

微藻生物柴油研究现状与发展策略

The research status, problems and developmental strategies in culture microalgal for biodiesel

刘建国^{1,2}, 龙元霁^{1,3}, 黄 园^{1,3}, 庞 通¹, 林 伟^{1,2}, 李 凌¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 海洋研究所 海洋科学与技术研究中心, 江苏 南通 226000; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

中图分类号: S154.38⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)10-0132-10

环境污染和能源短缺对社会发展的影响日渐突显, 不仅制约着经济可持续发展, 有时甚至危及国家能源安全^[1-2]。开发可再生清洁能源对缓解能源、经济和环境危机具有多重意义。与其他可再生能源相比, 生物能源来源丰富, 具有可储藏、可运输和可再生以及二次污染少等特点^[3]。生物能源可粗分三代^[1, 4-5]: 第一代主要以玉米、甘蔗和大豆等粮食作物为原料, 因涉及粮食安全问题倍受争议^[1]; 第二代以秸秆、枯草等非粮食原料生产燃料乙醇和生物柴油, 因原料供应不稳定、运输成本高等限制, 生产规模扩大存在难度^[1]; 第三代以藻类为原料生产燃料乙醇和生物柴油, 在理论上开发潜力大、优势明显而倍受关注。

微藻是自然界起源最早、分布最广、种类和数量最大的生物质资源^[4], 在特定条件下可大量积累并储藏油脂, 其含量占到细胞干重的10%~50%^[5-10], 甚至更高^[11]。微藻作为生物柴油生产原料, 与其他产油生物相比具有许多优势^[3-4, 7-13]。首先, 微藻对生长环境要求简单, 能适应各种生长环境, 可避免与传统农业争夺耕地。其次, 微藻无叶茎根分化, 预处理成本相对较低, 且在提取油脂后的藻渣还可生产其他高附加值产品^[2]。同时, 微藻光合作用效率高, 一般1天内生物量就可翻番, 某些藻株(如莱茵衣藻和小球藻)甚至只需几小时, 特别是在混养(自养+异养)情况下其繁殖速率更快, 通常培养周期不超过两周^[3]。微藻可全年培养、不受季节限制, 可保证生产原料的稳定供应。此外, 微藻光合作用固定CO₂, 同时高效吸收废水中氮磷等营养盐, 降低水体富营养化程度, 具有很强的环境修复功能^[1-3]。

从燃料角度, 微藻生物柴油热值高、点火性好,

不含石蜡、低温流动性强, 可应用于运输领域^[1]。可替代化石柴油用于公交车、汽车运输, 还可作为非道路用柴油机的替代燃料, 应用于海洋运输、水域动力设备、地段矿业设备及燃料发电厂等领域。微藻生物柴油通用性好, 无须改动柴油机可直接添加使用^[11]。另一方面, 微藻柴油含硫低、不含芳香族烷烃, 作为替代能源可降低硫氧化物、烃类、一氧化碳等物质的排放^[12], 属于环境友好的可再生能源。

尽管微藻生物柴油具有诸多优势, 但不可否认迄今为止, 其商业化生产在国内外尚未实现。表观上是由于生产成本太高导致的^[6, 12-15], 实质上却是对生产过程的共性科学原理认知不足、系列关键性技术尚未有效解决等众多因素共同制约的。为此, 作者针对微藻柴油生产主要环节的研究现状予以概述, 重点分析存在的主要问题, 并针对未来发展方向提出了自己的观点, 目的推动该产业化发展。

1 微藻生物柴油开发的流程与环节

微藻生物柴油开发从微藻种质资源获得开始, 到生产出合格制品涉及诸多环节的不同技术。例如: (1) 生长快、含油高、抗逆强等适宜于规模化工程培养的优良藻株筛选; (2) 富油工程微藻基础生物学特性研究; (3) 能源微藻培养条件的优化、过程控制与放大; (4) 能源微藻种子的批量生产与稳定供应;

收稿日期: 2012-10-08; 修回日期: 2012-09-13

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2011CB200904); 江苏省基础研究计划重点项目(2011009); 国家海洋可再生资源专项(GHME2011SW01)

作者简介: 刘建国(1964-), 男, 山东青岛人, 博士, 研究员, 主要从事藻类与藻类生物技术研究, 电话: 0532-82898709, E-mail: jgliu@qdio.ac.cn

(5) 能源微藻工业化生产设施研制与运营; (6) 敌害生物预警和防御体系建设; (7) 能源微藻多级采收及培养水体的循环利用; (8) 富油微藻细胞破壁与油脂分离提取技术; (9) 微藻生物柴油制备及藻渣综合利用等。上述微藻生物柴油开发的各个环节的不同技术之间, 存在着相互交叉和牵连。某个环节的单项技术改变, 将导致其他环节发生相应调整, 有时甚至重新设置整个流程工艺。可以说, 微藻生物柴油开发需要但不完全依赖于单一技术, 是多种技术的集成。在实际运作中, 需要结合具体藻种特性、培养地区自然条件、经济和人力资源状况, 针对各环节所存在的多种技术, 经过反复考察评估、拼接、取舍和组装, 才能建立适宜的开发流程。

尽管如此, 微藻生物柴油开发重点依靠于基础科学原理和关键技术体系突破, 概括为如下4点: 优质藻种的筛选和改良、微藻细胞高密度培养优化与放大、微藻采收和油脂提取加工、微藻生物质资源的综合开发利用^[1, 3, 5]。其中, 优良产油微藻筛选是微藻生物柴油各项工作的基础, 而基因工程改良技术是获得优质藻株的重要手段; 培养优化与规模放大技术是保障微藻生物柴油产业化成功的核心; 而后期藻体的采收、油脂提取、制备过程能耗控制是降低成本的关键, 高附加值产品开发是产业化运营的重要辅助举措。

2 优质产油微藻的筛选与培育

2.1 富油藻株的筛选

富油藻种的选育是微藻柴油生产流程的第一步, 也是微藻能源开发的基础与核心, 对提高微藻产油效率和降低成本起着决定性作用^[6, 16]。自1978年美国启动“水生物种计划——藻类生物柴油(简称ASP)”以来, 藻种选育一直是微藻能源发展致力突破的命题。在国外, 尤其发达国家非常重视微藻的筛选工作^[17-18]。国外微藻种质库主要有美国的CCMP、ATCC、英国的CCAP、日本的IAM、澳大利亚的CCLM、挪威的NIVA、加拿大的NEPCC和UTCC、德国的CCAC等。近年来, 我国对此十分重视, 从国家层面先后启动多项任务, 从科技部863探索课题和863重点项目、973项目, 以及国家海洋局公益课题、中科院太阳能计划、中科院和中石化联合项目, 到“十二五”期间的科技部支撑计划、科技基础性工作专项和国家海洋局可再生能源专项, 能源微藻分离筛选均为重要研究内容。

微藻是否具备高产油能力, 需根据生物产量及总脂(特别是中性脂)含量等综合评估^[19], 目前研究最多的是绿藻和硅藻^[6, 9-11, 14, 16, 19-25], 如斜生栅藻、小球藻、微拟球藻、杜氏盐藻、三角褐指藻、布朗葡萄藻等。此外金藻也是富油较多的微藻类群。微藻油脂含量大多在30%~50%之间^[5-6, 9, 16, 26], 最高可达干重80%^[11]。除了油脂含量, 油脂质量也很关键。在油脂组成上中性脂多易于生物柴油制备, 其中碳链长度在14~18的中性脂肪酸最好。同时, 产油微藻藻株必须具备快速生长特性, 只有快速生长的种类才能耐污染, 更易于实现高密度培养和取得生物量。没有生物量的微藻即使有理想的油脂含量, 也难以成为优质藻株。应当指出, 生长快的微藻个体一般较小, 体积小虽有利于悬浮培养, 却不易于后期细胞采收。在考察优良产油藻株时, 不可忽视那些个体较大(特别是丝状)的微藻, 只要其含油量较高, 即使其细胞生长并不很快, 由于易于采收, 可减少收获过程的能耗和微藻柴油制备成本, 有可能成为理想的工程藻株。

抗逆能力是藻株筛选中重点考察的指标。尽管某些富油微藻在室内人工培养条件下可较好地生长, 但是其最适温度和光照强度范围过窄, 对环境要求苛刻, 却很难实现户外大规模扩大培养。在户外光照强度和温度都随着季节、太阳升降和天气等出现很大变化, 因此抗逆能力较弱的藻株在规模化户外培养中, 难以达到实验室预期效果。相反, 最适温度和光照强度范围较宽的藻株, 能更好地适应变化的环境条件, 而易于取得较好的培养效果。另外, 高温、高碱、高盐等极端环境条件, 在对产油藻株产生胁迫的同时, 也不利于其他杂藻和敌害生物的生长繁殖。利用高耐受性产油藻株对极端环境的耐受性, 选择在特定地区和特定极端条件下开展微藻的大规模培养, 可最大限度降低杂藻和敌害生物的侵染, 保证产油微藻的单种培养。因此, 可耐受极端环境(如高温、高pH和高盐度)的富油藻株通常属于理想的工程微藻。

对极端温度的耐受有耐高温和耐低温。就开发微藻生物柴油而言, 耐高温藻株比耐低温藻株更值得关注。首先, 高温有利于饱和脂肪酸的合成, 饱和脂肪酸更利于生物柴油开发; 而低温(甚至冷冻)条件则更适宜藻细胞中不饱和脂肪酸的累积, 不饱和脂肪酸有利于藻类细胞维持膜流动性、保障生理生化功能, 也有助于开发高附加值产品, 但却

不利于生物柴油的制备。其次,在微藻规模化户外培养过程中,水体温度很容易随着日光照射快速升高,并且人工升温较降温而言更容易、能耗也少;同时,在低温区域规模培养微藻还易遭受冷冻结冰问题困扰,导致培养设施发生损坏。另外,低温通常伴随着低光照条件,而低光照难以维持高微藻生物产量。基于上述原因,建议更多关注耐高温富油微藻的筛选。

相对于海水以及咸水富油微藻,淡水微藻具有更多样的生物类群,在室内小规模培养中,其细胞生长速度理论上高于海水微藻和咸水微藻。以往我国微藻的筛选工作大多以淡水微藻为主,海洋微藻相对较少,且近岸多于近海。从国外微藻种质库所收集到的信息也可看到类似的情况。从微藻能源产业化应用前景分析,未来更应关注海水微藻,其次是咸水微藻,淡水微藻中更需关注可在污水环境中生长的微藻类群。这主要取决于现阶段微藻培养的细胞密度还较低,每升藻液达到 0.5~1.0 g 已实属不易。也就是说,生产 1 吨微藻至少要上千吨水来维持,这在淡水资源稀少的任何国家都是难以允可,其经济成本也难以承受。因此,利用丰富而廉价的海水、咸水资源,或结合污水净化处理进行微藻生物柴油开发才具有可行性。就海水能源微藻筛选而言,不仅要关注沿岸和近海海洋微藻,更应关注大洋微藻种质。原因在于:大洋海域远离人类密集活动的陆地,其水质多呈寡营养和低无机碳状态,微藻长期在该环境中生存繁衍并成为优势种群,推测其在生理特性上存在着有别于其他藻株的特殊浓缩机制,有可能分离出快速生长藻株;寡营养环境通常是微藻产油的基本条件,从大洋海域获得的藻株可能兼具高产油特性;大洋海域光照强、海温高、通透性大,从中有希望获得抗逆性强的微藻藻株。

优良能源微藻筛选还需考虑诸多其他因素,如细胞大小、细胞壁厚度、抗剪切能力、破碎难度、耐低 pH 或高 CO₂ 能力等。需要指出目前产油微藻筛选尚缺少统一标准。在藻种不一、培养方式和参数各异、油脂分析方法不固定的情况下,很难科学客观地比较不同藻株繁殖和产油能力。比如,油脂分析包括化学溶剂提取总脂分析检测、气相色谱检测,尼罗红等荧光染色结合荧光显微镜和流式细胞仪检测等多种方法^[6, 16],不同检测方法所得的脂质含量和组成存在较大差别。尼罗红染色测定油脂时,不同藻株对染料的吸收能力存在很大差异,需控制

好染色条件,否则藻株对染料吸收能力的波动将影响结果的精确性^[6]。同样,细胞破碎和萃取油脂是否完全、油脂是否被氧化等也在很大程度上影响测定结果。为此,有必要建立统一的提取与检测标准,客观比较藻株的真实产油能力,为筛选优良藻株打下基础。

2.2 富油微藻的工程培育

尽管自然界微藻种质分布广、数量大、多样性高,但从中筛选到满足产业化生产需求的超级藻株却存在很大的盲目性。事实上,从上世纪70年代开始,美国ASP计划^[17, 26]用长达20年的时间,对3000多个水生藻种的产油能力进行了系统性研究,然而很遗憾尚未有一个藻种符合诸多标准,可直接用于生物柴油产业化生产^[6, 22]。

随着分子生物技术的发展,通过基因工程和代谢工程手段,为有针对性的培育优质藻种带来了希望。通过基因工程技术有针对地改变微藻细胞结构,定向改良藻株的特定性状(例如如光合效率、生长速度、抗逆性以及油脂产量等),调控微藻脂肪酸的合成途径,提高脂肪酸合成能力,培育生物产量和油脂含量更高的工程藻株已成为当今研究热点^[7, 10, 18, 21, 23, 25]。借助人工筛选出的优良产油藻株,在大量基础生物学(如基因组学、转录组学、脂质组学、蛋白质组学和代谢网络等多个学科)研究基础上^[7],通过RNAi干扰、基因敲除等技术^[18],实现表达目标产物合成酶基因过表达,以及阻断某些代谢通路等途径,也有希望培育出生长更快、产油效率更高的产油微藻工程藻株。

而到目前为止,人们对微藻细胞内脂质及其他高附加值产品的代谢机制仍不十分清楚^[20]。在其他高等植物中基因工程和代谢工程研究已取得了一定进展,且研究发现微藻细胞与高等产油植物体内脂质的合成途径基本一致^[13, 22]。因此,借鉴同源分析和已有研究结果,将有助于工程微藻应用开发与基因改良。与其他生物一样,微藻细胞脂质的积累调节机制异常复杂^[13, 22]。目标基因在过表达的同时,可能还受到其他信号的负反馈调控抑制,导致过表达效果被缓冲稀释。因此针对某一特定基因的改造,对脂质积累作用通常十分有限。关键酶分离只是改良的第一步,接下来还需弄清微藻细胞具体合成代谢机制,在分子水平对微藻的不断改良,才可能获得高效优质的工程微藻^[24]。

3 产油微藻培养与规模放大

3.1 微藻培养的优化

微藻产油效率主要取决于其含油量与生长速率,二者通常呈负相关性^[28, 29],细胞大量积累油脂过程常伴随生长速度的下降^[30-31]。除藻种自身原因外,决定微藻产油效率(微藻含油量和生长速率的乘积)最大和更直接的在于微藻培养。微藻培养看似简单,但有效控制诸多复杂因素,将微藻(尤其规模化)培养好,发挥其最大产油效率却不易把握。需要深入认知培养过程中存在的共性和个性问题,在此基础上不断优化才能建立培养模式条件。

目前国内外对微藻的认知大多源自一次(或间歇)性悬浮培养^[32-39]。该培养的结论比较直观,但与优化培养条件之间尚存在很大差距。具体表现在:(1)对培养过程动态分析不足。最佳营养盐浓度通常指培养起始浓度,该浓度随培养时间延长迅速下降;同时最佳细胞生长(或油脂积累)量也只是某一特定时间的结果。这样得到的结论只是整个培养期间的平均生长速率与营养盐开始浓度之间的对应关系,缺少瞬时生长速率与届时营养盐浓度之间真正的对应关系。(2)从定性角度讲,低氮(磷)浓度有利于油脂积累、但不利于生物量增加。但是从定量角度上,对决定微藻从生长阶段向油脂积累阶段转换的关键浓度并不清晰,难以有的放矢地控制营养盐浓度。(3)考察某一因素对细胞的生长(或油脂积累)作用时,通常未排除其他因素的干扰,难免得到偏差、臆像,甚至错误的结论。(4)无论色素含量、细胞大小和密度、单位细胞所接受的光照量、其他生理生化指标、细胞代谢产物及调控水平等各类参数指标,在微藻培养过程中均存在动态变化^[40],且上述各参数间也存在错综复杂的相互作用,需仔细分析甄别,才能从中找出真正的限制性因素。换言之,在微藻培养中仅谋求木桶长板是不够的,更重要的是找到限制木桶容量的短板并加以弥补;并且短板常常是相对的,在某一短板被弥补后又会出现新的替代短板。因此,要维持微藻培养最佳效果,并有效挖掘微藻产油潜力,需对短板进行循环定位并加以弥补,维持培养体系的整体平衡。

微藻群体与个体之间的复杂关系尚需进一步阐明。比如:光照强度通常只是培养体系表面光强,没有综合考虑细胞密度、培养体系类型、光耗散、光径及细胞穿梭节律等因素的作用。群体与个体间的

差异与相互依赖关系不清晰,难以剖析微藻细胞究竟处于光抑制还是光不足状态。尚需结合搅拌速率、培养设备类型、细胞密度及气流液流等因素综合分析,将群体问题平均到个体水平考察,可更准确阐述相关规律并采取相应措施。未来能源微藻的规模化生产不可能完全脱离光自养培养,而室外光照强度、温度等因素均随季节、日出日落、云量等呈现非典型性周期震荡。应结合活体快速检测技术(如叶绿素荧光植物效率分析)等,准确分析把握各参数瞬间变化产生的动态影响。只有对上述动态变化规律有了充足认识,才能在实际培养中有的放矢,保障培养体系高效稳定的生产。

3.2 微藻培养模式

微藻规模培养是微藻生物柴油生产的关键,目前培养主要有开放式和封闭式两大系统^[7, 15]。开放式培养系统一般建于室外,多以自然光为光源和热源,具有建设成本低廉、能源投入少、易于清洗等特点,其中以环形跑道式培养池最为常见^[15]。开放池多用叶轮转动方式维持藻液的循环混合,防止藻体沉淀,提高藻体光能利用率。为降低污染和水分蒸发,生产中常在培养池体上覆盖透光膜。开放池在微藻规模培养中已有广泛应用,培养体积通常从吨级到数百吨不等。其不足在于占地面积大,光温控制难度高、藻细胞生长易受环境变化影响、生物产率低等,可培养的藻株种类有限。此外该系统培养过程易受杂藻、菌类等敌害生物污染,培养稳定性较差。封闭式光生物反应器培养系统运行相对稳定,光利用率高,培养条件易于人工控制,可实现微藻高密度培养,其最大不足是建设和运行成本较高^[8, 24]。

两种培养系统各具优缺点,在生产上选择哪种培养方式需依据藻的特性、产品定位、经济实力等情况进行抉择。通常生长快或抗逆的微藻采用开放式培养池培养,相反细胞生长慢、抗逆性弱的微藻采用封闭式光生物反应器培养;产品价位相对较低、对产品质量要求不高的采用开放式培养池培养,而产品价位较高、对产品质量要求严格的采用封闭式光生物反应器培养;在生产上,规模较小的微藻种子培养采用封闭式反应器系统,以获得较高的单位体积生物量,而规模放大则采用开放池培养。上述两种体系各有优、缺点,有效组合模式可相互弥补其不足^[1, 3],已被很多产业部门接受,也将适宜于微藻生物能源开发。

另外,新近研制出一种介于二者之间的培养模式,其最大特点是将藻液混匀所剩余的能量用于藻体收获,可有效降低能耗。其基本构思是:在培养装置一端设节律性起降装置,该装置产生波浪,在波向外传导过程中实现藻液混匀;当波传播到光生物反应器另一端时收集剩余能量,利用该能量将藻液挤入带有瓣膜阀门的细管中,不断提升藻液水位,然后在重力作用下藻液经微孔滤膜完成固液分离,过滤液重新返回到培养体系中,而浓缩藻体收集后加工。该培养模式目前尚需不断完善。

3.3 光生物反应器研制

用于微藻培养的光生物反应器与发酵生物反应器基本原理和结构类似,主要通过温度、溶解氧、CO₂、pH 值等培养条件调节与控制,实现优化培养并获得更多的生物产品。光生物反应器与发酵用反应器最大不同在于研制材料一般是透光的,或者需要内置光源提供光照。具有透光性的材料目前主要局限在玻璃、有机玻璃和塑料等,其他材质通常透光性很差或根本不具备透光性。一般而言,透光材料的抗压性和耐高温性能都较差,难以采用高温高压方式灭菌消毒。透光材料的上述特性导致光生物反应器研制、放大等受到了很大限制。采用内置式光源可摆脱上述限制,对生产高附加值产品而言也是可行的。但是对于微藻能源生产而言,内置式光源仅适用于种子培养,在后期规模化生产中其总能量净收支为负值而失去意义。

目前应用较多的光生物反应器有垂直柱状反应器、平板式反应器和管道式反应器等形式,每种光生物反应器都有各自的特点和优势^[1, 3, 8, 15]。垂直柱状光生物反应器设计简洁紧凑,具有高物质转化和低能耗的特点。其移动性强,剪应力低且混合好,光抑制和光氧化少,有较广的适应范围。该系统易于微藻固定化培养,也较易消毒灭菌,适宜于微藻规模化培养。但此类型反应器表面光照面积随规模扩大而迅速减少。每个柱状光生物反应器单元的培养体积在几十升到几百升规模时,其细胞培养效果较好。

平板式光生物反应器有较大的照射面积、光径好,光能利用率和生产效率都较高,成本相对较低,是最适宜室外规模化微藻培养的光生物反应器之一。但平板式光生物反应器的规模化生产需大量材料支持,生产扩大难度较高。其温度控制难度大,并有一定程度贴壁生长、清洗难度大。同样,每个平板光生物反应器单元的培养体积在几十升到百升级规

模时,可获得较好的培养效果。管道式光生物反应器受光面积较大,适于户外培养,相对高产,成本也较低。该系统可保持很高的表面积比,但同时占地面积大,其传质特性较差,需与脱气罐连接排除培养过程中产生的氧气,并定时补充 CO₂ 以稳定 pH 值。其次该系统控温难度较大,而目前配置恒温系统成本很高。此外,该反应器培养过程藻细胞易贴壁,需研发专有清洗系统,连续或间歇性清除贴壁细胞,保持其透光度和培养效果,避免不断拆除和消毒等操作所造成的大量材料、人力和时间浪费。通常,管道光生物反应器培养体积在百升到吨级规模时,有比较理想的培养效果。

总之,光生物反应器在微藻的大规模培养中具备众多优势而倍受关注,其规模放大是微藻规模培养的重要环节,难点在于如何保持光利用、温度、混合、气体交换、传质等特性的稳定^[8]。如何在反应器原理和结构上进行突破和改进,保证光传输与均匀分布,从根本上解决光反应器占地大、投资比重大及操作能耗高等问题仍将是未来研究重点^[7]。

3.4 细胞固定化培养

藻类细胞可液体悬浮培养和固定化培养。固定化培养可改善藻体自身的代谢调控、提升藻细胞功能,有效提高光合生长速率及油脂含量,是提高微藻产油率的有效途径。将固定于聚苯乙烯载体的微藻置于污水中培养,采用刮板法收获藻细胞,可获得较理想的生物量和脂肪酸含量,去除污水中总氮、总磷的效果良好^[14]。固定化技术可在一定程度上降低收获成本、避免轮虫等敌害生物摄食,其固定化培养载体可重复利用。如将微藻固定化与污水处理技术偶联,其综合应用效果将显著优于游离培养,为进一步探索方向。

3.5 敌害生物防治

敌害生物污染问题在小规模微藻培养中并不突出,但在产业化生产过程中,随着培养规模的逐步扩大其危害愈发严重。危害微藻培养的敌害生物很多,其繁殖与摄食能力强,常常为微藻生长速率的数百甚至千万倍,主要包括原生动物和后生动物,如轮虫、纤毛虫、卤虫、变形虫、昆虫幼虫(如孑孓)等。以危害微藻工程培养的纤毛虫为例,藻种接种后的 2~3 d 便可能出现,轻者影响微藻的生长,重者因纤毛虫的吞噬将出现藻细胞数量的急剧下降。轮虫繁殖速度快、摄食能力强,一旦发生污染,几天时间

内可将培养的微藻全部食光。轮虫在微藻培养中主要有 3 方面危害,其一轮虫大量繁殖引起水体溶氧急剧下降、代谢氨和毒素大量积累并导致水质恶化;其二轮虫大量吞食微藻细胞,据计算 1 个轮虫每天能摄食数万个微藻细胞。因此,一旦规模化微藻培养体系中发生轮虫污染,将很可能引起微藻细胞密度的迅速下降,最终致使整个培养失败。此外,轮虫、卤虫以及变形虫等敌害生物繁殖产生大量卵,它们在生产养殖中很难彻底清除,可能成为下次培养的污染源,形成恶性循环。

杂藻入侵也是微藻大规模培养中的重要敌害。微藻生长通常与产油呈负相关性,在微藻油脂积累过程中,其细胞生长速率呈现下降,这时其他某些生长快但不产油的微藻(简称杂藻)入侵后易成为优势种,降低培养体系的产油效率和微藻产品质量。同时,杂藻污染后必然与能源微藻竞争二氧化碳、光能和营养,最终使能源微藻生长更慢。另外,杂藻与原生动物一样,作为污染源可长期影响能源微藻培养周围环境,制约微藻培养规模扩大和产业化发展。

微藻规模化培养涉及环节众多,无论开放式系统还是封闭式光生物反应器培养,都难以杜绝来自水源、空气、肥料、仪器、培养管道和容器(或光反应器)等的敌害生物,有时前期培养的藻种就已污染了敌害生物。因此如果管理措施不到位,发生敌害生物污染不可避免,而且一旦出现污染即使耗时费力也难以根除。对敌害生物的防治需要先对物料严格消毒处理,有效阻断污染源传入途径。目前国内外在消毒净化处理上常用的主要有臭氧、紫外线、次氯酸钠、物理过滤等方法。在规模扩大培养中,对藻种纯度的控制可通过微孔过滤和尼龙网隔离等手段,该技术能有效清除大型的食藻动物,但对于个体很小的却难以去除。

原生动物和藻类都为真核单细胞生物,在使用药物清除原生动物时,很难保证对产油微藻生长不产生伤害。以往有通过降低藻液 pH 值至 3.0 杀死金藻液和扁藻液中的尖鼻虫^[41]、使用次氯酸钠治理小新月菱形藻中鞭毛虫污染的报道^[42]。在水产养殖中,甲醛、氨水、过氧化氢等也常被用来处理原生动物污染^[43-45]。但上述方法专一性不强,在杀死原生动物的同时也严重制约了微藻生长。奎宁作为抗疟疾特效药可杀灭盐藻培养中的纤毛虫^[46],然而在大规模培养中使用的成本太高。国内外轮虫防治的方法包括:①Cu、Zn、Cd、Pb 等对轮虫具有高毒性的金属

离子,其 24 h 的半致死浓度通常在 1 mg/L 左右。

②有机磷类、氨基甲酸类等农药。上述 2 种方法只考虑了胁迫对轮虫的影响,而未考虑对微藻生长繁殖及产品质量影响。③病毒与真菌:20 世纪 90 年代,Comps 等人从养殖场死亡的轮虫体内分离到病毒和真菌(海洋双 RNA 病毒和链壶菌),通过实验将其感染轮虫,证明这类病毒和真菌可使轮虫种群数量减少、怀卵率降低。

综上所述,敌害生物问题限制着能源微藻产业发展,目前国内外尚无有效避免敌害生物入侵和治理技术,急需探讨成本低、专一性强且对藻类毒性小的技术方法。

3.6 微藻营养方式

根据对光源和碳源的需求可将微藻营养方式分为光自养、光异养、化能自养、化能异养和混合营养等方式^[1, 5-6, 47]。许多微藻既可进行光自养亦可异养生长,甚至混养^[15]。自养方式能直接利用阳光、CO₂ 等自然资源,充分利用非农耕土地(如荒漠和盐碱地),其最大不足在于藻细胞密度和生长速度相对较低。添加有机碳源的异养方式可有效提高藻体密度和油脂含量,但添加碳源不仅增加生产成本,同时也增加染菌几率^[24]。混养模式中藻体兼有光合和利用有机物的 2 种代谢方式,可结合反应器光、暗区设计或光暗比调控,通过对不同碳源的分配调控,使形成光下固定 CO₂ 和光能、暗处应用有机碳源和 O₂ 的混合生长模式,最大化促进产油微藻的生物质积累^[2]。从能量收支平衡角度而言,光自养方式是获得能源的最根本途径,未来能源微藻开发也难以完全脱离光自养;而从细胞生长和油脂积累角度考虑,异养培养更有效,可适宜于微藻种子培养。研发兼养或异养与自养的组合技术,将有助于推动能源微藻产业发展。

3.7 培养参数调控

微藻培养中涉及的理化因子很多,有光强、盐度、pH 值,以及氮、磷、铁等营养盐浓度^[6, 7],它们直接影响着微藻的营养代谢。从能源生产角度研究藻细胞生长及油脂积累的关系,可最大程度优化培养效果。这方面目前所做的研究大多停留在宏观方面,随着分子技术的发展,由宏观水平转向分子水平探讨理化因子对藻细胞合成代谢的影响机制将成为研究重点^[1]。理化因子对藻细胞生长及油脂含量的影响分为适宜模式和胁迫模式^[25]。前者通过维持适

适宜的理化条件,促使藻细胞持续生长增殖,以高生物量的获得提高油脂产率;后者通过胁迫作用,促进细胞内脂质持续积累,从提高油脂含量的角度提高油脂产率。营养胁迫对油脂积累的促进作用受到很多关注,尤其在氮限制与油脂含量的研究已发表很多文章^[2, 3, 6, 9, 10, 20, 25, 47-49]。两种模式从不同角度探讨了提高油脂产率,事实上只有适宜模式才能真正提高油脂总产率^[11]。油脂产率与藻细胞总量密切相关,胁迫模式下油脂的积累以牺牲细胞生长为代价,单纯的营养胁迫难以达到理想效果。考虑到2种模式分别对细胞生长和油脂积累显著的作用,先采用光生物反应器以适宜理化条件培养微藻,获得足够生物量,然后再转入胁迫模式促进油脂积累,即二步培养法,可综合发挥二者优势同时弥补各自不足,不失为能源微藻规模开发的理想方案^[10, 15, 47]。

4 微藻采收与油脂提炼

生物柴油生产需要经过藻体分离采收、油脂提取和转化等过程。该阶段需耗费很多能量,有时可占到总成本 50%^[1]。目前藻体分离收集所面临的难题还未很好地解决^[1],尚需获得实质性技术突破,开发出经济而操作便捷的采收与制备工艺技术,降低微藻柴油生产成本,推动微藻柴油产业化发展。

4.1 微藻分离采收

微藻采收分离目前常用的方法有膜过滤、离心及絮凝等^[1, 2, 5, 8, 15]。其中,离心是较常用的分离方法,不会引入其他化学试剂。但操作繁琐,能耗大、成本高、细胞易破碎。膜过滤法存在滤膜易污染问题,可通过采用逆流反冲操作得到一定改善。絮凝也是工业生产上常用的分离方法,通过将微藻细胞絮凝成块后分离,该技术需加入絮凝剂,而后续分离中絮凝剂较难除去,易于造成环境污染。微藻培养液的绝大部分是水,而微藻个体较小(直径一般只有 10 几微米),一般的固液分离方法对微藻的采收分离很难见效^[7]。高效率、低能耗采收装置及培养液循环使用技术的开发将是未来关注的重点^[8, 14, 22]。考虑到生态保护,微藻采收过程中应优先考虑物理采收方法,以化学方法为辅。或将多种技术串联与耦合,整合各自优势实现藻液逐级浓缩,达到有效收获微藻的目的。

4.2 油脂提取与生物柴油制备

微藻油脂主要以甘油三酯或脂肪酸形式分布在

细胞中,微藻油脂提取常用的方法包括机械破碎法、溶剂萃取法、水酶法、超临界CO₂萃取法等^[1, 15]。油脂制备主要有酯交换、热解、热化学液化等方法。其中酯交换法是当前制备生物柴油的常用方法^[1, 10, 15]。藻油的提取方法中机械破碎法最简单,通过高渗透压冲击和超声波辅助^[10, 15]技术都可加速细胞壁破裂和胞内物质释放。但是这些技术能耗大,且需根据不同藻株的具体物理特性选用不同的挤压方式。溶剂萃取法常用的化学溶剂有苯、乙醚,也可用正己烷提取^[10]。水酶法是利用酶分解细胞壁释放藻油的提取方法,在应用中最大的局限是成本较高。超临界二氧化碳兼具液体和气体的特性,能很大程度加快油脂的提取过程,具有较高的采油率,但其设备较昂贵、操作条件要求高,工业化难度大。有人将机械破碎法与化学法联合使用,对微藻油脂进行提取。不论哪种方法,从工艺实施和过程放大角度主要还是从干藻粉中进行溶剂萃取^[15]。而微藻细胞中水含量高达 70%以上,仅干燥过程的能耗就远远超过微藻的产能量。能耗大、溶剂损失代价高是目前微藻油脂提取面临的最大问题。如果能避开干燥和机械压榨直接从湿藻泥中提取油脂,可很大程度降低制油成本^[1]。加大油脂湿法提取技术的探究将是未来加快微藻能源产业化实现的重要策略。

5 微藻资源开发与综合利用

5.1 微藻生物柴油开发与废水综合利用、CO₂减排

微藻在 CO₂ 固定、有毒有害物质和难降解有机物的去除、以及重金属离子吸附等方面具有很多优势。微藻对无机氮磷有着高效吸收机制^[1, 3],用城市生活废水培养富油微藻生产生物柴油,理论上仅添加部分营养元素就有可能获得高密度高油脂含量的微藻生物质,可有效降低微藻培养成本,产生经济效益,同时还可减少生活废水中无机氮磷去除难的问题,有望成为环保型、可持续发展的经济生产模式^[1, 2, 8, 13-15, 50]。如果综合应用微藻培养模式所具备的诸多优势,通过创新设计,将太阳光能吸收,工业废气和废液等资源综合应用到微藻培养的新模式中,使污水资源化再利用、CO₂ 排放与微藻能源规模生产耦合起来,实现资源最大化利用,可大幅降低微藻柴油生产成本、加快微藻能源产业化^[8]。必须指出,目前实现这种理想的培养模式还需大量基础研究,其中包括高抗逆性藻株的获得、微生物污染的防治

等^[2]。新型生物反应器的设计与构建,也需综合考虑微藻的代谢特点及工程材料等实施的可行性,还要实时跟进微藻基因工程和代谢工程上所取得的工作进展,并及时优化培养方案。

5.2 高附加值微藻产品的开发

微藻除含有丰富的油脂外,还富含大量生物活性物质^[4]。研究发现,从提取油脂后的藻渣中能够提取多聚糖、蛋白、色素等高附加值生物产品,可直接或经加工后用于化工、食品、医药和水产饲料等领域。最终残余物质还可发酵生产沼气或作为农业有机肥料^[1, 25, 26]。上述应用可根据藻株的物质含量进行具体选择和优化,最大程度地开发微藻生物质^[25]不仅是对资源综合利用的必然要求,也是缩小微藻生物柴油与石化柴油成本差距的关键。

综上所述,微藻生物柴油作为可再生能源,对缓解能源危机、应对环境污染与全球气候变化具有积极作用。目前在关键技术及发展策略上离产业化开发尚存在很大差距,还需在优质产油藻株筛选与培育、培养优化和规模放大、微藻采收与油脂提取及微藻生物质资源综合利用等方面进行深入探讨,及早建立适宜微藻特性的生产工艺、孕育发展模式,推动微藻生物柴油新产业的兴起。

参考文献:

- [1] Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14: 557-577.
- [2] Pittman J K, Dean A P, Osundeko O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 17-25.
- [3] Scott S A, Davey M P, Dennis J S, et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21: 277-286.
- [4] Singh J, Gu S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14: 2596-2610.
- [5] Chen C Y, Yeh K L, Aisyah R, et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review [J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 71-81.
- [6] Griffiths M J, Harrison S T L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production[J]. Journal of Applied Phycology, 2009, 21: 493-507.
- [7] Li Q, Du W, Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80: 749-756.
- [8] Schenk P M, Thomas-Hall S R, Stephens E, et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production [J]. Bioenergy Research, 2008, 1: 20-43.
- [9] Gouveia L, Oliveira A C. Microalgae as a raw material for biofuels production[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36: 269-274.
- [10] Widjaja A, Chien C C, Ju Y H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2009, 40: 13-20.
- [11] O'Grady J, Morgan J A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2011, 34: 121-125.
- [12] Hossain A B M S, Saleh A A, Aishah S, et al. Bioethanol production from agricultural waste biomass as a renewable bioenergy resource in biomaterials[J]. IFMBE Proceedings, 2008, 21: 300-305.
- [13] Clarens A F, Resurreccion E P, White M A, et al. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44: 1813-1819.
- [14] Johnson M B, Wen Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85: 525-534.
- [15] Singh A, Nigam P S, Murphy J D. Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 26-34.
- [16] Chen W, Zhang C, Song L, et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 77: 41-47.
- [17] Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, et al. A look back at the US Department of Energy's aquatic species

- program-biodiesel from algae. US Department of Energy, Washington, D.C. NREL: NREL/TP-580-24190, 1998.
- [18] Doan T T Y, Sivaloganathan B, Obbard J P. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock[J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35: 2534-2544.
- [19] Lv J M, Cheng L H, Xu X H, et al. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions [J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 6797-6804.
- [20] Khozin-Goldberg I, Cohen Z. Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification [J]. Biochimie, 2011, 93: 91-100.
- [21] Shen Y, Yuan W, Pei Z, et al. Heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* in various nitrogen sources for lipid production [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160: 1674-1684.
- [22] Radakovits R, Jinkerson R E, Darzins A, et al. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production [J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9: 486-501.
- [23] Xiong W, Li X, Xiang J, et al. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78: 29-36.
- [24] Li Y, Horsman M, Wang B, et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81: 629-636.
- [25] Ruangsomboon S. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2 [J]. Bioresource Technology, 2012, 109: 261-265.
- [26] Huerlimann R, de Nys R, Heimann K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 107: 245-257.
- [27] Beer L L, Boyd E S, Peters J W, et al. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production [J]. Current Opinion In Biotechnology, 2009, 20: 264-271.
- [28] 刘倩, 何梅琳, 李凌, 等. 一种能源微藻 ioac689s 的筛选和优化培养[J]. 海洋科学, 2011, 35: 29-35.
- [29] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances [J]. The Plant Journal, 2008, 54: 621-639.
- [30] 丁彦聪, 高群, 刘家尧, 等. 环境因子对小球藻生长的影响及高产油培养条件[J]. 生态学报, 2011, 31: 5307-5315.
- [31] 李元广, 谭天伟, 黄英明. 微藻生物柴油产业化技术中的若干科学问题及其分析[J]. 中国基础科学, 2009, 5: 64-70.
- [32] Praveenkumar R, Shameera K, Mahalakshmi G, et al. Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production[J]. Biomass and Bioenergy, 2012, 37: 60-66.
- [33] Yeh K L, Chang J S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31[J]. Bioresource Technology, 2012, 105: 120-127.
- [34] Li X, Hu H Y, Gan K, Sun Y X. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.[J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 5494-5500.
- [35] 孙珊, 韩笑天, 郑立. 微藻油脂含量和组分及其影响因子的研究[J]. 海洋科学, 2009, 33: 78-83.
- [36] Merzlyak M N, Chivkunova O B, Gorelova O A. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) [J]. Journal of Phycology, 2007, 43: 833-843.
- [37] Liu J G, Zhang C W, Cohen Z, et al. Physiological inhibitory of OCS in arachidonic acid-aich *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) [J]. Chinese J Oceanology Limnology, 2002, 20: 248-255.
- [38] 林学政, 李光友. 环境因子对微藻油脂的影响[J]. 黄渤海海洋, 1999, 17: 54-59.
- [39] Ga T. Lipids membrane function in green algae[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1302: 17-45.
- [40] 张展, 刘建国. 微藻高密度培养中的生长指标和适应

- 机制[J]. 海洋水产, 2003, 24: 36-43.
- [41] 刘志刚, 陆根林, 吉志华. 海产单胞藻液中尖鼻虫和游捕虫的杀灭研究[J]. 湛江水产学院学报, 1990, 10: 36-41.
- [42] 刘锡胤, 梁爱萍, 顾本学, 等. 单胞藻培养中敌害生物的防治[J]. 齐鲁渔业, 2002, 19: 36-37.
- [43] Gaikowski M P, Rach J J, Ramsay R T. Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected lifestages of cold-, cool-, and warmwater fish[J]. Aquaculture, 1999, 178: 191-207.
- [44] Rach J J, Schreier T M, Howe G E, et al. Effect of species, life stage, and water temperature on the toxicity of hydrogen peroxide to fish [J]. Progress Fish-Cult, 1997, 59: 41-46.
- [45] Schreier T M, Rach J J, Howe G E. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs[J]. Aquaculture, 1996, 140: 323-331.
- [46] Moreno-Garrido I, Canavate J P. Assessing chemical compounds for controlling predator ciliates in outdoor mass cultures of the green algae *Dunaliella salina*[J]. Aquac Eng, 2001, 24: 107-114.
- [47] Liang Y, Sarkany N, Cui Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31: 1043-1049.
- [48] Pal D, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, et al. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. [J]. Applied microbiology and biotechnology, 2011, 90: 1429-1441.
- [49] Mandal S, Mallick N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84: 281-291.
- [50] Feng Y, Li C, Zhang D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium[J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 101-105.

(本文编辑: 康亦兼)