

生物柴油原料资源高油脂微藻的开发利用

宋东辉¹, 侯李君¹, 施定基^{1,2}

1 天津科技大学海洋科学与工程学院藻类生物技术研究室, 天津 300457

2 中国科学院植物研究所, 北京 100093

摘要: 生物柴油作为化石能源的替代燃料已在国际上得到广泛应用。至今生物柴油的原料主要来自油料植物, 但与农作物争地的情况以及较高的原料成本限制了生物柴油的进一步推广。微藻作为高光合生物有其特殊的原料成本优势, 微藻的脂类含量最高可达细胞干重的 80%。利用生物技术改良微藻, 获得的高油脂基因工程微藻经规模养殖, 可大大降低生物柴油原料成本。介绍了国内外生物柴油的应用现状, 阐述了微藻作为生物柴油原料的优势, 对基因工程技术调控微藻脂类代谢途径的研究进展, 以及在构建工程微藻中面临的问题和应采取的对策进行了综述和展望。

关键词: 基因工程, 微藻, 油料植物, 生物柴油

Exploitation and Utilization of Rich Lipids-microalgae, as New Lipids Feedstock for Biodiesel Production—a review

Donghui Song¹, Lijun Hou¹, and Dingji Shi^{1,2}

1 Laboratory of Cyanobacterial and Algal Biotechnology, College of Marine Science & Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

Abstract: As a renewable energy sources to replace conventional fossil fuels, biodiesel fuels have been becoming increasingly requirements to global fuels market. Biodiesel derived from oil crops cannot realistically satisfy even more fraction of the raw material existing costs and soil competitive demand for its growth. Microalgae appear to be the advantage of costs that is capable of higher photosynthetic efficiency, larger biomass, faster growth compared to those of oil crops. Lipid content of many microalgae is usually 80% of its dry weight. Genetic microalgae with high-oil productivity by genetic manipulations are capable of making microalgal biodiesel economically competitive with petrodiesel through large-scale production of genetic microalgal biomass. As demonstrated here, the use of biodiesel fuels in home and abroad are currently introduced, and the cost advantage of microalgae as the raw material is analyzed; And moreover, the progress of microalgal genetic engineering in regulation of lipid metabolism and the problems in the construct of genetic microalgae strains as well as approaches for making microalgal biodiesel appear to be an important source of renewable fuel that has the potential to completely displace fossil diesel are discussed in this review.

Keywords: genetic engineering, microalgae, oil crops, biodiesel

Received: July 23, 2007; **Accepted:** September 5, 2007

Supported by: the National Science Foundation of China(No. 30670493), Tianjin Key Projects of Science and Technology(No. 04318271), Tianjin Science and Technology Developmental Funds of Universities and Colleges(No. 20060724)and Exceptional Talented Persons Initial Funds of TUST (No. 20060411)

Corresponding author: Dingji Shi. Tel: +86-22-60601116; Fax: +86-22-60600358; E-mail: cyano.shi@yahoo.com.cn, dhsong@tust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30670493), 天津市科技攻关重点项目 (No. 04318271), 天津市高等学校科技发展基金计划项目 (No. 20060724)和天津科技大学人才引进启动基金 (No. 20060411)资助。

随着全球经济一体化的不断发展,石油作为战略资源已成为世界各国能源经济的最主要内容。我国目前是世界上第二大能源生产和消费国,石油供给不足已经成为影响我国经济和社会发展的主要矛盾之一。发展替代能源是保障能源安全的重大战略举措。近年来生物柴油作为化石能源的替代燃料,已成为国际上发展最快、应用最广的环保可再生能源。本文结合国内外生物柴油的研究进展,综述微藻基因工程制备生物柴油的可行性和发展趋势,以及我国在利用微藻基因工程解决生物柴油原料成本问题上的可能对策。

1 生物柴油的优越性

生物柴油是以生物体油脂为原料,通过分解、酯化而得到的长链脂肪酸甲酯,是一种可以替代普通柴油使用的环保、可再生能源。生物柴油的油脂原料来自植物油脂(大豆油、玉米油、菜籽油、棕榈油等)、动物油脂(各种动物脂肪)、微藻脂肪酸以及废弃食用油(地沟油)等。生物柴油作为化石燃料的替代品,与化石柴油及燃料乙醇等其他液体燃料相比,有着突出的特性:生物柴油不含石蜡,闪点高,燃烧性能和效率要高于普通柴油,使用时更安全;同时可以通过种植、养殖或培养源源不断地得到,因而属于可再生资源;生物柴油产品中含硫和氮较少,可以减少产生 SO_2 和 NO 对大气的排放量。以淀粉类作物和木质纤维素类物质发酵产生的燃料乙醇,燃烧后尾气排放污染小,但其热值只有普通汽油的 $\frac{2}{3}$,比柴油更低,且乙醇易吸水使燃烧值下降^[1]。由于生物柴油具有其他生物质燃料不可比拟的优良特性,世界各国纷纷开展生物柴油原料的研发和产业化工作,以替代储量日益减少且严重污染环境的化石燃料。

2 生物柴油原料的研发进展

2.1 世界各国制备生物柴油的原料

按照当前技术,利用动植物油脂等原料生产生物柴油,其原料成本占总生产成本的 50%~85%^[2],所以原料成本是决定生物柴油价格的最主要因素。目前,世界主要生物柴油生产国都依据本国种植业特色,选择不同原料制备生物柴油。欧盟、美国等国主要以菜籽油、大豆油以及芥末籽油为原料制备

生物柴油,世界可再生能源生产大国巴西主要利用蓖麻籽油进行生物柴油生产,日本利用煎炸废油及牛油脂为原料生产生物柴油。韩国、印度、马来西亚等东南亚国家以棕榈油作为发展生物柴油的重要原料。

2.2 中国制备生物柴油的主要原料

中国人口众多,人均耕地面积远低于世界平均水平,中国食用植物油脂的缺口较大。因此政府首先要保证有足够的粮油等食物供应。据统计,2003年我国进口油菜和菜籽油等食用油达到 250 万 t,用以满足国内日益增长的消费需求。我国 2004 年 1~11 月份进口食用油脂 625 万 t,其中大豆油进口为 239 万 t,同比增长 56%;菜籽油进口 32 万 t,同比提高 1.18 倍;棕榈油进口为 216 万 t,比上年同期提高 1.2 倍^[3]。2005 年全年累计直接进口油脂为 653 万 t,其中棕榈油进口 433 万 t,大豆油进口 169.4 万 t,菜籽油及其他进口 50.6 万 t。这标志今后我国油脂供给大部分依靠进口,预计 2010 年油脂进口总量高达 1350 万 t,占总供给的 72%^[4]。这决定了今后很长时间内,中国食用植物油生产只能是力争满足人们生活需要,不可能出现足量剩余植物油用来发展生物柴油。种植草本油料作物油菜、大豆等需要大量土地,中国不可能利用大量的耕地来提供生物柴油原料。同时,中国如果进口大量的大豆油、菜籽油用于生产生物柴油,其成本太高,市场竞争力差,需要大量的政府补贴,并不符合中国的国情。那么我国如何发展符合国情的生物柴油产业呢?2003 年 1 月,中国工程科学院组织各领域专家在北京召开了“生物柴油植物原料发展研讨会”,本文作者之一施定基研究员应邀在会上作了有关微藻生物技术发展生物柴油的重点报告,得到了中国工程科学院徐匡迪院长和院士们的赞许。这次会议的召开已成为我国生物柴油原料产业发展的重要里程碑。2006 年 11 月 12 日由中国工程院主办的“二六中国生物质能源发展战略论坛”已确定我国生物能源的发展方针:中国生物能源将以非粮作物为主,国家将采取各种优惠的财税政策,推进中国生物质能源的快速发展^[5]。

我国木本油料植物资源丰富,麻疯树、黄连木、乌桕、油桐等含油量可达 20%。因此我国目前主要以野生油料木本植物种子和废弃动植物油脂为原料

生产生物柴油与甘油。生物柴油原料的发展潜力巨大: 麻疯树、黄连木等油料植物可满足 500 万 t/年生物柴油装置的原料需求, 废弃动植物油回收每年可生产约 200 万 t 生物柴油^[6]。我国生物柴油产业化进程主要从民间开始, 20 世纪 90 年代末, 海南正和生物有限公司用黄连木果作原料, 提取和制备了生物柴油, 现在这家公司已拥有近 8000 ha 山区种植黄连木的原料基地, 一个万吨级试验基地, 两个五万吨级规模的生产基地和一个研究所。同时, 四川古杉油脂化工公司, 福建卓越新能源发展有限公司、辽宁抚顺长江生物柴油技术应用所等也开发出拥有自主知识产权的油料植物制取生物柴油技术, 但由于规模偏小, 产量较低, 使得从油料植物制取生物柴油的成本居高不下, 难于普及推广, 更难抗衡价格低廉的化石柴油。

3 微藻成为制备生物柴油新型原料的优势

生物柴油和化石燃料本质上都来源于光合作用产物。绿色植物进行光合作用, 将水、二氧化碳和其他无机物依靠光能合成各种有机物并释放出氧气, 动物和微生物才能生长繁殖。各种生物的油脂都是从植物合成的有机物转化来的。任何形式的来自动物、植物和微生物的脂肪酸都能用作生物柴油的原料。因此, 油脂含量高的植物种类才是制备生物柴油的最重要原料。

3.1 已有油料植物作为生物柴油原料的成本劣势

绿色植物中草本油料作物的含油量较高, 收获的种子存储和加工较简便, 但我国现在还要从国外进口大量食用油, 不能依靠大豆、油菜等来大量生产生物柴油。其他非食用油料作物也可以作为生物柴油的生产原料, 但也会与粮油棉等作物争地、争水、争肥。

木本油料植物可利用荒山野岭来种植, 不与农作物争地, 还可以绿化环境、改良生态, 在我国已有企业实施的成功范例。但这些树木的含油果实一般一年只收获一次, 而且存储的成本较高, 以此为原料进行生物柴油生产会受到季节限制。

3.2 用藻类作为生物柴油原料与其他原料的比较

藻类是最原始的生物之一, 通常呈单细胞、丝状体或片状体, 结构简单, 整个生物体都能进行光合作用, 所以光合作用效率高, 生长周期短、速度快。藻类按大小常常为大藻(如海带、紫菜、裙带菜

等)和微藻(为单细胞或丝状体, 直径小于 1 mm)。微藻可利用微生物发酵技术, 在光反应器中高密度、高速率培养。在同样条件下, 微藻细胞生长加倍时间通常在 24 h 内, 对数生长期细胞物质加倍时间缩短至 3.5 h^[7]。作为低等植物的微藻大多分布在江海湖泊中, 不与农作物争地, 可以整年生长。其中原核的蓝藻(也称蓝细菌)可营自养生活, 无需另外添加 C、N 源。从海洋和湖泊中分离到真核的硅藻、绿藻和褐藻等藻种, 经过驯化, 其中一些藻类的光合生产率已经达到 $50 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$, 其油脂组成与一般油料植物相似, 以 C16、C18 系脂肪酸为主^[8]。高等植物种子的脂肪酸含量仅为干重的 15%~20%左右, 而藻类的脂肪酸含量在氮元素缺乏时可达细胞干重的 80%^[9,10]。我国 18 000 km 海岸线上有着大片滩涂和湿地, 非常适合微藻的大规模养殖和循环利用。由于微藻易养易收, 群体众多, 所含脂肪酸等物质能巨大, 因此微藻是新型生物柴油原料油源之一, 也是未来生物柴油发展的趋势之一。

4 高油脂微藻的研究进展

4.1 高油脂微藻的筛选与生理生化调控研究

美国能源部 1978 年就立项利用藻类制备生物柴油的研发工作, 从海洋和湖泊中分离了 3000 多种藻类, 从中筛选出 300 多种生长快、含油高的硅藻、绿藻和蓝藻等藻种。经过驯化, 其中一些藻类的光合生产率已经达到 $50 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$, 含油率达到 80%^[9,10]。采用生理生化的调控方法如降低培养液中的氮和硅含量提高了油藻的含油率, 但是光合作用受阻、生长速度减缓。以上研究未能深入到基因水平, 未采用藻类基因工程来提高藻类的油脂含量。而当时医药和农业的发展已证明, 仅立足于经典科学的研发模式, 难以取得跨越性进展。

4.2 应用基因工程技术构建高油脂工程微藻

微藻在同样条件下, 其光合生产率比高等植物要高数十倍, 因而其脂肪酸合成反应也异常活跃。利用基因工程改造微藻脂肪酸调控途径, 可大大提高微藻脂肪酸的合成能力, 从而实现高油微藻制备生物柴油的目的。

4.2.1 与脂类合成有关的乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-coenzyme A carboxylase, ACCase)研究

脂肪酸生物合成途径以丙酮酸合成的乙酰辅酶

A 为底物, 经乙酰辅酶 A 羧化酶 (acetyl-coenzyme A carboxylase, ACCase) 催化后进入脂肪酸合成途径。这个酶促反应是脂肪酸合成和氧化过程中限制速率的关键调节步骤, 因此 ACCase 是脂肪酸生物合成途径的关键限速酶(图 1)。

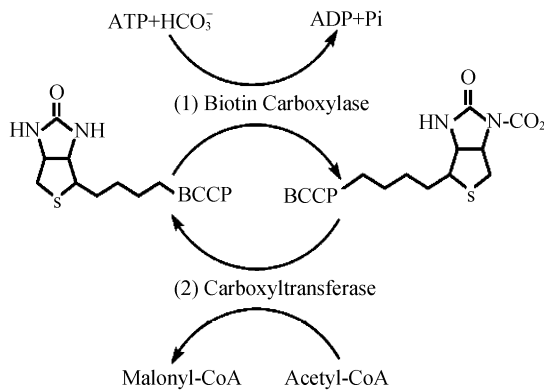


图 1 大肠杆菌中 ACCase 的作用机制

Fig. 1 The reaction mechanism of *E. coli* acetyl-CoA carboxylase

(1)The biotin bonded with ACCase is carboxylated by biotin carboxylase. (2)The carboxyl group is transferred from carboxybiotin to acetyl-CoA to form malonyl-CoA

(Excerpt from Davis *et al* 2000)

高等植物有关 ACCase 调控脂类合成的研究表明, 高油黄豆从发育早期到中期, 其 ACCase 的活性要比低油黄豆的高 2 倍^[11]。表明在早期种子发育过程中 ACC 基因表达量的增加与种子成熟时含油的总量增加具有相关性。Ohlrogge 等将油菜种子贮藏蛋白 napin 特异性表达启动子连接到拟南芥 ACCase 的编码基因上, 将其转入油菜中, 获得的转基因植株 T1 代成熟种子的 ACCase 活性比对照增加了 12~19 倍, 脂肪酸含量增加了 6%^[12]。说明在植物体内过量表达 ACCase 有可能导致植株和种子含油量的增加。此外, 通过反义表达技术抑制油菜 ACCase 的活性, 获得的转基因植株成熟种子的含油量比对照有显著的下降^[13]。这些研究表明高等植物中 ACCase 的活性高低直接影响脂肪酸的生物合成。增加原核型 ACCase 的活性也可以提高脂肪酸的生物合成能力。Davis 等将大肠杆菌原核型 ACCase 的编码基因重新转化大肠杆菌, 过量表达的 ACC 基因提高了大肠杆菌 ACCase 活性, 同时脂肪酸含量增加了 6 倍^[14]。这说明原核型 ACCase 过量表达也可以提高脂肪酸生物合成能力。

微藻脂类代谢中有关 ACCase 的调控研究主要在美国进行。美国再生能源国家实验室(National

Renewable Energy Laboratory, NREL)于 1991 年开展了有关基因工程构建高油微藻的工作。他们起初想转化绿藻, 但未能成功; 后来改为转化硅藻, 并于 1995 年将 ACCase 基因转化小环藻成功, 这是一个重要突破^[15,16]。然而可惜的是, 这时美国能源部却因经费问题停止资助。此后, 国际上关于藻类基因工程提高油脂含量的研究进展较慢。近年来, 包括大肠杆菌及很多蓝藻在内的 ACC 基因编码序列都在 GenBank 数据库中公布(表 1)。但微藻中 ACC 基因的表达调控对脂类合成影响的研究未见新的报道。本实验室正在开展 ACCase 调控微藻脂肪酸合成能力的研究, 目前正在筛选转化 ACC 基因的丝状体微藻。

4.2.2 与脂类代谢有关的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)研究

PEPC 存在于所有光合生物中, 是光合作用过程中的关键酶, 同时还参与了氨基酸代谢途径中碳骨架的回补作用等^[17]。对脂类代谢而言, ACCase 和 PEPC 的相对活性影响着脂类代谢途径的走向, 即: 丙酮酸合成后, ACCase 催化底物乙酰辅酶 A 进入脂肪酸合成途径; 乙酰辅酶 A 的浓度累积激活 PEPC, 催化丙酮酸合成草酰乙酸进入氨基酸生物合成途径(图 2)。抑制 PEPC 活性有助于提高 ACCase 催化底物进入脂肪酸途径。

高等植物中有关 PEPC 基因调控脂类代谢已有很多研究。早在 20 世纪 50 年代, 就有关于油菜蛋白质含量与油脂含量呈高度负相关的报道。1980 年代末, 日本学者发现油菜籽粒蛋白质含量与 PEPC 活性密切相关^[18]。1999 年, 陈锦清等通过反义 RNA 的方法抑制了 PEPC 基因在油菜中的表达, 转基因油菜比对照含油量高 6.4%~18%, 最高含油量接近 50%^[19,20]。2005 年, 赵桂兰等同样用农杆菌介导法将反义 PEPC 基因导入大豆的基因组, 获得了稳定的超高油转基因大豆品系^[21]。因此, 采用反义技术调控 PEPC 代谢途径, 可能是提高脂肪酸含量的另一种有效方法。近 20 年来, 包括大肠杆菌^[22]、聚球藻属蓝藻(*Anacystis nidulans*)^[23]、鱼腥藻 7120 (*Anabaena* sp. PCC 7120, 现称 *Nostoc* PCC 7120)^[24]、聚球藻属蓝藻(*Synechococcus vulcanus*)^[25]在内的许多物种的 PEPC 基因相继克隆成功, 其序列特征及结构也得到了详尽的解析。但是 PEPC 在大肠杆菌和蓝藻中的表达对脂类合成影响的研究未见报道。

表 1 GenBank 中大肠杆菌及部分蓝藻的 ACC 基因(含推测的同源基因)*

Fig. 1 The ACC gene of *Escherichia coli* and partial cyanobacteria (including deductive homologous genes)

ACC gene	Microbe species	mRNA (nt)	Amino acid number	Molecular weight (kD)	GenBank access number
accA	<i>Escherichia coli</i>	960	320	35.3	D83536
	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	981	326	35.9	NZ_AAAY02000034
	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	981	326	35.7	NC_003272
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	984	327	35.7	AP008231
	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	984	327	35.7	U59236
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	981	326	36.0	NC_000911
accB	<i>Escherichia coli</i>	471	156	16.7	M80458
	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	558	185	19.7	NZ_AAAY02000072
	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	549	182	19.2	NC_003272
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	477	158	16.9	AP008231
	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	477	158	16.9	U59235
accC	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	465	154	16.3	BA000022
	<i>Escherichia coli</i>	1350	449	49.3	M80458
	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	1344	447	49.3	NZ_AAAY02000007
	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	1344	447	49.1	NC_003272
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	1362	453	49.7	AP008231
	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	1362	409	44.7	U59234
accD	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	1347	448	49.2	NC_000911
	<i>Escherichia coli</i>	915	304	33.3	M68934
	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	951	316	35.5	NZ_AAAY02000009
	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	951	316	35.5	NC_003272
	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	918	305	33.8	AP008231
	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	918	305	33.8	U59237
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	981	326	36.4	NC_000911

* The data cuts off June 13, 2007

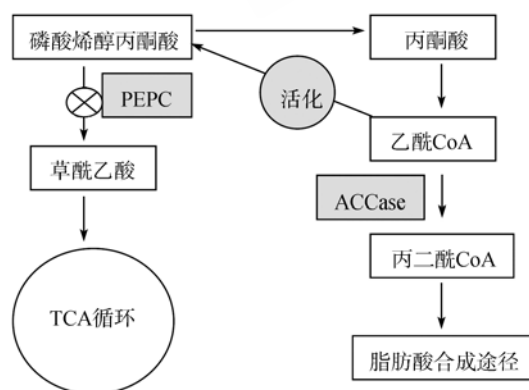


图 2 PEPC 参与脂类合成途径的示意图

Fig. 2 The reaction mechanism of phosphoenolpyruvate carboxylase in lipid synthesis pathway

本实验室目前正在开展反义技术调控微藻 PEPC 代谢途径的工作, 初步结果表明, 反义抑制 PEPC 酶活性可显著提高藻细胞脂类含量(待发表)。

5 研发高油脂工程微藻的瓶颈和对策

国内外关于微藻基因工程的研究在最近十年中发展较快。我国从 1998 年国家启动海洋 863 计划后, 参与的人员和获得的成果增长速度明显超过国外, 成为国际上在藻类基因中表达外源基因最多的国家。本实验室所在研究集体在十几年从事微藻基因工程的研究中认识到, 除了国家政策、人员素质、研究经验等大环境因素外, 微藻基因工程在技术水平上至少有两问题需要解决: 一是藻类的生长速率; 二是外源基因在藻类中的表达效率。

5.1 微藻基因工程发展的瓶颈问题与解决措施

5.1.1 微藻的生长速率和规模培养问题, 长期以来曾是选用藻类做转基因受体(宿主)时的主要障碍。微藻的高密度大规模培养是提高微藻生长速率, 降低生产成本, 实现微藻基因工程产业化发展的必经之

路。目前实现微藻规模培养的方式有两种：开放式户外大池光自养培养和封闭式光生物反应器(发酵罐)自养或异养培养。开放式户外大池培养是螺旋藻和小球藻等少数微藻进行商业化生产常用的方法，其结构和运转比较简单，生产成本低，但由于细胞密度低、易污染、生产不稳定、占地面积大等缺点，开放式户外大池培养发展受到很大限制。对于大多数不适合开放培养或经济价值较高的基因工程微藻可采用封闭式光生物反应器。封闭式光生物反应器操作简单，培养条件、参数易控制，条件稳定，成品质量高，可实现全年无菌纯种培养，能较大幅度地提高微藻细胞密度，其生长速率和生物量已接近大肠杆菌。封闭式光生物反应器近些年已应用于微藻的商业性、高密度大规模培养生产。但封闭式光生物反应器在规模培养过程中的生产成本相对较高，需要较好解决微藻最佳的培养条件和最低的成本消耗：即选择合适的光照方式，提高光能利用率；选用合适的培养系统，达到最大培养数量。除了日光和外置光源照射外，采取最小化光的传输路径、最大化照明表面积与培养液体积比率等的设计，如加装内部照明装置的纤维玻璃光生物反应器等也可以较好解决光照等问题，提高产率。 CO_2 通气量也是培养微藻必须考虑的问题之一，可利用沿海发电厂排出的 CO_2 来解决大规模培养所需的碳源问题。此外，微藻在光照和无光条件下以阶段性自养、异养等混养方式也可以达到高密度培养和提高活性物质产量的目的。近年来本实验室正在利用 100 L 光生物反应器通气(CO_2)混合培养的方法来改善藻类的高速率、高密度生长^[26]。

5.1.2 藻类中外源基因表达效率问题，可能是国内外该领域研究关注的焦点。据统计，国内外所得的外源基因表达效率多为宿主细胞可溶性蛋白的 0.1%~0.9%。本研究集体通过各种技术努力，促进外源基因转化蓝藻的效率提高了 5~6 倍，并提高了基因表达效率 4~5 倍，已获国家发明专利^[27]。本实验室所在的研究集体在我国蓝藻基因工程领域中较占优势，与合作者在 14 年中得到了国际上尚未报道的转 15 种外源基因的工程蓝藻，其中 6 个是转药物基因蓝藻，占国内外全部 15 个转药物基因工程蓝藻的近 50%。为了提高外源基因在蓝藻中的表达效率，本研究集体十几年来不断地改进载体质粒、启动

子、增强子、终止子和 SD 序列。这使表达效率从最初的占可溶性表达蛋白的 0.01% 提高到 3%~5%，达到了国际上蓝藻基因工程外源蛋白的最高表达效率^[28-34]。

5.2 生物柴油原料的研究对策与建议

居高不下的原料成本是影响生物柴油应用发展和普及的主要因素。近年来我国对许多生物柴油原料资源进行了研究，国内外微藻生物技术的发展也表明，微藻基因工程在我国有明显的优势和自主知识产权。从这样的基本特点出发，提出以下对策和建议，以有利于高油脂基因工程微藻的开发和利用。

5.2.1 由国家科技部、自然科学基金委等相关部门 立项资助，应用研究和基础研究相结合，做到上游、中游和下游基因工程并重，不仅开展转基因技术的研究，还要研制新型大规模反应器和制定最佳培养条件。用蓝藻表达外源基因已有较成熟技术，发展较快；但在真核藻的转化上仍然较慢，需要大力加强。

5.2.2 由农业部、国家海洋局、中石油、中石化和中海油等公司共同制定开发高油微藻的资源调查规划，共同立项资助，组织有关科研院校、养殖场、炼油企业等机构合作研究攻关。通过加强对高油微藻的基因工程改良，立足于已有的知识积累和技术基础，采用现有成熟的微藻基因工程技术，如克隆与脂类代谢有关的基因、分析新的调节元件、构建新的受体转化系统，使脂类基因在微藻中的表达效率有较大提高；通过海水培养驯化含油微藻，降低培养成本；控制培养液中 C/N 比例、延长细胞营养生长阶段等调控改良手段，提高转基因微藻细胞的总脂含量。

5.2.3 高油脂微藻制备生物柴油可能存在原料藻规模培养、藻种长期供应和采收、提取等问题。应加强微藻养殖场与炼油厂的联系，双方合作交流，既要考虑到高油微藻的生长和收获有连续性，也要与大炼油厂的常年生产进行协调。根据不同养殖地区的环境条件和炼制的要求，提高工程微藻的适应能力和产油率。培育海洋高油微藻，利用现有沿海湿地及滩涂地区规模养殖，有利于解决原料的长期供应问题。如在沿海滩涂电厂附近建设海洋高油微藻大型反应器，利用电厂排放的 CO_2 解决大规模培养所需的碳源问题，实现全年无菌纯种的规模培养及长期的藻种供应。商业化微藻生产中的采收是一个关键步骤，可以通过壳聚糖絮凝剂和泡沫分馏法

等组合技术进行采收, 简化分离过程, 降低采收成本, 并保持终产物含油微藻的本质。微藻油脂的提取可采用流动反应器甲酯化-酯交换反应-分离一体化新工艺, 并回收高品质甘油; 此外, 常温常压下固定生物酶法制备生物柴油新工艺等专利技术, 可以有效消除甲醇及副产物甘油对酶反应活性及稳定性的负面影响, 将生物柴油副产物甘油进一步转化为高附加值产品 1,3-丙二醇等技术的应用, 也可以显著提高微藻制备生物柴油的经济效益。

5.2.4 建立健全完善的生物柴油销售网络体系。生物柴油要在全国范围内推广使用, 可以分批次有步骤地在全国建立营销网络。初期可在国家有关部门协调下, 依托中石化、中石油等现有加油站系统, 使生物柴油的销售进入汽车燃料市场, 待人们普遍接受生物柴油以后, 再逐步建立自己专门的销售网络体系。

REFERENCES

- [1] Yuan ZH, Wu CZ, Ma LL, *et al.* The Principle and Technology of Biomass Utilization. Beijing: Chemical Industry Press, 2005
袁振宏, 吴创之, 马隆龙, 等. 生物质能利用原理与技术. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] Gerpen JV. Business management for biodiesel producers. NREL Technical Report, NREL/SR-51036342, 2004.
- [3] SINA-China Finance. 2004-2005 National edible fat market: Review and Outlook. <http://finance.sina.com.cn/futuremarket/futures/roll/20050121/10251312384.shtml>.
新浪财经纵横. 国内食用油脂市场 2004 年回顾与 2005 年展望. <http://finance.sina.com.cn/futuremarket/futures/roll/20050121/10251312384.shtml>.
- [4] www.toponey.com. A investigation report on Chinese edible oil market. <http://www.toponey.com/Html/20069139505-1.html>.
中国调研在线. 2006 年中国食用油市场研究报告. <http://www.toponey.com/Html/20069139505-1.html>.
- [5] www.chinanews.com.cn. <http://www.chinanews.com.cn/cj/news/2006/11-12/819402.shtml>.
中国新闻网. <http://www.chinanews.com.cn/cj/news/2006/11-12/819402.shtml>.
- [6] Jia HS, Xu YN. World biodiesel utilization and development strategies in china. *Journal of Plant Ecology*, 2006, **30** (2): 221-230.
贾虎森, 许亦农. 生物柴油利用概况及其在中国的发展思路. *植物生态学报*, 2006, **30**(2): 221-230.
- [7] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Advan*, 2007, **25**, 294-306.
- [8] Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, *et al.* A look back at the U. S. Department of Energy's Aquatic Species Program: biodiesel from algae. Close-out report. NREL/TP-580-24190, 1998.
- [9] Metting FB. Biodiversity and application of microalgae. *J Ind Microbiol*, 1996, **17**: 477-489.
- [10] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, *et al.* Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 2006, **101**: 87-96.
- [11] Gengenbach. Transgenic plants expressing maize acetyl CoA carboxylase gene and method of altering oil content. United States Patent 6222099, 2001.
- [12] Ohlrogge JB, Roesler KR, Shorrosh BS. Methods of increasing oil content of seeds. United States Patent 5925805, 1999.
- [13] Sellwood C, Slabas AR, Rawsthorne S. Effects of manipulating expression of acetyl-CoA carboxylase I in *Brassica napus* L. embryos. *Biochem Society*, 2000, **28**: 598-600.
- [14] Davis MS, Solbiati J, Cronan JE. Overproduction of Acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 28593-28598.
- [15] Dunahay TG, Jarvis EE, Roessler, PG. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *J Phycol*, 1995, **31**: 1004-1012.
- [16] Roessler PG, Ohlrogge JB. Cloning and characterization of the gene that encodes acetyl-coenzyme A carboxylase in the alga *Cyclotella cryptica*. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 19254-19259.
- [17] Leegood RC, Osmond CB, in: Dennis DT, Turpin DH (Eds.). *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longham Sci Tech, Essex, 1990, 274-298.
- [18] Sugimoto T, Tanaka K, Monma M, *et al.* Phosphoenolpyruvate carboxylase level in soybean seed highly correlates to its contents of protein and lipid. *Agri Bio Chem*, 1989, **53**: 885-887.
- [19] Chen JQ, Lang CX, Hu ZH, *et al.* Antisense PEP gene regulates t ratio of protein and lipid content in *Brassica napus* seeds. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 1999, **7**(4): 316-320.
陈锦清, 郎春秀, 胡张华, 等. 反义 PEP 基因调控油菜籽粒蛋白质/油脂含量比率的研究. *农业生物技术学报*, 1999, **7**(4): 316-320.
- [20] Chen JQ, Huang YZ, Lang CX, *et al.* Molecular cloning and sequencing of the PEP gene from *Brassia napus* and the construction of the antisense PEP gene. *Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci)*, 1999, **25**(4): 365-367.
陈锦清, 黄锐之, 郎春秀, 等. 油菜 PEP 基因的克隆及反义 PEP 基因的构建. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 1999, **25**(4): 365-367.
- [21] Zhao GL, Chen JQ, Yin AP, *et al.* Transgenic soybean lines harbouring anti-PEP gene express super-high oil content. *Molecular Plant Breeding*, 2005, **3**(6): 792-796.
赵桂兰, 陈锦清, 尹爱萍, 等. 获得反义 PEP 基因超油大豆新材料. *分子植物育种*, 2005, **3**(6): 792-796.
- [22] Sabe H, Kondo S, Shmuzev A, *et al.* Properties of human interleukin-2 receptors expressed on non-lymphoid cells

- by cDNA transfection. *Mol Biol Med*, 1984, **2**: 379–396.
- [23] Katagiri F, Kidaki T, Fujita N, *et al.* Nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Gene*, 1985, **38**: 265–269.
- [24] Luinburg I, Coleman JR. Identification, characterization and sequence analysis of the gene encoding phosphoenolpyruvate carboxylase in *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Gen Microbiol*, 1992, **138**: 685–691.
- [25] Chen L, Omiya T, Hata S, *et al.* Molecular characterization of a phosphoenolpyruvate carboxylase from a thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus vulcanus* with unusual allosteric properties. *Plant Cell Physiol* 2002, **43**: 159–169.
- [26] Zhu XY, Li Q, Liu DL, *et al.* Studies on the culture of the transgenic TNF- α *Anabaena* IB02 in 100L photobioreactor. Xiamen: Proceedings of the Symposium for National Marine Biotechnology and Marine Pharmaceuticals Academic Meeting, 2006, 220–222
朱学义, 李强, 刘栋梁, 等. 用 100L 光反应器培养转 TNF- α 鱼腥藻 IB02 的研究. 厦门: 全国海洋生物技术与海洋药物学术会议论文集, 2006, 220–222.
- [27] Shi DJ, Ran L, Li Y, *et al.* The efficient expression box and its vector of filament cyanobacterium. Chinese Patent, ZL00132268.0.2004-10-13.
施定基, 冉亮, 李艳, 等. 丝状体蓝藻高效表达盒和含有该表达盒的载体. 中国发明专利, ZL00132268.0. 2004-10-13.
- [28] Shi DJ, Deng YG, Zhao XG, *et al.* Cyanobacterial genetic engineering technology for recombinant pharmaceutical products. Proceedings of 2004 National Medicine Bioengineering Seminar of Chinese Society of Biotechnology. 2004, 54.
施定基, 邓元告, 赵兴贵, 等. 蓝细菌基因工程制备重组药物. 中国生物工程学会全国医药生物工程 2004 年会议论文集, 2004, 54.
- [29] Song DH, Liu J, Shi DJ, *et al.* The expression of Granu-
- locyte Colony-stimulating Factor (G-CSF) in *Synechococcus* sp. PCC 7002. Proceedings of the Symposium for National Marine Biotechnology and Marine Pharmaceuticals, 2006, 200–203.
宋东辉, 刘洁, 施定基, 等. 粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 在聚球藻 7002 中的表达. 厦门: 全国海洋生物技术与海洋药物学术会议论文集, 2006, 200–203.
- [30] Shi DJ, Duan R, Song DH, *et al.* Cyanobacterial gene engineering: promising biotechnological application. In: *The 10th International Conference on Applied Phycology*, Qingdao, 2005.
- [31] Ren L, Shi DJ, Dai JX, *et al.* Expression of the mouse metallothionein- I gene conferring cadmium resistance in a transgenic cyanobacterium. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, **158**: 127–132.
- [32] Liu FL, Zhang HB, Shi DJ, *et al.* Construction of shuttle vector expressing human tumor necrosis factor- α gene and expression of the gene in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Science in China (Series C)*, 1999, **29**(2): 217–224.
刘凤龙, 张宏斌, 施定基, 等. 人肿瘤坏死因子- α 基因穿梭表达载体的构建和在鱼腥藻 7120 中的表达. 中国科学 (C 辑), 1999, **29**(2): 217–224.
- [33] Luo N, Ning Y, Shi DJ, *et al.* Cloning and expression of human pro-urokinase gene in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Acta Botanica Sinica*, 2000, **42**(9): 931–935.
罗娜, 宁叶, 施定基, 等. 人尿激酶原基因在聚球藻 7002 中的克隆和表达. 植物学报, 2000, **42**(9): 931–935.
- [34] Dai W, Shi DJ, Zhang H, *et al.* Expression of human epidermal growth factor gene in cyanobacteria. *Acta Botanica Sinica*, 2001, **43**(12): 1260–1264.
戴激, 施定基, 张卉, 等. 人表皮生长因子基因在蓝藻中的克隆. 植物学报, 2001, **43**(12): 1260–1264.

2008 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动



《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。

《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。

《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 年价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。

《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472/Q, CODEN JXUUA。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。

欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄

汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401

收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: bjb@im.ac.cn

请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量

欲知详细信息请查看如下网址: <http://journals.im.ac.cn>