[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02821563.X

[51] Int. Cl.
C12N 1/14 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)
C12P 23/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 8 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1330746C

[51] Int. Cl. (续)
C12N 13/00 (2006.01)
C12S 3/00 (2006.01)

[22] 申请日 2002.10.24 [21] 申请号 02821563.X

[30] 优先权

[32] 2001.10.29 [33] RU [31] 2001129106

[86] 国际申请 PCT/EP2002/012017 2002.10.24

[87] 国际公布 WO2003/038064 英 2003.5.8

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.29

[73] 专利权人 DSM IP 资产有限公司

地址 荷兰海尔伦

[72] 发明人 A·沙普 A·V·格拉苏诺夫
E·A·瓦威洛娃
Y·V·福尔亚克
L·N·沃罗尼那
E·S·默罗佐娃
Y·P·威恩斯基
N·A·伊夫列娃
V·M·斯普布伦尼科夫
R·I·阿克施纳

[56] 参考文献

WO0077234A2 2000.12.21

Lycopene cyclization in Blakeslea trispora Mehta B. et al, MYCOSCIENCE, Vol. 40 1999

审查员 徐益君

[74] 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限责任公司

代理人 肖善强

权利要求书 3 页 说明书 24 页

[54] 发明名称

无外源胡萝卜素生成抑制剂条件下在适宜培养基中生产高产量番茄红素的三孢布拉霉

[57] 摘要

本发明涉及在缺少外源胡萝卜素生成抑制剂的适宜培养基中、与一适宜相反接合型三孢布拉霉菌株共培养至少三天时，生产至少 0.3g/l 番茄红素的三孢布拉霉(B. trispora)菌株，一种用这些菌株进行的天然高效生产番茄红素的方法，一种特别适合该方法的培养基，以及一种适于任意类胡萝卜素化合物的分离方法。

1. 三孢布拉霉菌株，其中，所述菌株是以VKPM F-822保藏的菌株。

2. 如权利要求1所定义的三孢布拉霉菌株用于生产番茄红素的用途。

3. 用权利要求1中所定义的菌株生产番茄红素的方法，包括将该菌株与一相反接合型三孢布拉霉菌株在缺少外源特定胡萝卜素生成抑制剂的、通常用于发酵的培养基中共培养至少三天，从而所述菌株能够生产出至少0.3 g/l的番茄红素。

4. 权利要求3的方法，其中所述菌株能生产至少0.7 g/l的番茄红素。

5. 根据权利要求3的方法，其中，所述菌株能生产至少0.8g/l的番茄红素。

6. 根据权利要求3的方法，其中，所述菌株能生产至少1.5 g/l的番茄红素。

7. 根据权利要求3-6中任意一项所述的方法，其特征在于，所述菌株能生产占产生的总类胡萝卜素的至少70% w/w的番茄红素。

8. 根据权利要求3-6中任意一项所述的方法，其特征在于，所述菌株能生产占产生的总类胡萝卜素的至少80% w/w的番茄红素。

9. 根据权利要求3-6中任意一项所述的方法，其特征在于，所述菌株能产生高于4：1的番茄红素与β-胡萝卜素比率。

10. 根据权利要求7所述的方法，其特征在于，所述菌株能产生高于4：1的番茄红素与β-胡萝卜素比率。

11. 根据权利要求8所述的方法，其特征在于，所述菌株能产生高于4：1的番茄红素与β-胡萝卜素比率。

12. 根据权利要求3至6任一项的方法，其特征在于适宜培养基包含如下成分，所有所述成分都以g／100ml表示：

麦芽糖糖浆 8.0～14.0

玉米提取物	4.0～8.0
干面包酵母	0.03～0.07
KH_2PO_4	0.04～0.06
NaCl	0.1～0.5
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.005～0.015
硫胺素	0.0002
植物油	3.0～6.0
自来水	84.8～71.4。

13. 根据权利要求7的方法，其特征在于适宜培养基包含如下成分，所有所述成分都以g／100ml表示:

麦芽糖糖浆	8.0～14.0
玉米提取物	4.0～8.0
干面包酵母	0.03～0.07
KH_2PO_4	0.04～0.06
NaCl	0.1～0.5
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.005～0.015
硫胺素	0.0002
植物油	3.0～6.0
自来水	84.8～71.4。

14. 根据权利要求9的方法，其特征在于适宜培养基包含如下成分，所有所述成分都以g／100ml表示:

麦芽糖糖浆	8.0～14.0
玉米提取物	4.0～8.0
干面包酵母	0.03～0.07
KH_2PO_4	0.04～0.06
NaCl	0.1～0.5
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.005～0.015
硫胺素	0.0002

植物油 3.0～6.0

自来水 84.8～71.4。

无外源胡萝卜素生成抑制剂条件下在适宜培养基中生产高产量番茄红素的三孢布拉霉

发明领域

本发明涉及在适宜培养基中、无外源胡萝卜素生成抑制剂(carotenogenesis inhibitor)条件下生产高产量番茄红素的三孢布拉霉（*Blakeslea trispora; B. trispora*），一种用这些菌株进行的天然高效生产番茄红素的方法，一种特别适合该方法的培养基，以及一种适于任意类胡萝卜素化合物，优选为番茄红素，的分离方法。

发明背景

番茄红素是一种红色类胡萝卜素。其被发现以低水平存在于许多微生物中，并作为自然界中大部分类胡萝卜素的生物合成前体。然而，高水平含有该天然染料的来源却很罕见。同时，由于该化合物的抗氧化性及其它潜在有利特性，它已引起人们越来越高的商业兴趣。

目前，已知有几种方法可以生产番茄红素。第一种方法是化学合成法（Meyer（2002），Chemie in unserer Zeit 36（3）：178~192）。化学方法的一个缺点是不产生可视为与天然相同的产物。第二种方法是从番茄中提取（WO 97/48287 或 EP 608027）。番茄红素在番茄中的低含量使得从植物中提取成为一种很昂贵的方法。

番茄红素也可以经三孢布拉霉发酵产生。自二十世纪五十年代后期，三孢布拉霉已被用于β-胡萝卜素的生产。用于发酵生产番茄红素的首次尝试描述于 US 3097146。其中声称，在特定有利发酵条件下三孢布拉霉产生番茄红素，几乎无其它类胡萝卜素。然而，其中除给出整个发酵过程中的培养 pH 值高于 6.6 外，并没有清楚的公开这一特定有利发酵条件是什么。番茄红素的产量非常低，最高水平为 150 mg/l。其中没有给出试验数据来支持其声称的产生的类胡萝卜素基本

是纯番茄红素。

以后的方法中使用了特定的化学胡萝卜素生成抑制剂来阻止 β-胡萝卜素的形成并促进番茄红素的积累。这一技术的实例可以在 US 3369974、JP 48016189、JP 48016190、JP73016189、JP73016190、RU2102416、JP09313167、US3369974 中找到。通过该方法，番茄红素浓度上升至 1030 mg/l，同时也产生了 205 mg/l β-胡萝卜素。到目前为止，已经有许多化合物被测试用作番茄红素代谢抑制剂，但是没有发现有效的食品级化合物（Mehta &Cerdá-Olmedo（1999），Mycoscience 40：307～310）。

已知当 β-胡萝卜素的合成被阻断时，类胡萝卜素的生产就会出现问题。胡萝卜素生成作用受(+)和(-)菌株共培养时产生的性激素三孢酸的刺激。同时，β-胡萝卜素是三孢酸的前体，因此阻断 β-胡萝卜素的产生将降低所有类胡萝卜素的产生。WO 00/77234 教导，缺少充足的 β-胡萝卜素产生时胡萝卜素生成作用的刺激问题可通过外源添加三孢酸来解决。该申请描述了一种通过发酵产 β-胡萝卜素的三孢布拉霉来生产番茄红素的方法，或利用其突变体从而积累番茄红素。积累番茄红素的突变体已经在 Mehta B 等（1995，Appl. Microbiol.Biotechnol.，42：836～838）中描述。这样的产番茄红素突变体以下称作 Mehta 突变体。Mehta 突变体是诱变获得的，且在不添加任何抑制剂的琼脂平板上生产 200μg/g 干重的低番茄红素产量。Mehta 得出结论认为，由于 Mehta 突变体的低番茄红素产量，它在生物技术应用中是没有用处的。在 WO 00/77234 中，Mehta 突变体的番茄红素产量明显低于用产 β-胡萝卜素菌株并添加了咪唑作为抑制剂获得的产量，因为 Mehta 突变体的最高番茄红素产量大约是相同条件下用产 β-胡萝卜素菌株并添加了咪唑作为抑制剂获得的 4%。尽管由于其中没有给出容积产率使得难于与本领域现有技术进行比较，但是假定生物质产量为 50 g/l（这已经是真菌摇瓶培养的高估值），我们计算得出 Mehta 突变体生产的番茄红素最大浓度约为 60 mg/l。这一产量估算仍然低于自上述更早期的 US 3097146 中获得的产量。

因此，仍然需要通过自然发酵和分离过程更有效得到高番茄红素产量的方法。本发明提供了这样一种方法：用新的三孢布拉霉菌株在微生物适宜培养基中生产番茄红素，该培养基不含有任何外源特定胡萝卜素生成抑制剂，而仅含有发酵中常规使用的组分。本发明菌株的优点是，允许在发酵过程中产生番茄红素，其中不存在危害这一过程天然性质的化合物，不添加危害所产生的番茄红素食品级性质的产品。

发明详述

与本领域已知的番茄红素生产方法相比，本发明提供了在发酵通常使用的适宜培养基中、不添加任何外源添加剂以抑制胡萝卜素形成途径的情况下的高番茄红素产量。这是通过使用经化学诱变和筛选获得的突变体来实现的。鉴于先前经传统诱变技术得到的突变体的特征（1995，Appl. Microbiol. Biotechnol.，42：836～838），能得到这样的突变体是非常令人惊讶的。

本发明首先涉及三孢布拉霉菌株，当在缺少外源特定胡萝卜素生成抑制剂的适宜培养基中、与一适宜相反接合型三孢布拉霉菌株共培养至少三天时，它能够生产至少 0.3 g/l 番茄红素。优选生产至少 0.5 g/l 番茄红素，优选至少 0.7，优选至少 0.8，更优选至少 1.0，最优选至少 1.2 和甚至最优选至少 1.5 g/l。番茄红素的量测定于发酵过程末期。

在一个优选实施方式中，适宜培养基意指一种只包含发酵培养基中通常使用成分的培养基。这样，就不存在危害该过程天然性质的化合物和/或不添加危害所产生的番茄红素食品级性质的产品和/或不添加昂贵的添加剂。

该培养基不包含任何外源胡萝卜素生成抑制剂。在本发明上下文中，胡萝卜素生成抑制剂是一种特异性阻止 β-胡萝卜素形成并促进番茄红素积累的物质。胡萝卜素生成抑制剂也可以定义为一种特异性抑制番茄红素代谢的物质。唯一可能存在于发酵过程中的特定胡萝卜素生成抑制剂是那些可能由菌株自身产生的。胡萝卜素生成抑制剂的例

子是描述于 W0200077234、US 3369974、JP 48016189 和 JP 48016190、Mehta &Cerdá-Olmedo（1999）、Cerdá-Olmedo & Hütterman（1986）Angewandte Botanik 60：59～70、JP 73016189、J'P 73016190、RU 2102416、JP 09313167、US 3369974 中的那些。这些抑制剂可能是 N-杂环化合物，例如咪唑、吡啶、吗啉以及它们的取代衍生物或叔胺化合物。在本发明上下文中，硫胺素不被视作叔胺。硫胺素是三孢布拉霉的一种基本维生素，因此应当存在于发酵培养基中。

优选地，与无胡萝卜素生成抑制剂存在的情况相比，胡萝卜素生成抑制剂能够阻止至少 10% w/w 的 β-胡萝卜素形成并同时促进至少 10% w/w 的番茄红素形成。优选地，至少 20%的 β-胡萝卜素形成被阻止，更优选至少 30%，甚至更优选至少 40%，最优选至少 50%和甚至最优选至少 60%，至少 70%，至少 80%，至少 90%，至少 95%，至少 99%。

优选地，发酵过程中不添加三孢酸。如果发酵过程中未添加三孢酸，其中可能存在的三孢酸的唯一来源是由菌株自身产生的天然三孢酸。

优选地，适宜培养基包含一或多种碳源、一或多种氮源、矿物盐和硫胺素。可添加的碳源是简单或复杂的营养物并包括碳水化合物或脂肪，例如糊精、淀粉、葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖、麦芽糖糊精、动物或植物油。适宜培养基优选具有有机或无机的可同化氮源，例如大豆粉、玉米粉、可溶馏出物、酵母提取物、棉籽粉、蛋白胨、酪蛋白、氨、铵盐、硝酸盐、玉米提取物、玉米浸渍固体(corn steep solid)和玉米浆，等。优选存在于适宜培养基中的矿物盐包括磷酸盐、硫酸盐、氯化物、钠、钾、铵、钙、镁。营养物的比例可根据三孢布拉霉菌株的生长需求以及番茄红素的产量水平来决定。优选发酵在含氧条件及浸没培养下进行。优选地，如本申请进一步所述，适宜培养基中包含高含量的蔗糖作为碳源。最优选的培养基如下面的表 1 所示。发酵过程可在介于 20 和 34℃之间的温度下进行。作为选择，发酵过程可以在该范围内的两个或更多个不同温度下进行，以允许该过程随后

阶段的独立优化。优选，在发酵的第一个步骤中可以选择适合宿主最适宜生长的温度，第二个步骤中选择适合宿主最适宜生产番茄红素的温度。更优选，适宜番茄红素生产的温度低于适宜宿主生长的温度。这两个温度都介于20和34℃之间。优选，适宜生长的温度介于25和32℃之间，更优选为32℃，和适宜番茄红素生产的温度介于20和25℃之间，更优选为22℃。

作为选择，根据另一优选实施方式，发酵方法为补料分批发酵法。在该补料分批发酵过程中，除在发酵起始时向适宜培养基中供给一种或多种营养物外，还通过在发酵过程中饲喂发酵系统来供应这些营养物。作为选择，通过在发酵过程中饲喂发酵系统来供应一种或多种营养物；从而补充发酵过程中消耗的营养物。补料分批系统的一个优点是可以避免出现不合需要的高浓度营养物，如蔗糖。另一种可以通过饲喂供给的潜在有害营养物是氨，或任何其它不适宜高浓度的营养物。补料分批发酵的第二个优点是，可以在某一种营养物耗竭后通过饲喂该营养物来延长发酵。补料分批法的使用常常导致产生更高的生物质浓度及更高的产物浓度。

考虑到不同类胡萝卜素的特征吸收峰，发酵过程结束时的类胡萝卜素浓度可在类胡萝卜素提取后经分光光度测定。作为选择，类胡萝卜素可经HPLC或其它层析法分离，之后可以在同一吸收波长下进行检测，或再在不同类胡萝卜素特异的不同波长下进行检测。需要特别注意类胡萝卜素立体异构体的出现，它们具有不同的层析或光谱特性。本领域已知，生物合成途径的主要产物是反式异构体，且在样品处理或产物分离过程中可能发生不同程度的向不同顺式异构体转变的异构化作用。因此，类胡萝卜素种类的总产量水平应视为其所有立体异构体水平的总和。

要测定所有类胡萝卜素的所有异构体可能会比较困难。因此，根据两种易检测产物的比率来描述胡萝卜素生成作用突变体的特征会更方便些。在本发明上下文中，两种最重要的类胡萝卜素是作为亲本菌

株主要产物的β-胡萝卜素和作为突变体主要产物的番茄红素。可通过样品中出现的番茄红素与β-胡萝卜素的比率来描述突变体和处理条件的特征。作为选择，可以用产生的总番茄红素占存在的总类胡萝卜素的百分含量来描述突变体的特征。因而，在本发明上下文中（除非另外指明）番茄红素的浓度、β-胡萝卜素的浓度分别各自对应于顺式和反式番茄红素浓度总量、及顺式和反式β-胡萝卜素浓度总量。由于存在多种类胡萝卜素，β-胡萝卜素和番茄红素的总量约占菌株产生的类胡萝卜素总量的90% w/w（除非另外指明）。

根据一种优选实施方式，当在缺少外源特定胡萝卜素生成抑制剂的适宜培养基中与一适宜相反接合型三孢布拉霉菌株共培养至少三天时，所用菌株能够生产至少70% w/w番茄红素和低于20% w/w的β-胡萝卜素，优选至少75%低于15%，更优选至少80%及低于10%，最优选至少85%及低于5%。此处给出的百分数分别代表番茄红素与β-胡萝卜素占菌株生产的类胡萝卜素总量的百分数。

根据一种优选实施方式，当在缺少外源特定胡萝卜素生成抑制剂的适宜培养基中与一适宜相反接合型三孢布拉霉菌株共培养至少三天时，所用菌株生产至少70% w/w番茄红素，优选至少75%，更优选至少80%，最优选至少85%。此处给出的百分数代表番茄红素占菌株产生的类胡萝卜素总量的百分数。

根据一种更优选实施方式，当该菌株在缺少外源特定胡萝卜素生成抑制剂的适宜培养基中与一适宜相反接合型三孢布拉霉菌株共培养至少三天时，所用菌株产生一种类胡萝卜素混合物，其中番茄红素与β-胡萝卜素的比率高于4：1。在另一优选实施方式中，菌株生产以番茄红素为主要成分的类胡萝卜素混合物。在另一优选实施方式中，菌株生产包含由八氢番茄红素形成β-胡萝卜素这一生物合成途径的类胡萝卜素混合物。

根据本发明进一步的方面，提供其中番茄红素与β-胡萝卜素的比率高于4：1的类胡萝卜素混合物。优选地，提供以番茄红素为主要成分的类胡萝卜素混合物。在另一优选实施方式中，提供包含由八氢番

茄红素形成β-胡萝卜素这一生物合成途径的类胡萝卜素混合物。在另一优选实施方式中，提供包含如上述定义的类胡萝卜素混合物的生物质。相应地，该生物质可被进一步用于饲料、食品或化妆品应用。

所提供的最优选类胡萝卜素混合物包含:

0～5 w％ 链孢红素，0～5 w％ 八氢番茄红素，0～10 w％β-胡萝卜素，5～20 w％β-胡萝卜素，70～90 w％番茄红素。甚至最优选的混合物包含：0～2 w％ 链孢红素，0～2 w％ 八氢番茄红素，0～5 w％β-胡萝卜素，5～15 w％β-胡萝卜素，80～90 w％ 番茄红素。

本发明的菌株可通过化学诱变和筛选获得。本领域已知多种诱变方法（例如参见Rowlands（1984），Enzyme Microb. Technol. 6：3～10）。其中一种方法是用诱变化合物处理，包括亚硝基胍（NTG）、甲基磺酸乙酯（EMS）、或硝基喹啉氧化物（NQO）。另一种方法是用诱变射线处理，例如紫外线、γ-射线或X-射线。谈到选择方法，根据于琼脂培养基上培养出现的菌落颜色偏离选择胡萝卜素生成作用突变体是特别有效的，但是也可以用其它标准，例如菌落和菌丝形态、孢子形成特征、生长速率、对抑制性化合物或应激条件的抗性，和其它在菌株改良方案中通常使用的方法。

根据最优选实施方式，产番茄红素菌株是*三孢布拉霉lyc26(-)*。该菌株是以产β-胡萝卜素亲本菌株*三孢布拉霉111(-)*为起点、1-甲基-3-硝基-亚硝基胍（NG）和γ-射线为诱变因素、经多轮诱变和筛选获得的。当与该种的适宜(+)菌株（例如在生产β-胡萝卜素中使用的菌株）在如上所定义的适宜生长培养基中共培养生长时，菌株*lyc26(-)*将生产以番茄红素作为最丰富的类胡萝卜素，番茄红素占总类胡萝卜素超过70%。*三孢布拉霉lyc26(-)*已经以三孢布拉霉VKPM F-822保藏于俄罗斯国立工业微生物保藏中心（All-Russian Collection of Commercial Microorganisms），因此其可为公众获得。番茄红素是由*lyc26(-)*在所有测试培养基上产生的主要类胡萝卜素。优选本发明的突变体培养于如本申请进一步所定义的以高含量糖为碳源的培养基上。最优选，突变体培养于表1所示的培养基上。优选地，所用的菌株具有与以VPKM

F-822 保藏的菌株基本相同的特征。

根据另一优选实施方式，所用菌株衍生自以 VPKM F-822 保藏的菌株，或者是以 VPKM F-822 保藏的菌株的子代菌株。

本发明进一步涉及如上述定义的菌株在生产番茄红素中的用途，优选通过实施例 8 中所述方法。

根据本发明进一步的方面，提供了一种以高含量糖为碳源的适宜培养基。以高含量糖为碳源是指以高含量易于同化的糖为碳源。这样一种培养基高度适合三孢布拉霉突变体生产番茄红素。在该方面，易于同化的糖定义为，主要由单糖和二糖组成的混合物。这样的碳源例子包括右旋糖、葡萄糖、果糖和高麦芽糖糖浆。相反，传统用于 β-胡萝卜素生产的生产培养基含有以淀粉（如大豆粉和玉米粉）为主要可同化糖来源的碳源，例如表 3 所示的培养基。作为选择，已使用了含有易于同化的糖源以及其它碳源的培养基，例如表 11 所示的培养基。设计这些培养基的基本原理是，易于同化的碳被认为能抑制类胡萝卜素形成，尽管它非常适于生长。令人惊奇的是，在以易于同化的糖为主要碳源的生产培养基上，三孢布拉霉突变体的番茄红素生产非常有效。优选地，这些培养基含有占其碳至少 50%的易于同化的糖，更优选至少 60%，甚至更优选至少 70%，且最优选至少 80%。这些百分数中还考虑了氮源中所含的碳。根据另一优选实施方式，这些培养基包含至少 5% w 易于同化的糖，更优选至少 6% w 和最优选至少 10% w。

最优选地，培养基如以下表 1 所定义。

整个发酵过程中未发现 pH 是影响番茄红素产量的关键因素。灭菌前的 pH 可介于 6.2 至 8.4 之间，优选介于 7.5 和 8.4 之间。

表 1：优化培养基（所有成分以 g/100 ml 表示）：

麦芽糖糖浆	8.0 ~ 14.0
玉米提取物	4.0 ~ 8.0
面包酵母（干重）	0.03 ~ 0.07
KH_2PO_4	0.04 ~ 0.06
NaCl	0.1 ~ 0.5
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.005 ~ 0.015
硫胺素	0.0002
植物油	3.0 ~ 6.0
自来水	84.8 ~ 71.4
灭菌前 pH	6.0 ~ 8.4

本发明还涉及如上所述优选培养基或优选如表 1 所示培养基在用合适宿主生产番茄红素中的应用。

本发明另一方面涉及用上述菌株在适宜培养基中与一适宜相反接合型三孢布拉霉菌株至少共培养三天生产番茄红素的方法。优选地，所用适宜培养基是本说明书中如上定义的适宜培养基。根据另一优选实施方式，该方法在一种如上所述的外源特定胡萝卜素生成抑制剂存在下完成。根据另一优选实施方式，该方法在外源三孢酸存在下完成。更优选，该方法用如上述表 1 所定义的优化培养基完成。培养可以以多个阶段完成，例如分开的营养和生产阶段。各接合型的营养阶段可以是分开的，之后进行联合的生产培养。生产培养也可以仅从一种接合型开始，在之后真正的生产阶段开始时加入另一接合型。优选地，菌株共培养至少两天，更优选至少三天，甚至更优选至少四天和最优选至少五天。共培养后，通过例如巴斯德灭菌法灭活培养液，并经例如过滤收集生物质。之后，生物质可进一步经干燥、真空干燥、流化床干燥或带式干燥而稳定化。

在又一优选实施方式中，番茄红素不从菌丝体分离。提供含有如

上定义的类胡萝卜素混合物的生物质。相应地，生物质可以被进一步用于饲料、食品或化妆品应用。

作为选择且更优选地，番茄红素经任一用于细胞破裂以使细胞内容物得以释放的方法分离自湿或干的菌丝体。番茄红素可进一步溶解于任一它在其中可溶的溶剂。自菌丝体分离番茄红素的两种优选方法是：抽提或离析(isolation)。优选地，可以用合适的溶剂，例如醇、酮或酯（例如丙酮或乙酸乙酯），烷（如正己烷）进行抽提。作为选择，可通过超临界抽提完成，例如用 CO_2，或者可以用一种有机溶剂作为辅溶剂。

作为选择且更优选地，这可以通过直接离析法完成，其特征是使用与水不混容的溶剂且含类胡萝卜素层的分离如WO 01/55100中所述进行，该WO 01/55100在此引作参考。根据最优选实施方式，所用的直接离析法是后面所述的方法。

根据本发明进一步的方面，提供了一种直接离析方法，它是一种制备结晶类胡萝卜素化合物的方法，所述方法包括以下步骤：

（a）破碎含类胡萝卜素细胞，优选来自微生物来源，

（b）用适于去除脂质的溶剂，优选乙酸乙酯，更优选正丁醇，洗涤结晶类胡萝卜素破碎细胞混合物，并分离含类胡萝卜素层，

（c）用pH值为9～12的碱、在10～95℃，优选30～85℃，最优选50～75℃、可选择地含有低级醇的条件下，处理步骤（b）中得到的适当的结晶类胡萝卜素层，

（d）选择性向碱处理过的结晶类胡萝卜素悬浮液中添加盐，

（e）选择性自液相分离结晶类胡萝卜素悬浮液，

（f）选择性用含盐水溶液洗涤结晶类胡萝卜素悬浮液，

（g）选择性用酸性水溶液洗涤结晶类胡萝卜素悬浮液；洗涤溶液的pH值优选介于1和5之间，更优选介于2和4之间，并且选择性含有低级醇；低级醇/水混合物中低级醇与水的比率优选介于5：1和1：5之间，更优选介于1：1和1：2。

（h）在第一个洗涤程序中用低级醇洗涤结晶类胡萝卜素悬浮液，此处步骤（b）~（e）和（f）的顺序是任意的，

（i）在第二个洗涤程序中用水或低级醇与水的混合液洗涤经步骤（a）~（f）得到的类胡萝卜素粗晶体，

（j）用新鲜溶剂洗涤晶体，并

（k）干燥晶体。

含类胡萝卜素的微生物细胞可经任一适宜的发酵方法对理想的产类胡萝卜素微生物发酵获得。含类胡萝卜素的微生物可以是细菌、真菌、藻类或酵母。优选为 *Mucorales* 目真菌，优选三孢布拉霉，杜氏虫（*Dunaliella*）属藻类，或 Phaffia 属酵母，优选 *Phaffia rhodozyma*。更优选，含类胡萝卜素的微生物是前面定义的三孢布拉霉突变体。该方法可以分离任一已知类胡萝卜素化合物。优选的类胡萝卜素化合物是番茄红素、β-胡萝卜素、八氢番茄红素和虾青素。

步骤（a）

最终得到的含微生物细胞和发酵液的发酵培养液可直接用于类胡萝卜素晶体的分离。作为选择，实施本发明方法之前，微生物细胞可用任一适合的方法，例如过滤或离心，自发酵液中分离。

用机械、化学和/或酶处理破坏细胞壁将含类胡萝卜素微生物细胞打开。例如，细胞可以接受匀浆、超声波裂解、自溶、渗透裂解和/或质壁分离，选择性加入适宜的试剂例如去污剂、酸、碱、酶、自溶增强物质、渗透剂如盐，和/或质壁分离试剂。这样，结晶类胡萝卜素破碎细胞混合物自细胞释放出来。

步骤（b）

随后进一步纯化如此获得的结晶类胡萝卜素破碎细胞混合物。

为提高回收过程的产量，用适宜除去 a.o.脂质的溶剂洗涤结晶类胡萝卜素破碎细胞混合物，优选不与水混溶的有机溶剂，结晶类胡萝卜

素在该溶剂中具有低溶解度。以结晶类胡萝卜素悬浮液量的 1 %至100%的量添加溶剂，优选 10 %至 40%，更优选 20%至 30%。应当注意的是，去除脂质所必需的溶剂量大大低于从微生物生物质中用溶剂提取类胡萝卜素所必需的量。优选与水不混溶的溶剂是己烷或乙酸乙酯。优选溶剂为乙酸乙酯。另一优选溶剂是醇，例如异丙醇或正丁醇。正丁醇也称作 1-丁醇。最优选，溶剂是正丁醇。

本发明所指的洗涤包括一个在合适量的所选溶剂中悬浮或搅拌要洗涤的材料的步骤和一个倾析或离心以及随后回收适当层的步骤。

步骤（c）

下一纯化步骤包括：用碱处理获自前面步骤的适当结晶类胡萝卜素层。碱处理包括向类胡萝卜素层添加 pH 介于 9 和 12 的碱性水溶液及随后在介于 10～95℃，优选介于 30～85℃，更优选介于 50～75℃下温育一段合适的时间，优选同时搅拌。碱性溶液与类胡萝卜素层的比率可便利地在约 5∶1 至约 1∶1（w/w）间变化。碱处理时间典型依赖于所用的 pH 和温度，处理时使用的 pH 和温度越低，处理的时间应当越长。例如，pH 为 12、75℃下可以在 2 小时内完成碱处理，或 pH 为 10、50℃下为 8 小时。选择性地，可以在低级醇存在下进行碱处理。

步骤（d），（e），（f）

碱处理后，可选择性向碱处理过的结晶类胡萝卜素层加入水溶性盐，如氯化钠，更优选乙酸钠。随后结晶类胡萝卜素层可以自液相分离，并选择性用含盐水溶液洗涤。结晶类胡萝卜素层的分离可以用本领域已知的任一方法实施，例如过滤、离心或冷却。

在进行下一个纯化步骤之前，可以用水一次或多次洗涤结晶类胡萝卜素层。

步骤（g）

类胡萝卜素粗晶体可以选择性地用第二个洗涤程序进一步纯化，包括用水或低级醇与水的混合液洗涤晶体一次或更多次。洗涤溶液的pH值优选介于1和5之间，更优选介于2和4之间。可用任一适宜的酸，例如硫酸或盐酸，或酸性缓冲液，例如硼酸/盐酸缓冲液或柠檬酸/盐酸缓冲液，将水酸化。低级醇/水混合物中低级醇与水的比率优选介于5∶1和1∶5之间，更优选介于1∶1和1∶2之间。

随后用任一适宜的方法，例如过滤或离心将晶体自液相分离。

步骤（h），（i）

接着结晶类胡萝卜素层接受包括用低级醇洗涤悬浮液的第一个洗涤程序，产生粗类胡萝卜素晶体。该第一洗涤程序可以重复一次或多次。

典型地，根据本发明完成的洗涤步骤包括，用洗涤液搅拌结晶类胡萝卜素层或（粗）类胡萝卜素晶体及随后自液相分离结晶类胡萝卜素层或晶体。

优选地，如上所述的方法步骤（a）~（g）以（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）的顺序完成。根据另一优选实施方式，如上所述的方法步骤（a）~（g）按（a）、（g）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）的顺序完成。

贯穿本发明，低级醇被定义为（C_{1-6}）醇，例如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇和1-丁醇。本发明中所用的低级醇可以是单一醇或者可以是两种或多种醇的混合物。优选地，低级醇是乙醇、1-丁醇或1-丁醇与乙醇的混合物。

步骤（j）

此后，用新鲜溶剂洗涤晶体一次或多次。新鲜溶剂是一种低级醇，

优选乙醇，或一种低级醇的乙酸酯，优选乙酸乙酯。更优选地，该新鲜溶剂为食品级溶剂。

在本发明一个优选实施方式中，在最初的两个洗涤结晶类胡萝卜素悬浮液步骤中所用的低级醇和在最终洗涤晶体步骤中所用的新鲜溶剂是同一种溶剂。

步骤（k）

本发明方法的最后步骤是干燥晶体。

与传统用于结晶类胡萝卜素分离的提取/结晶方法相比，本发明的一个主要优点是，对类胡萝卜素提取避免了有机溶剂的使用。因此，在最终的类胡萝卜素化合物晶格中基本没有溶剂。

在本发明另一方面，本发明的方法被用于提高任一粗结晶类胡萝卜素组合物，优选任一粗结晶类胡萝卜素悬浮液，的类胡萝卜素含量。

本发明进一步通过以下实施例阐明。

实施例

实施例 1. 菌株分离及特征

*三孢布拉霉菌株 lyc26(-)*是以产 β-胡萝卜素亲本菌株*三孢布拉霉 111(-)*为起点、1-甲基-3-硝基-亚硝基胍（NG）或 γ-射线为诱变因素、经多轮诱变和筛选获得的。于含 10%甘油和 5%乳糖的水溶液中制备孢子悬浮液（10^6～10^7 孢子每 ml），以进行诱变处理。进行 NG 诱变时，采用溶于 100 mM Tris-HCI 缓冲液（pH= 8.0）中、浓度为 150μg/ml 的 NG 溶液。进行 γ-射线诱变时，使用剂量为约 1 Mrad。在这两种方法中，诱变程度以达到 1 %孢子存活为准。培养于麦芽汁琼脂平板上时，根据其红色特征来选择产番茄红素突变体。

菌株 *lyc26(-)*表现以下形态学特征：

在麦芽汁琼脂上:

菌落生长: 受抑制

气生菌丝体: 轻微绒毛状，相互交织，淡红色

孢子形成: 少

在 SM 17-1 琼脂上:

菌落生长: 受抑制具扁平状菌落

气生菌丝体: 密集，粉红色，具轻微突起的中心

孢子形成: 很少

*lyc26(-)*菌株特征稳定。该菌株为非致病性的。

SM 17-1 琼脂具有如下表 2 所示的组分。

表 2: SM 17-1 培养基（浓度以 g/l 表示）:

葡萄糖	3
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05
L-天冬酰胺	0.2
KH_2PO_4	0.2
酵母提取物	0.1
脱氧胆酸钠	0.1
硫胺素	0.00002
琼脂（Difco）	20

实施例 2：在琼脂平板上的番茄红素生产

在以广范围的单糖或二糖（例如: 葡萄糖，阿拉伯糖，果糖，乳糖，麦芽糖）作为碳源的改良 SM 17-1 琼脂上，当用浸透了 β-胡萝卜素生产培养物提取物的滤盘覆盖菌落时，*三孢布拉霉菌株 lyc26(-)*的菌丝体呈现深红色。显然，在用于 β-胡萝卜素生产的三孢布拉霉(+)和(-)菌株的接合培养中产生的三孢酸，对刺激突变体 *lyc26(-)*的番茄红素生产是有效的。用于 β-胡萝卜素生产培养的菌株是亲本菌株 111(-)和(+)

菌株 VPKM F-820 或 VPKM F-821。

实施例 3. 在摇瓶中的番茄红素生产

用本领域公知适于 β-胡萝卜素生产的玉米－大豆培养基联合培养*三孢布拉霉菌株 lyc26(-)*和合适的三孢布拉霉(+)菌株生产番茄红素。本实施例中，以菌株 VPKM F-820 与 VPKM F-821 为(+)菌株。

将(-)和(+)菌株于 28℃下分别暗培养于麦芽汁琼脂斜面上 20 小时，之后于 22℃下用日光灯光照培养 8～12 天。用蒸馏水将气生菌丝体和孢子自琼脂表面洗脱以获得种子材料。

将由此获得的悬浮液接种于含有 50ml 表 3 所示液体培养基的 750 ml 锥形瓶中。

表 3：液体培养基（所有成分以 % w/v 表示）：

玉米粉	4.7
大豆粉	2.3
KH_2PO_4	0.05
硫胺素	0.0002
自来水	平衡
pH	灭菌前用 NaOH 调节至 6.2～6.7
灭菌	120℃，45 分钟

26～27℃下将(-)和(+)菌株置于摇床（250 rpm）上分别培养 48 小时。将获得的培养悬浮液接种于 750 ml 生产瓶，瓶中含有 50ml 具有表 4 所示组分的生产培养基（1）。

表 4：生产培养基（1）（% w/v）。

玉米粉	1.73
大豆粉	4.0
KH_2PO_4	0.05
硫胺素	0.0002
葵花子油	8.0
自来水	平衡
pH	灭菌前用 NaOH 调节至 6.1～6.5
灭菌	120℃，45 分钟

用 10 ml (-)菌株培养物和 1 ml (+)菌株培养物接种。

随后，将生产瓶于 26～27℃下摇床（250 rpm）培养 5 天。

5 天后，将 0.5ml 液体培养物样品用 1ml 水稀释，离心。将离心物重悬于 1 ml 96%乙醇，离心。收集离心物，用氯仿于 Potter 管中匀浆。收集氯仿，并继续用新鲜氯仿进行匀浆。重复该步骤直至氯仿部分不再变色。汇集所收集的氯仿部分，并用氯仿将总量调节至 10 ml。HPLC 测定 β-胡萝卜素和番茄红素的生产水平（表 5）。用 95 ml 丙酮稀释 0.5 ml 氯仿抽提物来制备用于分析的样品。本实施例中，检测了 β-胡萝卜素和番茄红素的存在。没有如实施例 6 中所进行的那样检测其它*微量*类胡萝卜素的存在。表 5 中最后一栏所计算的番茄红素含量表示产生的番茄红素量与产生的番茄红素和 β-胡萝卜素量的比率。

表 5：接合菌株对生产培养基（1）上 β-胡萝卜素和番茄红素生产水平的影响

三孢布拉霉菌株		浓度（ g/l）		合成的总类胡萝卜素中番茄红素的含量，%
(-)	(+)	β-胡萝卜素	番茄红素	
lyc26	VPKM F-820	0.05	0.31	86.0
lyc26	VPKM F-821	0.18	0.74	80.0

显然，突变体 *lyc26(-)*以番茄红素作为主要的类胡萝卜素产物，无论接合培养所用的(+)菌株如何，它的番茄红素产量比它的β-胡萝卜素产量都高 4～5 倍。同样明显的是，突变体产生的绝对类胡萝卜素水平很大程度依赖于与适宜(+)菌株的相互作用，不同(+)菌株可能给出更好或稍好的结果。

在一个对比试验中，用相同的(+)菌株组和相同的试验条件检测了产 β-胡萝卜素亲本菌株 111 的番茄红素和 β-胡萝卜素产量。菌株 111 的番茄红素产量低于 0.03 g/l。菌株 111 的 β-胡萝卜素产量介于 2.8 和 3.4 g/l 之间。

实施例 4. 改良培养基中的番茄红素生产

如实施例 3 所述用相同的菌株制备(+)和(-)菌株各自的种子培养物。但是，此处(+)菌株的预培养只进行 24 小时。将(-)和(+)菌株的悬浮液接种于具如表 6 所示组分的生产培养基（2）。

表 6: 生产培养基（2）（% w/v）

麦芽糖糖浆	12.0
玉米提取物	6.0
面包酵母（干重）	0.05
KH_2PO_4	0.05
NaCl	0.3
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01
硫胺素	0.0002
植物油	4.0
自来水	平衡量
灭菌前 pH	8.0

110℃下灭菌 30 分钟。

生产培养的培养条件和分析过程与实施例 3 相同。结果示于表 7。

该实施例中，检测了β-胡萝卜素和番茄红素的存在。没有如实施例 6 中所进行的那样检测其它*微*量类胡萝卜素的存在。表 7 中最后一栏所计算的番茄红素含量表示产生的番茄红素量与产生的番茄红素和β-胡萝卜素量的比率。

表 7: 接合菌株对生产培养基（2）上β-胡萝卜素和番茄红素生产水平的影响

三孢布拉霉菌株		浓度（ g/l）		合成的总类胡萝卜素中番茄红素的含量，%
(-)	(+)	β-胡萝卜素	番茄红素	
lyc26	VPKM F-820	0.14	1.74	93.0
lyc26	VPKM F-821	0.03	1.41	98.0

显然，培养基（2）比培养基（1）有利于突变体产生更高的番茄红素生产水平（比较表 5 和 7）。就番茄红素与β-胡萝卜素之比而言，生产培养基（2）也优于培养基（1）（比较表 5 和 7）。该实施例中，用于接合的(+)菌株 VPKM F-820 比 VPKM F-821 得到更高的番茄红素产量。在实施例 3 中，就所产生的番茄红素而言，VPKM F-821(+)菌株产生了最令人满意的结果。这很可能是由于已知的优化(+)/(-)菌株比例的问题导致的：在不同培养基中不同菌株可能具有不同的生长速率，这预期会导致在生产阶段出现各菌株实际生物量的不同并因此导致番茄红素产量的不同。对本领域人员来说，一旦其它试验条件（例如培养基）已经选定，则优化接合菌株比率是普通技能。

在一个对比试验中，在该改良培养基中用相同的(+)菌株组和试验条件检测了产β-胡萝卜素亲本菌株 111 的番茄红素产量。菌株 111 的番茄红素产量不高于 20 ~ 30 mg/l，而该亲本菌株在这一培养基中的β-胡萝卜素产量达到了 2.5 至 3.2 g/l。

我们得出结论，亲本菌株 111 的β-胡萝卜素生产不受所用培养基的影响（与实施例 3 比较）。该改良培养基高度适于 *lyc26* 突变体生产番茄红素。

实施例 5. 在 10 L 发酵罐中的番茄红素生产。

除用含 200 ml 如下所述培养基的 2000 ml 的瓶子之外，如实施例 3 所述用相同的菌株制备(+)和(-)菌株各自的种子培养物。为获得充足的用于发酵罐培养的接种材料使用了多个瓶子。

生产培养基（3）是以实施例 4 中所用培养基为基础的，但进行了一些改良，如表 8 所示的使用了工业上可获得的原材料以更易于放大至更大用量。

表 8: 生产培养基（3）（浓度以 g/kg 表示）

Sweet M syrup（Cerestar）	75
80％干物质（其中 68％为麦芽糖）	
玉米浸渍固体	30
Engevita 干灭活酵母（DSM）	5
KH_2PO_4	-
NaCl	3
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1
硫胺素	0.002
大豆油	5 ml
自来水	平衡量
灭菌前 pH	用 NaOH 调节至 6.7

120℃下灭菌 120 分钟。

32℃下，于初始培养基含量为 4 kg 的 10L 发酵罐中完成生产培养，搅拌速度为 200 rpm，每分钟通气 6 L。需要时添加防沫剂 Basildon（Basildon Chemical Co.，Abingdon，UK），溶解氧始终高于 25%饱和度。将一瓶 1000 g(-)菌株的成熟种子培养物、500 g (+)菌株的成熟种子培养物和 120 g 灭菌大豆油的混合物接种于培养基。接种后，培养温度保持在 32℃ 48 小时。将温度调至 22℃后，再继续培养 72～120

小时。不控制培养物 pH 值。起始值为 6.2，随后至发酵结束 pH 升高直至 6.8。

每隔固定时间取样用于分析。一部分样品直接用于番茄红素的分光光度分析和液体培养基的干物质含量分析。另一部分样品进行匀浆，并于－20℃冷冻以用于之后如实施例 6 所述更详细的类胡萝卜素光谱分析。

为进行光谱分析，用 3 体积水稀释 0.5 ml 液体培养基并离心。将离心物部分重悬于 1.5 ml 96%乙醇，离心。

将离心物转移至 Potter 管中，用氯仿处理直至所有颜色都被抽提至氯仿部分中。过滤氯仿部分以除去其中的颗粒物质。将部分抽提物用 100 倍丙酮稀释以用于 507 nm 下的吸收测量，以丙酮空白作对照。发酵 5 天后，两次测量番茄红素水平达到 1.36 和 1.60 g/l。液体培养基中的干物质含量为 42 g/kg，因此生物量中的平均番茄红素含量为 3.5%。

实施例 6. 类胡萝卜素光谱分析

融化实施例 5 中获得的冷冻样品。向 250 mg 样品中加入玻璃珠（5 g），剧烈振荡该混合物 30 秒。随后，添加 2 ml 氯仿和吡啶的混合物（200∶1 体积比），剧烈振荡样品 90 分钟。之后添加 8 ml 溶于丙酮的抗氧化剂 BHT（丁基羟基甲苯）（100mg/l），并将整个样品彻底混匀。之后，3000 rpm 下离心 5 ml 该溶液 5 分钟，用 Beckman Ultrasphere ODS 柱并以 800 ml 乙腈、200 ml 甲醇、80 ml 己烷和 1ml 三乙胺的混合物为流动相，经 HPLC 测定上清部分的类胡萝卜素光谱，在多个波长检测不同的峰。

用于检测特定类胡萝卜素的波长及用于修正的消光系数示于下表 9。

表 9: 检测波长（nm）和消光系数（E.C.）

	β-胡萝卜素			番茄红素		γ- 胡萝卜素	链孢红素	八氢番茄红素
	反式	9-顺式	13-顺式	反式	顺式			
波长	454	454	454	505	505	469	469	290
E.C.	2592	2174	1655	3150	1150	2600	2600	800

根据它们在特定波长下的吸收计算相对类胡萝卜素量，其中修正了它们的消光系数误差。得到如表 10 中所列的以下类胡萝卜素相对量。

表 10: 由突变体产生的类胡萝卜素混合物

类胡萝卜素	相对量
反式-番茄红素	78.3 %
顺式-番茄红素	4.6 %
反式-β-胡萝卜素	10.4 %
13-顺式-β-胡萝卜素	0.3 %
γ-胡萝卜素	3.5 %
链孢红素	1.1 %
八氢番茄红素	1.9 %

显然，番茄红素是由*三孢布拉霉菌株 lyc26(-)*产生的最丰富的类胡萝卜素。经三孢布拉霉的生物合成途径产生的番茄红素形式是反式-立体异构体。在番茄红素样品处理或分离过程中，依赖于处理条件发生不同程度的向顺式形式的异构化作用。产生的总番茄红素（反式和顺式）相对量是 82.9%。产生的总 β-胡萝卜素（反式和顺式）相对量是 10.7%。我们发现番茄红素与 β-胡萝卜素的比率是 7.7。

实施例 7. 摇瓶中番茄红素和 β-胡萝卜素生产培养基的类胡萝卜素光谱的比较

根据实施例 3 中所述的方法用相同菌株完成摇瓶试验。用相同接种和种子培养方法完成了一个平行试验，但是使用的是适于 β-胡萝卜素的生产培养基。该 β-胡萝卜素生产培养基具下列如表 11 中所列组分。

表 11：β-胡萝卜素生产培养基（% w/v）

右旋糖（Boom）	3
玉米浸渍固体（Roquette）	3.15
KH_2PO_4	0.05
硫胺素	0.0002
玉米油（Cerestar）	3.8
用 KOH 调节 pH 至 6.0～6.5	
120℃下灭菌 40 分钟	

实施例 3 中的番茄红素生产培养基和本实施例中的 β-胡萝卜素生产培养基间的主要区别在于番茄红素生产培养基中高出许多的糖含量。两种培养基中产生的番茄红素与 β-胡萝卜素的比率示于表 12。

表 12：培养基对番茄红素与 β-胡萝卜素比率的影响

培养基	番茄红素与 β-胡萝卜素的比率
实施例 3 中的番茄红素培养基	5.2
实施例 7 中的 β-胡萝卜素培养基	0.53

我们得出结论认为，所用的培养基类型影响突变体 *lyc26* 产生的类胡萝卜素光谱；含有高水平糖的实施例 3 中的番茄红素培养基特别适于获得高产量的番茄红素。

实施例 8. 抽提分离番茄红素

用 Seitz 2 升过滤器过滤根据实施例 5 的方法产生于 10L 发酵罐中的 3 升发酵培养液。用 1800 ml 处理水洗涤滤饼。之后，40℃下真空过夜挤压并干燥洗涤过的滤饼。

回收了约 100 g 生物质，干物质比例为 78%。之后，于 40℃下用 500ml 新鲜乙酸乙酯分次抽提生物质 10 分钟。总共进行了 8 个抽提循

环，最终获得 3800 g 抽提物。

40℃下过滤并浓缩抽提物直至最终体积约为 500 ml。停止加热，并通过持续减压继续蒸发。9℃时停止该操作。用 G2 玻璃过滤器过滤得到的悬浮液。观察到针状晶体。

环境温度下用 100 ml 新鲜乙酸乙酯洗涤晶体，接着用 100 ml 新鲜乙醇洗涤。40℃下过夜干燥后最终回收到 0.23 g 晶体。晶体中的番茄红素含量为 50～80 %，其中 4～8%的番茄红素为顺式异构体。

实施例 9. 番茄红素的直接分离

用 APV Lab60 匀浆器在 500 巴压力下在 3 个通道（passages）中对 2 升根据实施例 5 的方法产生于 10L 发酵罐中的发酵培养液进行匀浆。向该均质化的液体培养基中添加 0.3 体积的 1-丁醇，并将混合物于 5000 rpm 离心 5 分钟。所有后续的离心步骤都采用相同的离心条件。收集界面部分，并用 100 体积的 1-丁醇洗涤。离心混合物，收集离心物部分。制备体积比为 1：2：10 的离心物、1-丁醇和水的混合物。用 NaOH 调节 pH 至 11.5～12.6，并将混合物于 80℃温育 2 小时。加入乙酸钠至终浓度为 50 g/l，离心混合物。之后，向顶层加入 10 体积水，用 HCl 调节顶层 pH 至 3.5，并将混合物于环境温度下培育 45 分钟。之后，添加 0.1 体积 1-丁醇，离心整个混合物。收集界面，并加入 10 体积乙醇。离心混合物，并收集离心物部分。用 10 体积乙醇洗涤该部分，离心，并于 40℃下真空干燥 145 分钟。

如此获得的晶体含有 80%反式-番茄红素，1%顺式-番茄红素和 3.5%β-胡萝卜素。