

微生物技术在生物柴油开发与应用中的作用*

宋安东^{1,2,3} 冯冲¹ 谢慧¹ 陈伟¹

1(河南农业大学生命科学学院, 郑州, 450002)

2(农业部农村可再生能源重点开放实验室, 郑州, 450002)

3(河南天冠集团, 南阳, 473000)

摘要 生物柴油是一种可再生的液体清洁燃料, 具有优良的特性。当前生物柴油的原料主要来自自动植物油, 但其成本偏高。微生物油脂是无限再生的资源, 发酵周期短, 不受场地、季节、气候变化等的影响, 易于工业化生产, 开发潜力很大。文中从产油微生物的种类、代谢途径及生物柴油的工艺流程等方面介绍了生物柴油及其相关微生物技术研究进展。指出了微生物转化技术所带来的相应问题, 并展望了其应用前景。

关键词 生物柴油, 微生物油脂, 产油微生物

能源和一个国家的经济发展密切相关, 也是国家战略安全保障基础之一。目前液体燃料(汽油、柴油等)主要来源于石油资源。从目前探明的石油储量上看, 世界石油的开采期多则 100 年, 少则只有 30~50 年左右。预计 2010 年我国的原油加工量将达到 2.7 亿 t, 而原油产量不会超过 2.0 亿 t。另外, 以石油为主的传统化石能源的消耗造成大量的污染, 空气中主要污染物如 CO₂ 和颗粒悬浮物约 70% 来自各种化石燃料燃烧排放物。在能源日益匮乏, 环境保护彰显重要的形势下, 人们更看重从资源、能源和经济一体化协调考虑的社会可持续发展的模式。正是在这一形势下, 人们开始关注生物能源^[1]。生物能源在中国是仅次于煤炭、石油和天然气的第 4 位能源^[2]。控制污染, 使用清洁燃料已成为今后一段时间内我国车用燃料的研究与应用的发展方向。开发生物柴油对调整油品产业结构, 提高柴汽比, 促进农业产业结构的调整与农产品的加工转型, 加强国防安全, 保护环境等都具有重要意义。文中就生物柴油开发中相关微生物技术的研究现状和前景作简要的阐述和归纳。

1 微生物油脂发酵技术

许多微生物, 如酵母、霉菌和藻类等在一定条件下, 能将碳水化合物转化为油脂并贮存在菌体内, 称为微生物油脂, 又称单细胞油脂(SCO, Single Cell Oil), 大部分微生物油脂组成情况和一般植物油相近可以用来转化生物柴油。

1.1 微生物油脂的原料

研究表明, 微生物能高效利用半纤维素和纤维素水解得到的所有碳水化合物产生油脂, 和当前乙醇发酵工艺相比具有明显的原材料资源优势, 对解决生物质经济公认的世界难题之一“全糖转化利用”很有价值。全世界每年产农作物秸秆约 1 000~2 000 亿 t, 我国每年达 7 亿 t 以上, 是生物转化微生物油脂潜在而丰富的原料。甘薯、木薯、菊芋等粗放种植的高糖植物, 也是未来微生物油脂发酵的理想原料。

利用现代生物技术将木质纤维素转化为饲料、酒精、柴油等产品, 不仅可以作为新资源、新能源为人类造福, 同时也可以缓解农作物资源对环境污染的问题, 因而成为世界各国竞相开展的研究课题。

从理论上分析, 干燥玉米秸秆含纤维素 40%, 半纤维素 25%, 木质素 17%, 其高热值为 17.8 kJ/kg。由于产油微生物能同时利用六碳糖(葡萄糖)和五碳糖(木糖和阿拉伯糖), 每吨玉米秸秆理论上将产出生物柴油 233 kg(按硬脂酸乙酯计)和甘油 22.8 kg^[3], 生物质能量利用率约为 55%。微生物油脂资源是无限再生的资源, 发酵周期短, 不受场地、季节、气候变化等的影响, 基本不占用额外耕地资源, 易于工业化生产。中国科学院理化技术研究所杨正宇研究员领衔的课题组, 在用秸秆直接转化汽柴油联产苯、苯酚、环氧乙烷等精细化工原料的研究方面已取得突破性进展。最近希腊学者 Papanikolaou 等^[4]报道了利用 *Mortierella isabellina* 进行高浓度糖发酵(初始糖浓度达 100 g/L), 油脂产量达到 18.1 g/L。

1.2 产油微生物

1.2.1 产油微生物必备条件^[5,6]

(1) 菌株细胞的油脂积累量应达到 50%~60%

第一作者: 博士, 副教授。

* 国家科技部“863”资助项目(编号: 2001AA514020-02); 河南省杰出人才创新基金资助项目

收稿日期: 2006-06-19

以上,油脂生成率应高于15%~18%。

(2)能进行工业化深层培养,培养装置简单。

(3)生长速度快,抗污染能力强。

(4)油脂易提取。

1.2.2 常见的产油微生物种类^[7]

自然界中有许多微生物可以产生油脂如酵母菌、霉菌、细菌等。

常见的产油酵母菌有:浅白色隐球酵母(*Cryptococcus albidus*)、弯隐球酵母(*Cryptococcus albidus*)、斯达氏油脂酵母(*Litzanyces starkeyi*)、茁芽丝孢酵母(*Trichosporon pulluhns*)、产油油脂酵母(*Lipcmypes lipofer*)、胶粘红酵母(*Rhodotomlaglutinl*)、类酵母红冬孢(*Rhodosporldium tomloides*)等。

常见的产油霉菌有:土霉菌(*Aspergillus terreus*)、紫癜麦角菌(*Clavlceps purpurea*)、高粱褶孢黑粉菌

(*Tolypospofium ehrenbergii*)、高山被孢霉(*Mortierella alpina*)、深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)等。

常见的产油细菌有:分枝杆菌(*Mycobacterium*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)、诺卡氏菌(*Nocardia*)等。

1.2.3 产油微生物油脂含量及脂肪酸组成

不同微生物产油能力与油的特性如表1所示^[8]。有些微藻能在细胞内形成相当数量脂质,以甘油三酯为主,还有其他各种脂肪酸。产油酵母细胞内含大量甘油三酯,其脂肪酸组成与植物来源食用油脂相似;产油酵母能在各种碳源上生长良好,如蔗糖、糖蜜、乳糖、酒精等。一些产油霉菌以葡萄糖为碳源,在细胞内合成大量以甘油三酯为主的脂质,不同霉菌的脂肪酸组成有很大差别。

表1 产油微生物的油脂含量与组成

| 菌 种 | 碳 源 | 油脂含量/% | 脂肪酸/% | | | 总脂肪酸质量分数/% | | |
|----------------------------------|---------------------|--------|-------|---------|------|------------|------|------|
| | | | 16:0 | 16:1n-9 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 |
| 微 藻 | | | | | | | | |
| <i>Botryococcus braumi</i> | CO ₂ 、蔗糖 | 50~70 | 12 | 2 | 1 | 59 | 4 | |
| <i>Chlorella Vulgaris</i> | CO ₂ | 39 | 16 | 2 | 2 | 58 | 9 | 14 |
| <i>Navicula pelliculosa</i> | CO ₂ 、蔗糖 | 22~32 | 21 | 57 | | 5 | 2 | |
| <i>Scenedesmus acutus</i> | CO ₂ | 26 | 15 | 1 | | 8 | 20 | 30 |
| 酵 母 | | | | | | | | |
| <i>Cryptococcus albidus</i> | 葡萄糖 | 65 | 16 | 1 | 3 | 56 | | 3 |
| <i>Cryptococcus albidus</i> | 乳 清 | 58 | 25 | | 10 | 57 | 7 | |
| <i>Lipomyces lipofer</i> | 乙 醇 | 64 | 37 | 4 | 7 | 48 | 3 | |
| <i>Lipomyces starkeyi</i> | 乙 醇 | 63 | 34 | 6 | 5 | 51 | 3 | |
| <i>Rhodosporidium toruloides</i> | 葡萄糖 | 66 | 18 | 3 | 3 | 66 | | |
| <i>Rhodotorula glutii</i> | 葡萄糖 | 混合糖 | 72 | 37 | 1 | 3 | 47 | 8 |
| <i>Trichosporon pullulans</i> | 乙 醇 | 65 | 15 | | 2 | 57 | 24 | 1 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | 葡萄糖 | 32~36 | 11 | 6 | 1 | 28 | 51 | 1 |
| 霉 菌 | | | | | | | | |
| <i>Aspergillus terreus</i> | 葡萄糖 | 57 | 23 | | | 14 | 40 | 21 |
| <i>Claviceps purpurea</i> | 葡萄糖 | 31~60 | 23 | 6 | 2 | 19 | 8 | 42 |
| <i>Tolyposporium ehrenbergii</i> | 葡萄糖 | 41 | 7 | 1 | 5 | 81 | 2 | |

1.2.4 微生物产生油脂机理

微生物高产油脂的一个关键因素是培养基中碳源充足,其他营养成分,特别是氮源缺乏。在这种情况下,微生物不再进行细胞繁殖,而是将过量的碳水化合物转化为脂类。

微生物利用葡萄糖合成多不饱和脂肪酸的代谢途径如图1所示^[9]由图1可以看出多不饱和脂肪酸微生物产生油脂过程,本质上与动植物产生油脂过程相似,都是从利用乙酰CoA羧化酶的羧化催化反应开始,经过多次链的延长,或再经去饱和酶的一系列

去饱和作用等,完成整个生化过程。禹慧明等对产生γ-亚麻酸机理进行探讨,认为微粒体膜的苹果酸酶活性与菌体油脂γ-亚麻酸含量存在显著相关关系,这是因为苹果酸酶原位产生的NADPH是微粒体膜磷脂上脂酰基完成去饱和作用的关键所在,而胞基质上的NADPH在脂肪酸延长和去饱和中不能发挥作用。Kendrack等发现苹果酸能促进卷枝毛霉(*Mueor circinelloides*)微粒体的去饱和作用,使γ-亚麻酸含量增高,这可能是苹果酸酶为去饱和作用而提供NADPH结果^[10]。



图1 微生物利用葡萄糖合成多不饱和脂肪酸的代谢途径

2 生物柴油研究现状

目前,各国根据自己的条件而采用不同的原料油生产生物柴油。美国以转基因大豆为原料,欧洲主要以油菜籽为原料,日本以废弃烹饪油为原料,巴西以蓖麻籽为原料^[11],我国的棉籽、大豆、油菜籽产量很大,但这些油以食用为主,价格较高,菜籽油约4 000元/t,花生油约6 800元/t,而柴油价格不足3 800元/t^[12],以这些油生产生物柴油没有经济性可言。从20世纪80年代中期起,原机械工业部和中国石化总公司曾拨款开始生物柴油的专项研究。中国科技大学、石化院等院校也投入一定的研究力量,但均处实验阶段。2001年9月,南海正和生物能源有限公司在河北邯郸建成年产1万t的生物柴油装置,标志着我国这一行业的诞生。2002年8月,四川古杉油化公司以植物油下脚料为原料,生产出和0#柴油性能相当的生物柴油。2002年9月,福建龙岩市建成年产2万t生物柴油的装置,也是利用废动植物油作原料,据说成本可控制在2000元/t以下。2004年,福建源华能源科技有限公司和杭州萧山所前镇政府签约在杭州建设年产5万t生物柴油的装置,也是利用地沟油作原料,该厂于2005年9月投产^[13]。

成本问题是生物柴油发展的根本问题。植物油

脂因为其具有占用耕地面积、生长周期长、受气候影响严重等不足而不能成为生物柴油原料油脂供应的长久之策。据统计以植物油脂为原料生产生物柴油,原料成本占总生产成本的70%~85%^[14]。利用价廉的非食用油、废煎炸油以及油脚来生产生物柴油是降低成本的有效方法但它们的来源并不稳定。目前降低成本最有效的办法是充分利用我国丰富的木质纤维素物质资源及工业废物如玉米秸秆、稻草、麦秸、蔗渣及农副产品加工业、食品工业、造纸工业中产生的废弃物等,但目前的技术还不能够合理利用这些丰富的原料。

3 生物柴油生产工艺的研究

动植物油脂本身可以燃烧,但不能和普通柴油充分混合,而要设计专门的柴油机。生物柴油则相反,它既可以按任意比例混合,也无需专门的柴油机。生物柴油实质上就是脂肪酸的低碳醇酯,主要是脂肪酸甲酯和脂肪酸乙酯。它是由甲醇或乙醇等醇类物质与天然植物油或动物脂肪中主要成分甘油三酸酯发生酯交换反应,将甘油基断裂为3个长链脂肪酸甲酯。生物柴油的主要成分是软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸等长链饱和与不饱和脂及酸同甲醇或乙醇所形成的酯类化合物^[15]。

3.1 生物柴油的生产工艺

菌种→筛选→产脂微生物→二次活化→种子摇瓶

生物水质解糖化→碳水化合物→发酵→过滤→收集菌丝体→风干→粉碎→压榨→粗微生物油脂→预处理→酯交换→洗涤→分离→真空干燥→生物柴油

↑ 催化剂 ↑ 甲醇(或乙醇)

3.2 发酵

影响微生物发酵产油脂的因素有微生物的种类、培养基、环境条件、工艺流程等。培养基中氮源浓度和C/N比是影响微生物油脂含量的主要因素。一般来说,培养基中含氮化合物越多则细胞蛋白质含量越多。因此在培养初期供给大量氮源使微生物迅速增殖,以获取大量菌体细胞,后期改为含糖量多的培养条件以使油脂积累,这样可从蛋白质合成初期百分之几的油脂含量提高到后期百分之几十的油脂含量。氮源的种类也会影响油脂的积累,黄建忠等^[16]在利用深黄被孢霉(*Mortierella isabellina*)产脂变异株

M018 合成 γ -亚麻酸的研究中发现,不同氮源对油脂合成和菌体生长也有影响, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 适合细胞生长,不利于油脂合成;而蛋白胨、牛肉膏不适合细胞生长但有利于油脂合成。酵母膏不仅是菌体生长的适宜氮源,也是细胞油脂合成的最佳氮源。以酵母膏为氮源,生物量可达 32.8 g/L,油脂含量为 67.8%。此外,不同 C/N 下菌体生长和油脂合成情况不同。C/N 为 40:1 适于菌丝生长,油脂合成的最适 C/N 为 60:1。这说明充足的氮源适合细胞生长,而油脂的积累发生在氮源缺乏时碳源的进一步代谢。

无机盐类对油脂积累的影响:对真菌而言,适当增加无机盐和微量元素的添加量,可提高油脂合成速度和产油量。Carrido 等人对构巢曲霉的研究结果表明,调整培养基中 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 的含量比,可使油脂含量从 25%~26% (油脂生成率 6.7%~7.9%) 提高到 51% (油脂生成率 17.2%)。长沼等人通过研究油脂酵母发现,增加培养基的铁离子浓度可使油脂合成速度加快,而增加锌离子浓度可使油脂含量增加。

其他添加物对油脂积累的影响:在培养基中添加

乙醇、乙酸盐、乙醛等脂肪酸合成的中间产物或能形成中间产物的 C_2 化合物可增加油脂含量,有些菌株还要求 B 族维生素。添加 EDTA 可抑制糖和盐类复合物的形成,减少同化性糖的损失,并增加油脂的含量。

不同种类的微生物产油的最适 pH 值也不同,酵母为 3.5~6.0,霉菌为中性至微碱性。构巢曲霉在 pH 值 2.8~7.4 培养时,随 pH 值上升,油酸含量增加。油脂酵母培养基的 pH 值越接近中性,稳定期菌体的油脂含量越高^[17]。

温度可影响油脂的含量和组成。通常油脂合成的最适温度为 25℃,低于 20℃ 或高于 40℃ 油脂产量均明显降低。真菌油脂生成的最适温度大多在 25℃ 左右,霉菌在 30℃ 以上较高温度下,适于菌体生长,而在 20℃ 以下,利于不饱和脂肪酸,特别是高不饱和脂肪酸的形成^[18]。

通氧量可影响不饱和脂肪酸的形成,因为去饱和反应需要氧^[19]。

3.3 生物柴油的制取

生物柴油的制造方法有直接使用和混合法、微乳法、热解法、酯交换法等^[20,21]。各种生产方法的比较见表 2。

表 2 生物柴油的生产方法比较

| 原 料 | 生产方法 | 优缺点 |
|-------------|---------------------------------------|---|
| 原 油 | 催化裂化 | 传统方法,精制过程涉及脱硫和脱氮,较复杂 |
| 废塑料 | 裂解 | 利用废弃资源 |
| 植物油 | 直接使用或与常规柴油混合微乳 | 优点:液态、轻便;简单;可再生;热值高 缺点:高粘度、易变质、不完全燃烧有助于充分燃烧,可和其他方法结合使用 |
| 植物油和动物脂肪 | 热解 | 高温下进行,需要常规的化学催化剂,反应产物难以控制,设备昂贵 |
| 植物油和动物脂肪和醇类 | 酸催化的酯交换反应 碱催化的酯交换反应 脂肪酶催化的酯交换反应 | 高附加值副产物甘油,反应速率比酸催化快;剩余碱时有皂生成,堵塞管道 酯中游离脂肪酸和水的含量高时催化效果比碱好 游离脂肪酸和水的含量对反应无影响。 相对清洁;酶价格偏高。反应时间长 |
| 微生物油脂 | 微生物转化或脂肪酶催化 | 优点:清洁;可再生;周年生产 缺点:原料油开发处于研究阶段 |

4 存在问题及展望

当前生物柴油的研究已是世界研究的焦点,而其原料的来源更是人们急切需要解决的问题。目前生物柴油生产存在的主要问题是成本高,化学法生产制备生物柴油具有一定的不足,生物酶法具有很多优点但存在工业化难的技术问题。因此开发廉价生物柴油原料,革新和研究新型的生物柴油制备工艺对生物

柴油的生产应用尤为迫切。

微生物油脂的开发和应用正是解决这些问题的关键。如对野生菌株进行基因工程改造;关键酶基因的定位克隆;cDNA 的构建;多不饱和脂肪酸合成途径中,分支代谢产物的关键酶基因定位和调控基因定位等。能否获得高附加值的多不饱和脂肪酸变异株及进一步提高多不饱和脂肪酸产量,找到适宜的廉价培养物,将是多不饱和脂肪酸生物合成、实现产业化

的关键。发酵条件的优化,以及用去饱和酶抑制剂和活化剂调节发酵是提高现有菌种产量的主要研究方向。用产脂微生物定向转化生物柴油原料将得到重视。

世界能源组织(IEA)表示,保守地估计,到2030年全球将有20%的能源由生物能源替代,这一目标将是极具挑战性的^[22],为了达到这一目标,必须大力开发生物柴油原料以大幅降低生物柴油成本。

参 考 文 献

- 1 谭天伟,王芳,邓利,等. 能源生物技术[J]. 生物加工过程,2003,1(1):32~35
- 2 邓可蕴. 21世纪我国生物质能发展战略[J]. 中国电力,2000,33(9):82~84
- 3 Ratledge C. Biochemistry, stoichiometry, substrates and economics. In: Moreton R S. Sirish Cell Oil[M]. New York: Wiley, 1988. 33~70
- 4 Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil(SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media[J]. Bioresour Technol, 2004, 95: 287~291
- 5 李魁. 利用食品工业废弃物生产真菌油脂[J]. 食品工业科技, 1997(6): 65~69
- 6 吴苏喜. 微生物油脂的开发应用前景[J]. 湖南食品, 1998(5): 10~11
- 7 刘俊利. 食用微生物油脂[J]. 粮油仓储科技通讯, 2004(1): 50~51
- 8 王萍. 微生物油脂生产和应用[J]. 粮食与油脂, 1999(3): 49~51
- 9 王镜岩,朱圣庚等编. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社, 2002
- 10 张克旭,陈宁等编. 代谢控制发酵[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1998
- 11 李永善,于佑世. 大有作为的“绿色化工”—未来的可再生柴油[J]. 灾害学, 2002, 17(2): 54~59
- 12 冀星,郝小林,孔林河,等. 生物柴油技术发展产业前景[J]. 中国工程科学, 2002, 4(9): 86~93
- 13 宋玉春. 中国生物柴油亟待产业化[J]. 化工文摘, 2004(3): 17~19
- 14 Gerpen J V. Business management for biodiesel producers[R]. NREL Technical Report, NREL/SR-510-36342, 2004
- 15 Schafer A. Vegetable oil fatty acid methyl esters as alternative diesel fuels for commercial vehicles engines[J]. Plant Oil Fuel Proc Symp, 1987, 17(4): 29~46
- 16 黄建忠,施巧琴,周晓兰,等. 深黄被孢霉高产脂变异株的选育及其发酵的研究[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 187~191
- 17 殷蔚申. 食品微生物[M]. 北京:中国财经出版社, 1990. 270~273
- 18 Shimizu S. Production of odd chain polyunsaturated fatty acids by *Mortierella fungi*[J]. JAOCS, 1991, 68: 254~258
- 19 咸漠,毕颖丽,甄开吉,等. 脂肪酸去饱和酶的结构与催化特性研究进展[J]. 分子催化, 2000, 14(6): 473~476
- 20 Fangrui Ma, Milford A. Hanna[J]. Bioresource Technology, 1999, 70: 1~15
- 21 迭名. 酶法生产生物柴油技术[N]. 化学工业时报(日), 第2394号: 1
- 22 迭名. 欧盟预计2005年度生物燃料将替代1.4%化石燃料[J]. 天津科技, 2005(3): 5

Application of Microtransformation Technology in the Exploitation of Biodiesel Oil

Song Andong^{1,2,3} Feng Chong¹ Xie Hui¹ Chen Wei¹

1(Life Science College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

2(Key Laboratory of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Zhengzhou 350002, China)

3(Henan Tianguan Group, Nanyang 473000, China)

ABSTRACT Biodiesel oil is a cleanly reproducible resource of fuel. It is provided with good speciality. At present, the raw materials of biodiesel oil are mostly from Vegetable and animal oil, but they are high expensive. The sources of microbial lipids are boundless renewable material. There is shorter ferment period. It is not influenced by field, season, abnormal weather and is prone to a series of industrial manufacture. Therefore, microbial lipids are considered as potential oil resource. Summarized here are lipid metabolic regulation mechanism and the main ways of production of biodiesel. The problems existed in the microtransformation technology are pointed out. The prospect of the microtransformation technology was also predicted.

Key words biodiesel oil, microbial oil, oleaginous microorganism