ethanol 30 °C, pH 5.0 保持葡萄糖残留量在1 g/L以下, 乙醇残留量在5 g/L以下 Keeping the glucose concentration under 1 g/L, ethanol concentration below 5 g/L	3.28	[25]
	7	底料: 葡萄糖, 胰蛋白胨, 酵母抽提物 Batch: glucose, tryptone, yeast extract 补料: 葡萄糖, 乙醇 Feeding: glucose, ethanol 30 °C, pH 6.0 保持葡萄糖残留量在2 g/L以下, 乙醇残留量在10 g/L以下 Keeping the glucose concentration below 2 g/L, ethanol concentration below 10 g/L	8.15	[26]
解脂耶氏酵母 <i>Y. lipolytica</i>	3	底料: 葡萄糖, 酵母无氨基氮源, 酵母抽提物, 硫酸铵 Batch: glucose, YNB, yeast extract, ammonium sulfate	4.20	[48]

葡萄糖和乙醇为碳源, 硫酸铵为氮源进行两阶段的分批补料发酵, 并对发酵液中的葡萄糖和乙醇残留量进行了严格的调控, 最终获得了3.28 g/L的番茄红素滴度产量。由于酿酒酵母相对于大肠杆菌具有很多优势, 如食品安全性高、不易污染噬菌体等, 因此, 利用酿酒酵母发酵生产番茄红素的工艺更具有市场前景。目前酵母发酵常使用蛋白胨和酵母浸粉作为氮源的天然YPD培养基^[24, 26], 也有硫酸铵、酵母浸粉、蛋白胨作为混合氮源的半合成培养基^[23], 以及硫酸铵作为氮源的全合成培养基^[25]。全合成培养基具有价格低廉、易于发酵重复和放大、成分明确便于后期优化的优势, 未来更应加强对酵母的合成培养基发酵进行研究, 使番茄红素产量高且稳定、可重复、发酵规模可放大, 为后续的工业化应用打下牢固的基础。

3.4 微生物合成番茄红素的提取和定量研究

番茄红素等类胡萝卜素具有较强的抗氧化作

用, 在提取过程中要最大程度地降低其被氧化和异构化的风险^[49]。例如, 有些研究选择在避光条件下进行操作^[20, 45], 或在萃取剂中添加抗氧化剂BHT^[24-25, 27]。常用的萃取剂是丙酮、石油醚、氯仿、己烷、乙酸乙酯等^[49]。由于番茄红素是细胞内产物, 必须进行细胞破壁, 破壁方式根据宿主细胞壁的厚度不同而变化。例如, 大肠杆菌的细胞壁较薄, 一般选择丙酮重悬, 55 °C水浴破坏细胞壁处理^[20, 45]; 解脂耶氏酵母和酿酒酵母等真核生物具有较厚的细胞壁, 通常加入玻璃珠和提取试剂来震荡破碎细胞^[25, 27]; 还可以利用盐酸沸水浴的方式来进行酵母细胞壁的破碎处理^[23-24]。

现有研究中对番茄红素等类胡萝卜素的检测和定量方法也有所不同。大多数研究都使用高效液相色谱(HPLC)来检测番茄红素、β-胡萝卜素等类胡萝卜素^[23-26, 45], 少数使用紫外-分光光度计来检测^[20, 27]。由于紫外-分光光度计检测存在吸收波长

相同的杂质干扰,而HPLC法检测是先分离不同物质,再检测吸收值。相对而言,通过HPLC来精准定量番茄红素等类胡萝卜素的结果更为准确,而紫外-分光光度计检测可作为辅助手段来初步评估发酵过程中的产量变化趋势。

大多数研究使用对应的番茄红素、 β -胡萝卜素标准品来绘制标准曲线进行产量计算^[23-26,45],但没有说明是否对所购买的番茄红素/ β -胡萝卜素标准品进行校准,只有较少研究者明确表示在绘制标准曲线之前已对标准品溶液浓度进行了校准^[25]。必须对配制的标准品溶液浓度进行校准的原因是,微量的番茄红素或 β -胡萝卜素标准品难以精准称量,并且不容易准确判断有机溶剂中的番茄红素晶体是否已完全溶解,此外购买的标准品纯度也会因保存方式和时间而有变化。这些客观因素都可能在番茄红素标准曲线的绘制中引起较大的误差,导致计算的产量结果的准确性不高。为了消除上述因素干扰,常用的方法是先使用分光光度计测定所制备番茄红素等类胡萝卜素标准品溶液的吸光度,再根据相应的消光系数计算溶液中类胡萝卜素的绝对含量^[25,50-51]。此方法可消除由于称量不精确或样品不完全溶解而导致的误差。综上,利用HPLC来精确检测样品中的番茄红素,并使用校准过的标准品溶液来绘制标准曲线,定量结果会更加准确。

4 结语与展望

番茄红素作为强抗氧化剂,具有许多良好的生理功能,市场前景广阔。本文详细综述了番茄红素的理化性质、生理功能、生产方法,着重汇总了目前生物技术生产番茄红素的研究进展,包括微生物宿主细胞多样性选择、最新的代谢工程改造策略、发酵方法和番茄红素提取和精准定量方法等内容。

尽管目前生物技术合成番茄红素已取得了一定的进展,但因其本身是一项复杂、影响因素较多的工程研究,番茄红素的生物合成工艺还存在较多问题,对未来的相关研究方向总结如下:

1)发酵生产规模的放大及稳定重复。目前大多数生物技术合成番茄红素的研究还处于实验室阶段的小型发酵罐试验规模,而产业化研究往往是以数吨、数十吨级计算的大规模发酵生产。从小试到中试生产的发酵放大并不是简单的罐体体积线性放大,还会涉及到传热、传质、传氧不均匀以及菌株生长模型发生改变等诸多难题。据笔者的实践经验,

工程菌株在发酵放大的过程中会出现菌株早衰、菌株表型退化、补料策略变化、发酵产量不稳定等问题,需要研究者对发酵工艺放大参数条件逐一调试。未来发酵生产规模的放大研究是解决生物技术工业化生产番茄红素的关键问题。

2)微生物源番茄红素的提取纯化工艺。番茄红素是细胞内产物,在提取纯化的过程中涉及细胞破碎、杂质去除、番茄红素结晶等诸多工序,而在此过程中番茄红素又十分容易被氧化导致结构发生改变。因此,其提取率难以保证,需要深入研究微生物源番茄红素的提取纯化工艺。

3)微生物源番茄红素的质量检测等研究。微生物源番茄红素虽然也是酶催化反应的产物,但并非天然番茄来源,会涉及到转基因等问题。因此,微生物源番茄红素首先要通过结构鉴定是否与天然番茄来源一致,其次需要进行重金属残留、微生物含量等质量品质检测,以确保产品的结构和质量,这2项也是影响微生物源番茄红素市场应用的重要因素。

4)生产成本控制。若要与天然提取的番茄红素进行市场竞争,生物技术合成番茄红素必须在成本上有明显优势。生物发酵生产番茄红素的成本主要包括:发酵原料、设备折损、提取纯化、人工、销售等。在设计和优化生产工艺条件时必须考虑成本因素,如采用更便宜的全合成发酵培养基、扩大发酵规模分摊成本、采用更先进的酶解破碎细胞方式提取等方法来降低生产成本。

解决上述问题,对于推动生物技术生产番茄红素的工业化进程具有重要的理论与实践意义,也可为其他高附加值天然产物的生物技术研究提供参考。

参考文献 References

- [1] 熊豆,谢笔钧,孙智达.甲基萘醌MK-4对类胡萝卜素在模拟胃液中氧化的保护作用[J].华中农业大学学报,2020,39(2):102-111.Protective effect of MK-4 on oxidation of carotenoids in simulated gastric juice[J].Journal of Huazhong Agricultural University,2020,39(2):102-111(in Chinese with English abstract).
- [2] 刘琨毅,刘祥宇,王琪,等.D-最优混料设计优化富含番茄红素复合果蔬酒的主料配比[J].中国酿造,2022,41(2):164-169.LIU K Y,LIU X Y,WANG Q,et al.Optimization of main ingredient ratio of compound fruit and vegetable wine rich in lycopene by D-optimal mixture design[J].China brewing,2022,41(2):164-169(in Chinese with English abstract).
- [3] ZARDINI A A,MOHEBBI M,FARHOOSH R,et al.Pro-

- duction and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing lycopene for food fortification [J]. *Journal of food science and technology*, 2018, 55 (1):287-298.
- [4] LEE M T, CHEN B H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system [J]. *Food chemistry*, 2002, 78(4):425-432.
- [5] 王学武, 夏延斌, 王克勤. 天然番茄红素的稳定性研究 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2002, 28(1):57-60. WANG X W, XIA Y B, WANG K Q. Stability of natural lycopene [J]. *Journal of Hunan Agricultural University*, 2002, 28(1):57-60 (in Chinese with English abstract).
- [6] 马天贵. 番茄红素生理功能及其应用 [J]. *粮食与油脂*, 2008, 21(1):46-48. MA T G. Physiological functions and application of lycopene [J]. *Cereals & oils*, 2008, 21(1):46-48 (in Chinese with English abstract).
- [7] 李佳, 闫唯, 刘钰华, 等. 番茄红素保健功能及其应用研究进展 [J]. *农业与技术*, 2016, 36(15):5-6. LI J, YAN W, LIU Y H, et al. Research progress on health function and application of lycopene [J]. *Agriculture and technology*, 2016, 36(15):5-6 (in Chinese).
- [8] 江利华, 柳慧芳, 郝光飞, 等. 虾青素抗氧化能力研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(10):350-354. JIANG L H, LIU H F, HAO G F, et al. Research progress on antioxidant ability of astaxanthin [J]. *Science and technology of food industry*, 2019, 40(10):350-354 (in Chinese with English abstract).
- [9] 彭永健, 吕红萍, 王胜南, 等. 天然虾青素的研究进展 [J]. *中国食品添加剂*, 2017(4):193-197. PENG Y J, LÜ H P, WANG S N, et al. Present research and prospect on natural astaxanthin [J]. *China food additives*, 2017(4):193-197 (in Chinese with English abstract).
- [10] ASSAR E A, VIDALLE M C, CHOPRA M, et al. Lycopene acts through inhibition of I κ B kinase to suppress NF- κ B signaling in human prostate and breast cancer cells [J]. *Tumor biology*, 2016, 37(7):9375-9385.
- [11] RAO A V, AGARWAL S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease [J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2000, 19(5):563-569.
- [12] 霍书香, 杨清山, 岳新海, 等. 番茄皮中番茄红素含量测定方法 [J]. *食品工业*, 2019, 40(6):263-265. HUO S X, YANG Q S, YUE X H, et al. Determination method of lycopene content in tomato skin [J]. *The food industry*, 2019, 40(6):263-265 (in Chinese with English abstract).
- [13] KARL M. Method for the manufacture of carotenoids and novel intermediates: US5208381 [P]. 1993-05-04.
- [14] KIRBY J, KEASLING J D. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering [J]. *Annual review of plant biology*, 2009, 60:335-355.
- [15] ROHMER M, KNANI M, SIMONIN P, et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate [J]. *The biochemical journal*, 1993, 295(Pt 2):517-524.
- [16] BLOCH K, CHAYKIN S, PHILLIPS A H, et al. Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate [J]. *Journal of biological chemistry*, 1959, 234(10):2595-2604.
- [17] CHOUDHARI S M, ANANTHANARAYAN L, SINGHAL R S. Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of β -carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896 [J]. *Bioresource technology*, 2008, 99(8):3166-3173.
- [18] 安娜特雷莎·马科斯罗德里格斯, 安东尼奥·埃斯特雷利亚德卡斯特罗, 哈维尔·科斯塔佩雷斯, 等. 生产番茄红素的改良方法, 获得的番茄红素的制剂和应用: CN1617934A [P]. 2005-05-18. ANATES T M R, DE CASTROTES A E, PEREZTES J C. Improved method of producing lycopene, preparation for obtaining lycopene, and application thereof: CN1617934A [P]. 2005-05-18 (in Chinese).
- [19] WANG J F, LIU X J, LIU R S, et al. Optimization of the mixed fermentation process for the production of lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) and NRRL 2896 (-) [J]. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2012, 35(4):553-564.
- [20] ZHU F Y, LU L, FU S, et al. Targeted engineering and scale up of lycopene overproduction in *Escherichia coli* [J]. *Process biochemistry*, 2015, 50(3):341-346.
- [21] PARK S Y, BINKLEY R M, KIM W J, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-level astaxanthin production with high productivity [J]. *Metabolic engineering*, 2018, 49:105-115.
- [22] RAY B L, RAETZ C R. The biosynthesis of gram-negative endotoxin. A novel kinase in *Escherichia coli* membranes that incorporates the 4'-phosphate of lipid A [J]. *Journal of biological chemistry*, 1987, 262(3):1122-1128.
- [23] XIE W P, LV X M, YE L D, et al. Construction of lycopene-overproducing *Saccharomyces cerevisiae* by combining directed evolution and metabolic engineering [J]. *Metabolic engineering*, 2015, 30:69-78.
- [24] CHEN Y, XIAO W H, WANG Y, et al. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering [J/OL]. *Microbial cell factories*, 2016, 15(1):113 [2023-03-13]. <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0509-4>.
- [25] SHI B, MA T, YE Z L, et al. Systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lycopene overproduction [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2019, 67(40):11148-11157.
- [26] ZHOU K, YU C, LIANG N, et al. Adaptive evolution and metabolic engineering boost lycopene production in *Saccharomyces cerevisiae* via enhanced precursors supply and utilization [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2023, 71(8):3821-3831.

- [27] GAO S L, TONG Y Y, ZHU L, et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production [J]. *Metabolic engineering*, 2017, 41: 192-201.
- [28] LARROUDE M, CELINSKA E, BACK A, et al. A synthetic biology approach to transform *Yarrowia lipolytica* into a competitive biotechnological producer of β -carotene [J]. *Biotechnology and bioengineering*, 2018, 115(2): 464-472.
- [29] GUERIN M, HUNTLEY M E, OLAIZOLA M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition [J]. *Trends in biotechnology*, 2003, 21(5): 210-216.
- [30] DIAS C, SILVA C, FREITAS C, et al. Effect of medium pH on *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 carotenoid and lipid production evaluated by flow cytometry [J]. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2016, 179(5): 776-787.
- [31] BHATAYA A, SCHMIDT-DANNERT C, LEE P C. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* X-33 for lycopene production [J]. *Process biochemistry*, 2009, 44(10): 1095-1102.
- [32] YANG J M, GUO L Z. Biosynthesis of β -carotene in engineered *E. coli* using the MEP and MVA pathways [J]. *Microbial cell factories*, 2014, 13: 160.
- [33] LI Y F, LIN Z Q, HUANG C, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* using CRISPR-Cas9 mediated genome editing [J]. *Metabolic engineering*, 2015, 31: 13-21.
- [34] ZHOU K, ZOU R Y, STEPHANOPOULOS G, et al. Metabolite profiling identified methylerythritol cyclodiphosphate efflux as a limiting step in microbial isoprenoid production [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e47513 [2023-03-13]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047513>.
- [35] LI Q Y, FAN F Y, GAO X, et al. Balanced activation of IspG and IspH to eliminate MEP intermediate accumulation and improve isoprenoids production in *Escherichia coli* [J]. *Metabolic engineering*, 2017, 44: 13-21.
- [36] DIMSTER-DENK D, THORSNESS M K, RINE J. Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular biology of the cell*, 1994, 5(6): 655-665.
- [37] MARTIN V J J, PITERA D J, WITHERS S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids [J]. *Nature biotechnology*, 2003, 21(7): 796-802.
- [38] VERWAAL R, WANG J, MEIJNEN J P, et al. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous* [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73(13): 4342-4350.
- [39] TYO K E J, AJIKUMAR P K, STEPHANOPOULOS G. Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression [J]. *Nature biotechnology*, 2009, 27(8): 760-765.
- [40] KILDEGAARD K R, ADIEGO-PÉREZ B, DOMÉNECH BELDA D, et al. Engineering of *Yarrowia lipolytica* for production of astaxanthin [J]. *Synthetic and systems biotechnology*, 2017, 2(4): 287-294.
- [41] XIE W P, YE L D, LÜ X M, et al. Sequential control of biosynthetic pathways for balanced utilization of metabolic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metabolic engineering*, 2015, 28: 8-18.
- [42] HONG J, PARK S H, KIM S, et al. Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by enzyme engineering and increasing membrane flexibility and NAPDH production [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2019, 103(1): 211-223.
- [43] 李佳蓉, 林静远, 李正宇, 等. 挖掘与调控乙酸胁迫响应基因提高重组酿酒酵母合成番茄红素水平 [J/OL]. *微生物学通报*, 2023: 1-24 [2023-03-13]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.1996.Q.20230207.1725.004.html>. LI J R, LIN J Y, LI Z Y, et al. Mining and regulating acetic acid stress-responsive genes to improve lycopene synthesis in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J/OL]. *Microbiology China*, 2023: 1-24 [2023-03-13]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.1996.Q.20230207.1725.004.html> (in Chinese with English abstract).
- [44] ZHAO J, LI Q Y, SUN T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production [J]. *Metabolic engineering*, 2013, 17: 42-50.
- [45] SUN T, MIAO L T, LI Q Y, et al. Production of lycopene by metabolically-engineered *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology letters*, 2014, 36(7): 1515-1522.
- [46] YE Z L, SHI B, HUANG Y L, et al. Revolution of vitamin E production by starting from microbial fermented farnesene to isophytol [J/OL]. *The innovation*, 2022, 3(3): 100228 [2023-03-13]. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100228>.
- [47] DENG X M, SHI B, YE Z L, et al. Systematic identification of *Ocimum sanctum* sesquiterpenoid synthases and (–)-eremophilene overproduction in engineered yeast [J]. *Metabolic engineering*, 2022, 69: 122-133.
- [48] LUO Z S, LIU N, LAZAR Z, et al. Enhancing isoprenoid synthesis in *Yarrowia lipolytica* by expressing the isopentenol utilization pathway and modulating intracellular hydrophobicity [J]. *Metabolic engineering*, 2020, 61: 344-351.
- [49] CHOKSI P M, JOSHI V Y. A review on lycopene: extraction, purification, stability and applications [J]. *International journal of food properties*, 2007, 10(2): 289-298.
- [50] BIAN G K, MA T, LIU T G. *In vivo* platforms for terpenoid overproduction and the generation of chemical diversity [J]. *Methods in enzymology*, 2018, 608: 97-129.
- [51] SCOTT K J. Detection and measurement of carotenoids by UV/VIS spectrophotometry [J/OL]. *Current protocols in food analytical chemistry*, 2001, F2.2(1): 1-10 [2023-03-13]. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0202s00>.

Research progress of lycopene synthesis by biotechnology

SHI Bin¹, DENG Xiaomin²

1. Wuhan Vocational College of Software and Engineering, Wuhan 430205, China;
2. Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree of Ministry of Agriculture and Rural Affairs/State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops/Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

Abstract As a high-value carotenoid, lycopene has many physiological functions, such as anti-oxidation, scavenging free radicals and preventing heart cerebrovascular disease. It is widely used in fields such as food and medicine. At present, lycopene mainly comes from natural tomato extraction, and its market application is limited due to the limited production capacity. While the biotechnology represented by synthetic biology has brought the dawn for the innovative production of lycopene. In this paper, the physicochemical properties, physiological functions and production methods of lycopene were summarized according to the relevant domestic and foreign research literature. In particular this paper focuses on the recent research progress in the metabolic engineering, fermentation and extraction of lycopene by biotechnology. The research status of lycopene synthetic biology was systematically reviewed. Finally, the future direction and problems of lycopene production by biotechnology are prospected, so as to provide reference for the related research on the biosynthesis of lycopene.

Keywords lycopene; carotenoid; synthetic biology; *Yarrowia lipolytica*; *Blakeslea trispora*; metabolic engineering; fermentation optimization

(责任编辑:赵琳琳)