

Research Status and Innovation Development of Applied Studies on Microalgae Biodiesel

Bilin LU, Min ZHANG

Department of Geochemistry, Yangtze University, Jingzhou, 434023, P.R.China

Email: blin9921@sina.com

Abstract: The development of green replaceable energy which is renewable and clean has attracted more and more attention duo to the exhaustion of fossil oil and problems of the ecological environment generated by the using of fossil oil in the world today. Biodiesel is an important bio-energy source, but large-scale production of it is restricted because of high prime cost and the limited sources of raw materials. However, as the raw materials of the second-generation biodiesel, development of commercialization technology for producing biodiesel from microalgae has become a focus in the field of bio-energy and CO₂ emission mitigation. In this paper, current situation of screening and breeding of energy microalgae, culturing of large scale and harvest technology as well as production engineering are summarized, and the approach of innovation development are discussed.

Keywords: microalgae; biodiesel; Renewable energy

微藻生物柴油研究现状与创新发

卢碧林 张敏

长江大学地球化学系 湖北荆州, 434023

Email: blin9921@sina.com

摘要: 石油资源日益枯竭和化石燃料使用产生的全球生态环境变化问题, 使可再生的、清洁无污染的绿色替代能源的开发日益受到人们的重视。生物柴油是生物能源中的重要产品, 但存在成本过高和原料不足等瓶颈问题。微藻作为第二代生物柴油原料, 其生物柴油产业化研究技术开发已成为近年来国内外生物能源领域及控制碳排放领域的研究热点。本文概述了用于提取生物柴油的微藻的筛选分离、育种、大规模培养、采收方法及生物柴油的制备工艺等方面的现状, 并对该产业的创新发展思路进行了分析。

关键词: 微藻; 生物柴油; 选育; 培养

1 低碳经济环境下生物新能源发展背景

化石燃料使用给人类社会带来了极大便利, 但同时也产生了全球生态环境变化的问题, 导致生存环境不断恶化。我国经济的高速发展, 使能源供需矛盾突出, 能源供应短缺和浪费并存, 能源生产和消费面临经济发展需求和环境质量改善的双重压力, 积极开展绿色能源计划已迫在眉睫。

来源广泛的生物质可再生能源的开发利用不仅有助于缓解化石燃料日益枯竭给全球经济发展带来的危机, 还可以减少主要温室气体和污染物的排放, 利于维护生态系统平衡, 改善人类生存环境^[1]。目前几乎

所有的可再生能源(如水电, 太阳能, 风能, 潮汐能等)都集中在电力行业, 但是现阶段太阳能和风能发电价格较高。从世界范围看, 燃料需求仍未全球能源的最主要需求, 而全球已探明的石油、天然气和煤炭储量将面临耗尽。发展生物柴油等生物能源是 21 世纪世界能源结构战略性转变的一个方向和组成部分^[2]。

生物柴油是用动植物油脂、废餐饮油等加工制取的新型燃料, 国内外进行了大量的研究^[3-6]。但原料供应短缺和成本过高问题成为制约生物柴油产业化发展的瓶颈, 同时以大量消耗粮食和油料作物为代价的生物燃料开发, 一定程度上引发了粮食等农产品价格的上涨, 可能对全球粮食供应带来严重后果。另辟蹊径培育出高产、适应性强的优良燃料油原料, 是生物

基金项目: 湖北省教育厅重点科研项目(项目编号 D200512010)

柴油产业化发展的必然趋势。微藻作为一类光能自养型单细胞生物，与油料植物等其他原料相比，具有光合作用效率高、含油量高、生长周期短，在光自养培养过程中可固定大量 CO₂，可利用废水中的 N、P 等营养，不与农作物争地、争水，易于加工等，成为低碳经济下第二代生物柴油的首选原料^[7,8,9]。

2. 微藻生物柴油研究现状

从美国 1978 至 1996 年立项微藻生物柴油方面的研究开始，经过多年的研究发展，微藻生物柴油在藻种筛选与选育、大规模培养、采收技术、生物柴油制备等方面取得了较大进展。

2.1 藻种筛选与选育

目前国内外的科学家利用各种方法筛选出了一批生长速度快、脂质含量较高的微藻，分属于绿藻、硅藻、蓝藻、金藻和红藻等^[10]，为低成本生物柴油生产提供了原料支持。微藻的分离、纯化方法主要有微吸管分离法、水滴分离法、稀释分离法和平板分离法等（见表 1）。

微藻育种方法主要有选择育种、诱变育种、细胞融合、叶绿素荧光技术筛选、基因工程育种等。在各类技术中，选择育种是基础，诱变育种最常用^[11]，基因工程育种最有效。近年来微藻基因工程在微藻中表达重要的蛋白、多肽甚至次生产物合成酶体系，通

表 1. 微藻常用分离方法
Table 1. General method for the isolation of microalgae

分离方法	分离微藻类型	特点
微吸管分离法	个体较大藻类	实际操作技术难度大
水滴分离法	优势种类	操作简便、易行
稀释分离法	所有藻类	需要较多的容器分组培养，比较麻烦；目的性较差
平板分离法	底栖硅藻等能在琼脂培养基上良好生长的种类	技术要求不高，操作简单

过采用分子生物学技术阻断或修饰代谢途径，已经创制具有商业价值的工程藻株和开发高价值产品，如 NREL 育成工程微藻^[12]。基因工程技术育种的方法主要有：①外源 DNA 导入：目前采用基因枪法、玻璃珠法、金刚砂法和电击法等，其中基因枪法是常用技术，已将叶绿体和线粒体的基因传导已经成功使用在绿藻和硅藻中^[13,14]。②筛选标记及其启动子：筛选标记和合适的启动子是建立微藻遗传转化系统的两个先决条件。目前已经成功将卡那霉素抗性基因 npt II 作为筛选标记应用于 *Cyclotella cryptica* 等微藻中^[15]，抗生素的耐药基因 shble，N-乙酰化转移酶基因 nat1，硫阴离子转运蛋白基因 sat-1 也成功应用到微藻中。启动子方面乙酸辅酶 A 羧化酶基因 ACC1 和叶绿素 a/c 结合蛋白基因 fcp 启动子广泛在微藻中成功表达外源基因^[16]。③相关基因：ACCase 是脂肪酸生物合成途径的关键限速酶（图 1），脂质含量的提高主要是通过乙酰辅酶 A 羧化酶基因在微藻细胞中的高效表达，1995 年已将 ACCase 基因转化小环藻成功。利用基因工程进行新藻种的选育具有目标明确，针对性强等特点，但目前该技术还处于初步阶段，成功转化的种类较少，主要原因是外源基因不能进行基因表达或沉默表达，同时其安全性还有待进一步验证。

2.2 大规模培养

目前微藻规模培养方式有自养、异养和混合培养。微藻多为光合自养，自养微藻的大规模培养多采用传统的敞开式跑道式培养、封闭式的光生物反应器培养简单的微藻培养模式^[18]，其优点是构建简

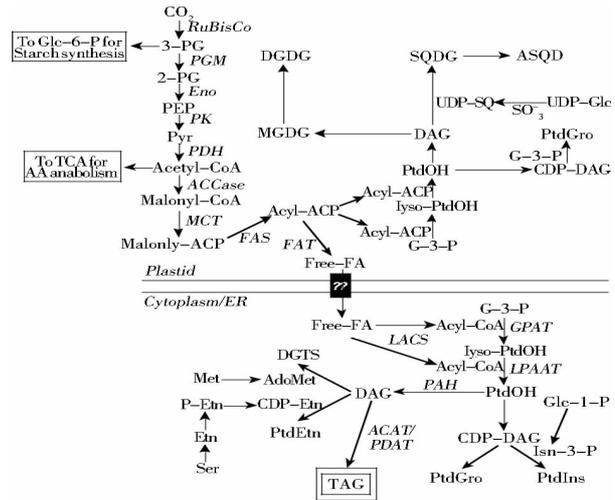


Figure 1. synthesis approach of Microalgae fatty acid.
图 1 微藻脂肪酸合成途径^[17]

单、投资成本低廉及操作简便，但开放式培养过程受光照、温度等自然环境影响较大，易被真菌、原生动物和其他藻种污染，这些因素都将导致细胞培养密

度偏小,产量低、培养面积大、生长因子难控制、CO₂补加困难、收获成本高、易被其他生物污染和产品质量较差等缺点。而且目前能满足能适应大池培养的微藻藻种不多。封闭式光生物反应器有较高的光能利用效率,可以进行全天候的连续或半连续培养,实现光合生物的高密度培养并获得较高的单位面积或体积生物量产量,已成为当今的发展方向^[19,20]。目前封闭式反应器有多种形式,如发酵罐式、管式和板式等光生物反应器。一般藻类工业生产中采用的密闭式反应器多为管式光生物反应器,其中柱式光生物反应器可分为鼓泡式和气升式两种,由于混合效果好,单位体积气体传递速率高以及培养条件易控等优势,这种反应器被认为最适合藻类大规模培养^[21,22]。与开放式光池相比,封闭式光生物反应器无污染,适用于各种微藻的培养,且培养过程中,生长参数容易控制,培养环境非常稳定;不受外界环境因素影响,全年生长期较长;比表面积大,光能利用率高,可以维持较高的培养密度而且容易收获。但密闭式光生物反应器结构复杂,放大较难,成本较高,技术上也存在一些限制因素。

一些藻类能利用有机物(如葡萄糖等)进行异养生长。与自养培养方式相比,异养培养过程无需光照,具有较大的培养密度,底物的转化率高,能实现培养条件的自动化控制,可降低采收和产物提纯等下游技术的成本,可以利用传统发酵设备生产高价值产品。藻类的异养生长,不仅可提高细胞内脂类的含量,而且也是提高其生物量的有效途径。这种培养方式避免了光自养培养过程中光抑制或光限制等问题,降低了能耗,节约了成本。但仅部分微藻都能利用有机碳源进行异养生长,同时异养培养微藻失去了光自养培养微藻生产优点,生产过程中不仅不能固定CO₂反而会排放出CO₂;需要外加碳源,成本高;异养培养系统易被生长速度快的细菌污染。

微藻混和培养能利用有机物、碳源,同时进行光合作用。微藻的混和培养过程中,光合自养和化能异养是同步且相对独立的过程。光照对两条代谢途径都有影响,但影响程度不同。

2.3 采收技术

微藻生物量的采收是生产过程的一个限制因素。在正常生产中的藻浓度相对较低,并且藻细胞很小、脆弱,易受到损伤破裂,用常规的动力离心、过滤及自然沉淀法不能有效地收集藻体。单独运用化学絮凝法、过滤法、微气泡絮凝悬浮法收集微藻都有一定的

优势和局限性。考虑到经济因素,目前一般采用絮凝法、离心法和气浮法3种方法采收微藻。其中化学絮凝法需要针对不同种类的微藻寻找合适的絮凝剂;离心分离法比较简单,但成本较高;气浮法采收小球藻成本较低,又可连续化操作,适合大生产的需要,但气浮法需要向藻液中鼓入大量的气体,采收效果受到絮凝剂用量、pH和充入的气泡密度等因素影响。

2.4 生物柴油制备

酯交换法是当前制备生物柴油的常用方法。根据催化剂类型的不同,酯交换法主要分酸催化、碱催化、生物酶催化和超临界催化四种。酸催化的酯化反应需要较高的温度,耗能较高;碱催化的特点是转化率高,但容易产生皂化,后处理中容易产生污水;酶催化的缺点是酶的价格较高;超临界法的特点是反应时间短,转化率高,产物易分离但其反应设备条件要求高,醇耗量大,生产成本低。目前酸催化的反应条件为30℃、醇油质量比56:1、反应时间4h;碱催化的反应条件为50℃、醇油比3:1、催化剂KOH用量为1%,反应时间1h;采用超声化学技术与固定化半导型纳米氧化物催化生产微藻生物柴油也取得进展^[23,24]。

3. 微藻生物柴油研究开发中存在问题

目前国内外微藻生物柴油的研究和开发处于起步阶段,存在的突出问题是成本过高,理论和现实差距较大,技术层面上许多关键技术有待突破,开发应用上相关工程技术需要集成,组织管理上支撑资金配套政策亟需完善。

高成本是目前限制该技术产业化的瓶颈。根据NREL的数据测算,从工程海藻中提取生物柴油在美国的成本为134.4美元/桶,相当于人民币约6700元/t,明显高于现有石化柴油。

其次,原料问题也限制该技术的发展。微藻细胞小、细胞壁大多坚硬,缺乏经济有效的藻体收获和细胞破壁技术。而且生长快的微藻藻种通常含油量只有10%~20%,而含油量大于60%的藻种生长速度较慢,体积小于10 μ m的细胞不易于收获。

再次,缺乏成熟的工业化工艺技术。现有得微藻研究工作多停留在实验室和小规模基础上,缺少工业化培养的大型光生物反应器装置以及适宜于自然阳光和温度变化条件下的细胞高密度原理与培养技术,如何规模放大是当前的主要瓶颈问题。微藻细胞工程培养技术存在多种渠道的敌害生物污染,严重影响培养效率甚至导致彻底失败。

另外,生物柴油产业化还存在投入资金不足、政策滞后等问题。

4. 微藻生物柴油的发展方向

针对生物柴油研究开发过程中存在的问题,微藻生物柴油的发展可基于以下发展思路:选育目标微藻,建立工业化微藻产油技术集成平台,对限制微藻生物能源开发的关键理论和应用技术难点开展多学科攻关,突破关键技术,优化产业化技术工艺和流程,完善政策管理体系。

采用系统生物学方法,提高微藻油脂产量。以快速生长、高油脂含量和抗逆能力强为育种目标,结合微藻能适应多种极端或胁迫生理条件(耐盐碱、光温胁迫、光氧化胁迫、营养基质胁迫)和具有高值化综合利用的潜力的定向筛选,采用代谢工程和基因工程方法,开展能源微藻藻种的选育,确定适合于不同条件下快速生长的能源微藻藻种。

多学科交叉,强化微藻培养、采收和分离生产效率。通过光生物反应器的设计使反应器增大反应器的比表面积,充分利用光能;增强气液传质效率,保证稳定的最大生物量产率;提供高效光源,尽可能保持最高的光能转化效率,保证反应器整体的高效率运转;选用适宜的材料并根据所培养藻类的特点确定反应器大小、形状及结构;反应器的总体积结构应简洁、实用,并且易于放大。微藻制备生物柴油的过程中,收获藻体,细胞干燥,裂解和抽提油脂的花费占柴油生产总成本的40%~60%。通过技术集成化繁为简,用有机溶剂与培养液共混,使细胞内油脂连续被抽提至有机相,藻细胞仍能保持良好的生长趋势,经蒸馏分离有机溶剂(重复利用)和油脂,是新的研究方向。

优化系统,降低微藻生物柴油生产系统成本。微藻生物柴油生产过程的成本受地域、气候、季节、藻种及石油价格等因素的影响很大,要对微藻生物柴油生产系统各个环节的成本进行综合的系统优化。根据中试运行的实际成本,进行微藻生物柴油生产系统中微藻生物柴油、能源微藻胞内生物活性物质等副产品开发利用(如蛋白质、多糖、色素、多不饱和脂肪酸等微藻源系列产品)以及包括CO₂减排、富含N和P的废水处理等产生的收益等的综合评估和预测,确定我国不同区域、不同季节的微藻生物柴油产业化成本及进一步优化技术关键点。

References (参考文献):

[1] Turner J A. Realizable renewable energy future [J].*Science*, 1999, 285: 687-689.

- [2] Mathews J A. Carbon-negative biofuels[J]. *Energy Policy*, 2008, 36(3): 940-945.
- [3] Lu Bilin, Zhou Lingge, Mao Zhichao. Development of Research and Application of Biodiesel[J]. *Biotechnology*. 2005,15(3): 95-97(Ch).
- [4] Adams C, Peters J F, Rand M C, et al. Investigation of soybean oil as a diesel fuel extender[J].*Am. Oil Chem. Soc.*,1983,60:1574-1579.
- [5] Billand. Production of hydrocarbons by paralysis of methyl esters from rapeseed oil [J]. *JAOCS*, 1995, 72:1149-1154.
- [6] Lu Bilin, Wu Hao, Ye Jing. Study on Production of biodiesel with Cottonseed Oil[J].*Cereals and Oils Processing*. 2006,12:45-47(Ch).
- [7] Aslan S, Kapdan I. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae [J]. *Ecol Eng*, 2006, 28:64-70.
- [8] Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol [J].*Trends Biotechnol*. 2008a, 26(3):126-131.
- [9] Rupprecht J, Hankamer B, Mussnug JH et al. Perspectives and advances of biological H₂ production in micro-organisms[J]. *Appl Microbial Biotech* 2006,72:442-449.
- [10] John S, Terri D.A looks back at the U.S. department of energy's aquatic species [M]. Program- biodiesel from algae. 1998.
- [11] Lanfalonì L, Trlnei M, Russo M et al. Mutagenesis of the cyanobacterium *Spirulina platensis* by UV and nitro-soguanidine treatment[J].*FEMS Microbiol Lett*,1991,83(1): 85-90.
- [12] Jarvis E E. ITIT. Symposium on Microalgae Biotechnology -Basics and Applications[R]. Osaka, 1996: 15-16.
- [13] Kroth PG. Genetic transformation: a tool to study protein targeting in diatoms [J].*Methods Mol Biol*, 2007, 390:257-268.
- [14] Remacle C, Cardol P, Coosemans N, et al. High efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complexly genes. [J] *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(12):477-4776.
- [15] Dunahay TG, Jarvis EE, Rosessler PG. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila* [J]. *Phycol*, 1995, 31:1004-1012.
- [16] Poulsen N, Chesley PM, Kroeger N. Molecular genetic manipulation of the diatom *Thalassiosira pseudomonas* (Bacilliarophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 2006, 42(5): 1059-1065.
- [17] Riekhof WR, Sears BB, Benning C. Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discover of the betain elipid synthase BTA1(Cr). *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(2):242-252.
- [18] Weissman J, Goebel RP, Benemann JR. Photobioreactor design: mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation[J]. *Biotechnol Bioeng*. 1988, 31:336-344.
- [19] Carvalho A p, Meireles L A, Malcata F X. Microalgareactors: a review of an enclosed system designs and performances[J]. *Biotechnol Prog*, 2006, 22:1490-1506.
- [20] Pulzo. Photobioreactors: production systems for photo strophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*[J], 2001, 57:287-293.
- [21] Mirón AS, Gómez AC, Camacho FG, Molina GE, Chisti Y. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae[J]. *Biotechnol*, 1999, 70: 249-270.
- [22] Zitelli GC, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns [J]. *Aquaculture*. 2006, 261:932-943.
- [23] Miao Xiaoling, Wu Qingyu. Study on preparation of biodiesel from microalgae oil[J]. *Acta Energiæ Solaris Sinica*. 2007, 28(2):219-222(Ch).
- [24] Yang Zhizhong, Yan Zhuocheng, Yan Jinxuan. New technical route for preparation of algae biodiesel--Sonochemistry technique and transesterification catalyzed by nano semiconductive metal oxides [J]. *Materials Research and Application*. 2008, 2(4):387-389(Ch).