

## 高产烃的丛粒藻研究概况\*

王修垣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

呈串状集落生的丛粒藻(*Botryococcus braunii* Kützinger, 1989), 又译葡萄藻, 是一种在温带、热带和大陆性气候带的陆地、淡水和微咸湖水等地广为分布的单细胞绿色微藻(microalgae)<sup>[1,2]</sup>。在培养物中, 其产烃量为生物量干重的 0.3%~76%<sup>[3]</sup>, 通常为 25%~40%<sup>[4]</sup>; 在天然样品中, 最高达 86%<sup>[5]</sup>, 大大高于其它微生物的含烃量(几乎都低于 1%)<sup>[3]</sup>。在国外, 从晚远古代(约 10<sup>9</sup>年前)到近代的沉积岩中<sup>[6]</sup>, 在我国的北部湾沿岸、渤海湾沿岸和茂名油页岩等石油沉积层中, 均发现了它的化石<sup>[7~11]</sup>。也从云南抚仙湖中得到了该藻<sup>[12]</sup>。由于在一些石油沉积中几乎全部有机质都是该藻形成的<sup>[13]</sup>, 故美其名曰“油藻”。

鉴于该藻既有可能提供再生能源和原料, 又有可能是陆相生油的重要油源, 自 1892 年<sup>[14]</sup>至今, 特别是 70 年代石油危机的发生, 陆相生油油源探讨的推动, 而日益引起注意, 在法、澳、比利时、美国和日本等国相继开展了该藻生产可再生资源的研究, 已有 200 余篇文献问世。本文仅对该藻产烃的有关问题作一概述。

### 1 形态和分类

在光学显微镜下, *B. braunii* 的集落(colonies)为大小不一的细胞串, 时而达 1mm, 互相间以透明的折射细丝相连。细胞梨形, 一般为 13 $\mu$ m  $\times$  7 $\mu$ m, 包在基质(matrix)中。老龄细胞的叶绿体中有淀粉粒, 是 Chlorophyceae 的典型特征之一。细胞质内有油质。在透射电子显微镜下可见, 围绕着细胞基部的厚基质结构是由连续的细胞分裂产生的外壁(outer wall)所构成, 借以将藻的集落粘合起来<sup>[6]</sup>。

从世界各地得到的许多丛粒藻株, 在细胞形态上难以区别, 而产生的烃类(油质)却明显不同。据此将藻株分为三个化学种: A、B 和 L。化学种 A 产生直链的奇数 C<sub>23</sub>~C<sub>31</sub> 的 n-二烯烃和三烯烃, 偶尔有较短的 n-链烯烃。文献中常可见到有 Cambridge 株、Göttingen 株和 Austin 株, 均分离自英国 Maddingley Brick Pits。化学种 B 产生丛粒藻烯——分枝的 C<sub>30</sub>~C<sub>37</sub> 三萜烯, 以 Berkeley 株研究较多, 抚仙湖株亦属于此<sup>[12]</sup>。该种比重小, 易浮于水面; 产烃量较高, 多为其干重的 25%~40%<sup>[4,5]</sup>, 可用过滤法收集; 且可耐 NaCl 1.8g/L, 有利于防止杂菌污染<sup>[16]</sup>。化学种 L 产 C<sub>40</sub> 的 Lycopadiene[四萜烯: 2,6(R),10(R),14,19,23(R),27(R),31-octamethyltriacontal4(E),18(E)diene, 元素分析结果: C<sub>40</sub>H<sub>78</sub>], 对 Yamoussoukro 株研究较多。该产物是一类罕见的烃——四类萜, 合成它的藻株的存在从地球化学的观点看是值得注意的。而丛粒藻烷是化学种 B 独有的代谢产物——丛粒藻烯彻底还原的衍生物, 已在茂名油页岩中发现<sup>[11]</sup>。所以, 我国原油中伴随着丛粒藻烷的 lycopane 可能是某些淡水湖沉积中产生 Lycopadiene 的丛粒藻的印迹, 亦即暗示着化学种 B 和 L 可能共存于某些湖中。

关于不同藻株产生不同性质烃类的原因, Brown 认为<sup>[5]</sup>, 是由其生理状态不同所致: A 类烃可能是绿

\* 国家自然科学基金项目的部分内容。

本文于 1997 年 3 月 7 日收到。

色的正常细胞的典型产物, B类烃(丛粒藻烯)可能出于休眠的褐色细胞中。而取自自然界的绿色样品只含 B类烃<sup>[7]</sup>, 在室内培养物中也未发现这两类烃的互变<sup>[20, 21]</sup>, 在生长的后静止期也未发现 B类烃的痕迹。这表明, 不同藻株产生不同烃类应与其生理状态无关, 而可能是藻株本身的特性, 或者存在着丛粒藻的变种。我们的结果<sup>[12]</sup>支持后一观点。

该藻同一化学种的不同藻株的产烃水平差距很大, 化学种 A 竟可达 30 倍之多<sup>[22]</sup>。化学种 L 不同株间 Lycopadiene 的产量波动在其干重的 2%~10%<sup>[17~19]</sup>。这清楚地表明了选择藻株的重要性。

## 2 培养条件

*B. braunii* 的营养需要和培养参数的适宜范围是由 Chu 的开创性研究<sup>[23]</sup>确定的, 改良的 Chu 13 培养基已沿用至今<sup>[5]</sup>。用此培养基气升式培养该藻, 硝酸盐为限制因子<sup>[24]</sup>; 连续增加硝酸盐的起始浓度, 导致该藻指数生长期延长, 直到其它营养物也成为限制因子。在批式培养中, 补加硝酸盐可使最终生物量和产烃量分别增加约 75% 和 60%。磷酸盐浓度较高, 不会引起生物量变化<sup>[21]</sup>, 但该藻的脂类含量却受 P/N 比的影响。磷酸盐含量增加一倍, 产烃量增加约 10%。加入 NaCl 6%, 其脂类总量由对照的 35% 提高到 50%<sup>[24]</sup>。而化学种 B Berkeley 株在 NaCl 1.8% 或海水 1/3 的培养基中生长不受影响, 但增殖速度降低; 在通常的增殖速度下, C<sub>32</sub> 烃类为主, 增殖速度减缓后, C<sub>34</sub> 烃类为主<sup>[16]</sup>。加入 NaF 0.1mg/L, 化学种 A Austin 株的生物量由 0.71mg/L 提高到 0.89 mg/L; NaF 浓度提高到 0.25mg/L, 该藻即受到抑制<sup>[25]</sup>。而另有报道, 该藻株 NaF 的适宜浓度为 0.1~1.0 mg/L<sup>[26]</sup>。

通过光照强度最优化, 可提高化学种 A 的生物量, 其产烃量也提高 1 倍多<sup>[27]</sup>。该藻种 Göttingen 株在 12000 Lux 光照下, 生物量最高可达每天 10.5g/m<sup>2</sup><sup>[28]</sup>。Austin 株的最适生长温度为 25℃; 超过 30℃, 生长迅速下降<sup>[16, 25]</sup>。化学种 B Berkeley 株的生长温度偏高, 在 35℃ 下生物量仍可达到每天 15.2g/m<sup>2</sup>, 稍高于 25℃ 时的 13.3g/m<sup>2</sup>, 但产烃量仍以 25℃ 时最高<sup>[16]</sup>。通入含 CO<sub>2</sub> 0.3% 的空气 (40K Lux) 可将化学种 B 的世代时间缩短, 为不加 CO<sub>2</sub> 的 1/3<sup>[17]</sup>。加入适宜的碳源可将其世代时间缩短到 3d<sup>[29]</sup>。

关于生长条件和生理状态的变化对该藻烃类性质和相对丰度的影响, 实验结果表明, 化学种 A 变化不明显<sup>[30]</sup>, 化学种 B 产生丛粒藻烯的组分却对生长条件很敏感<sup>[15, 31]</sup>。该藻三个化学种在批式培养的指数生长期, 烃的生产比细胞其它组分快。例如, 一株化学种 A 的烃量对生物量的水平由接种物的较低值 16% 提高到 44%<sup>[24]</sup>; 在稳定生长期, 产烃水平降低。它们的最高产烃量均发生在活跃生长期<sup>[15, 19, 21, 29, 30]</sup>。化学种 B 在缺 N 和 P 时无烃积累<sup>[31]</sup>。

## 3 固定化细胞

将 *B. braunii* 化学种 A 直接包埋在海藻胶、聚氨基甲酸乙酯泡沫胶中, 或吸附在现成的泡沫上批式培养<sup>[27, 32~35]</sup>。包埋在海藻胶中受空间障碍影响, 其生长倍增时间由游离细胞的 1.7d 延长为 2.5d, 但产烃量增加约 20%, 光合系统受到保护; 而游离细胞在气升式条件下会发生退化, 叶绿素含量明显降低, 细胞逐渐解体, 在稳定生长期若不移接, 即成为不可逆的<sup>[21]</sup>。用聚氨基甲酸乙酯作包埋剂有毒性; 少数聚合物毒性较小, 但细胞的代谢活性和产烃量均降低。将该藻吸附在现成的小块泡沫上, 生物量和产烃量均与游离细胞的相当。用纱布作固相载体, 在批式光照摇床上或气升式培养, 其 O<sub>2</sub> 释放量、生物量和产烃量依次为 1.84 μmol·min<sup>-1</sup>·L<sup>-1</sup>, 1.44 g/L 和 0.8 g/L, 与游离细胞的相当, 证明它是一种良好的新载体<sup>[36, 37]</sup>。

## 4 协同培养 (associated cultivation)

在自然生境中, 藻类与其它生物共处于复杂的系统中; 大规模培养时, 由于该藻生长缓慢, 难以保持纯培养。因此, 研究 *B. braunii*-细菌体系的相互关系具有重要意义。我们在化学种 A Austin 株中加入不

产烃也不利用烃的 *Bacillus* sp. 109 或 *Coryneb.* sp. 22-1 进行协同培养, 结果表明, 前者有抑制作用, 后者却有促进作用。烃产量由对照的 0.09g / L 提高到 0.39g / L, 烃量占生物量的百分数由 5.6% 提高到 24.2%; 生物量无明显增加<sup>[25]</sup>。此结果与 Chirac 等<sup>[38]</sup>的结果相吻合。看来, 选择适宜的配伍菌株是值得进一步研究提高该藻产烃量的一个有效途径。

## 5 处理污水

泽山茂树等用日本茨城县二次处理的生活污水(STS)培养化学种 *B. Berkely* 株时发现, 既可减少向大气排放的  $\text{CO}_2$ , 降低成本, 又可脱除污水中的 N 和 P。在 3L STS (pH7.35~7.67, 通入  $\text{CO}_2$  1%, 50ml / min, 照度 3000 Lux, 25℃) 的批次培养中, 藻的生长与在改良的 Chu 13 培养基中相当, 烃产量为生物量干重的 40%~53% (Chu 13 中为 58%), 硝酸 N 从 7.67mg / L 或 4.48mg / L 降到 < 0.01mg / L, 亚硝酸盐和磷酸盐也被利用了<sup>[38, 39]</sup>。在装 2L STS 的生物反应器中 (照度 68 $\mu\text{E} / \text{m}^2 / \text{s}$ , pH7.94, 200r / min) 通入  $\text{CO}_2$  1% (500ml / min), 连续培养。每天取出藻悬液 140ml, 另取 1000ml 经 20 $\mu\text{m}$  尼龙布过滤, 再补加 STS 1140ml, 稀释率为 0.57。用己烷和超声波处理从冷冻干燥的细胞中萃取烃类。结果表明, 生物量在一个月中以每周 196mg / L (干重) 的持续率增加, 烃含量为 49%, 与在 Chu 13 中的相当。STS 中的 N 从 5.5mg / L 降到 0.4mg / L, P 从 0.08mg / L 降到 0.03mg / L<sup>[40]</sup>。这些资料表明, 将该藻产烃与处理污水相结合应该受到充分的重视。

## 6 烃的回收

*B. braunii* 的大量烃类 (约 95%) 储藏于细胞基部周围厚的外壁中。这些胞外烃大部分可用轻微地机械处理回收, 细胞可用于再培养<sup>[29]</sup>; 但其产物呈乳状液, 且不适用于固定化细胞培养物。Frenz 等<sup>[41]</sup>从 1500 种溶剂中选择 18 种做试验, 观察到在溶剂的极性和生物的配伍性之间存在着强烈的负相关, 只有九种可与丛粒藻配伍。当用 *n*-己烷与过滤得到的湿细胞接触时, 烃的回收率可达 70%。用萃取过的藻细胞再培养, 其生物量和烃产量与未经萃取的细胞对比, 并未发现有不利的影响; 固定化藻细胞的生物活性亦未受损; 当接触时间短时, 烃的回收率也比用过滤法的高<sup>[42]</sup>。

该藻化学种 A 和 B 的胞外产物的萃取程序见文献 [6], 胞内产物用  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 萃取。Inoue 等用热化学液化法回收化学种 *B. Berkeley* 株在 STS 中产生的丛粒藻烯, 得到了比用己烷-超声波处理法更多的油。此产物包括三种馏分: 5% 低分子量 (MW 197~281) 烃、27.2% 丛粒藻烯 (MW 438~572) 和 22.2% 极性物 (MW 867~2209)。用 5% 碳酸钠催化, 在 200℃、10132.5 kPa 下液化的油中, 丛粒藻烯的最高回收率为 78%, 在 300℃ 下回收率更高<sup>[43]</sup>。得到的油可作为汽油的代用品<sup>[38]</sup>。Mendes 等构建了一套在高压下用超临界  $\text{CO}_2$  液体萃取烃的装置, 效果良好<sup>[46]</sup>。

## 7 结语

Wake 和 Hillen<sup>[7, 44]</sup>根据澳大利亚达尔文河 4000ha, 平均水深 6m 的水库水面上发育了壮观的 *B. braunii* 水华的生物量 15mg / L 计算, 其重量达 1500t, 含油 30%, 每年可产油 35t / ha。若用 100 万公顷水面养殖该藻, 每年可提供 3500 万 t 烃类。还从成本核算上论证了它的适用性。

法国 Largeau 等<sup>[45]</sup>据室内小规模试验计算, 每公顷水体可产烃 60t / a。岩本浩明认为, 如在室外无污染, 得到这种结果是可以应用的<sup>[28]</sup>。而计算微藻光合作用的生产率需按单位面积。若每天增殖生物量 0.3g / L, 在培养瓶中应为 5g /  $\text{m}^2$ ; 生物量中烃含量为 30%, 则每年可得烃 5.5t / ha。他们在室外培养化学种 *B. Berkeley* 株的结果为: 生物量平均每天 10g /  $\text{m}^2$ , 产烃量占干重的 50%, 每年可得烃 18t / ha, 为 Hillen 等计算数值的一半。

据估算, 世界石油的原始储量为 6 万亿~7 万亿桶 (不包括油页岩和油砂)。现在还有已证实的储量 1

万亿桶和未证实的 5000 亿桶。在 2010 年以前,采出成本低于 20 美元 / 桶的廉价油将有一半被消耗。因此,应用不断发展的新技术,持之以恒,研究将该藻产油工业化的途径,无疑仍然是一项诱人的、具有良好前景的课题。

### 参 考 文 献

- [1] Blackburn K B. *Trans Roy Soc Edingburgh*, 1936, 58: 841~861.
- [2] Aaronson S T, Berner K, Gold L et al. *J Plankton Res*, 1983, 5: 693.
- [3] Lynch L M. Hydrocarbons. In: Laskin A L and H A Lechevallier ed. *CRC Handbook of Microbiol*. 2nd Ed. Vol.V. Microbial Products. Boca Raton: CRC Press, 1984. 39~45.
- [4] Wake L V, Hillen L W. *Aust J Mar Freshwater Res*, 1981, 32: 353.
- [5] Brown A C, Knights B A, Conway E. *Phytochem*, 1969, 8: 453.
- [6] Metzger P, Largeau C, Casadevall E. Lipids and macromolecular lipids of the hydrocarbon, rich microalga *Botryococcus braunii*. In: Herz W et al ed. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 57*. Wien: Springer Verlag, 1991. 1~70.
- [7] Wake L V, Hillen W. *Biotechnol Bioeng*, 1980, 22:1637~1656.
- [8] 何承全. 古生物学报, 1981, 20(2): 115~125.
- [9] 周光甲, 李树青, 陈致林, 等. 第三届有机地球化学讨论会论文集. 北京: 石油工业出版社, 1984, 177~190.
- [10] 宋一涛. 石油与天然气地质, 1991, 12(1): 22~33.
- [11] Brassell S C, Eglinton G, Fun Jiamo. *Org Geochem*. 1986, 10: 927.
- [12] 王修垣, 赵 岭, 宋一涛. 微生物学报, 1996, 36: 284~291.
- [13] Largeau C, Casadevall E, Berkaloff C et al. *Phytochem*, 1980, 19: 1043~1051.
- [14] Bertrand C E, Benault B. *Pila bibractensis et le boghead d'Autun B Soc Hist Nat Autun*, 1892, 5: 160.
- [15] Metzger P, Berkaloff C, Casadevall E et al. *Phytochem*, 1985, 24(10): 2305~2312.
- [16] 岩本浩明. 微生物, 1989, 5(6): 58~65.
- [17] Metzger P, Casadevall E. *Tetrahedron Letters*, 1987, 28:3931.
- [18] Poulter C D. *Acc Chem Res*, 1990, 23:70.
- [19] Metzger P, Allard B, Casadevall E et al. *J Phycol*. 1990, 26:258.
- [20] Wolf F R, Cox E R. *J Phycol*. 1981, 17:395.
- [21] Casadevall E, Dif D, Largeau C et al. *Biotechnol Bioeng*, 1985, 27: 286~295.
- [22] Metzger P, Villarreal-Rosales E, Casadevall E et al. *Phytochem*. 1989, 28:2349.
- [23] Chu S P. *J Ecol*. 1942, 30:284~325.
- [24] Dubinsky Z, Berner T, Aaronson S. *Biotechnol Bioeng Symp*, 1978, 8: 61.
- [25] 王修垣, 谢树华. 微生物学通报, 1996, 23(5): 275~277.
- [26] 许常虹, 俞敏娟. 水生生物学报, 1988, 12(1): 90~93.
- [27] Bailliez C, Largeau C, Casadevall E et al. *C R Acad Sci Paris*, 1983, 269(3): 199.
- [28] 岩本浩明. 发酵と工業, 1986, 44(11): 1160~1167.
- [29] Weetall H. *Appl Biochem Biotechnol*, 1985, 11:377.
- [30] Brenckmann F, Largeau C, Casadevall E et al. Influence de la nutrition azotée sur la croissance et la production d'hydrocarbures de l'algue unicellulaire *Botryococcus braunii*. In: Palz W et al ed. *Energy from Biomass*. London: Elsevier, 1985.
- [31] Wolf F R, Nonomura A M, Bassham J A. *Phytochem*, 1985, 21: 388~396.
- [32] Bailliez C, Casadevall E, Largeau C. Effect of immobilization on the hydrocarbon-rich alga *Botryococcus braunii*. In: Strub A et al ed. *Energy from Biomass*. London: Appl Sci Pub., 1983. 286~290.

- [33] Bailliez C, Largeau C, Casadevall E. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985, **23**: 99~105.
- [34] Bailliez C, Largeau C, Berkaloﬀ C *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, **23**: 361~366.
- [35] Bailliez C, Largeau C, Casadevall E *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **29**: 141~147.
- [36] Yang Lianwan, Wang Xiuyuan. *Revue Roumaine de Chimie*, 1989, **34**(1): 397~401.
- [37] 杨廉婉, 王修垣. *微生物学报*, 1989, **29**(6): 427~431.
- [38] 泽山茂树, 横山伸也. *Bioindustry*, 1994, **11**(3): 164~169.
- [39] Sawayama S, Minowa T, Dote Y *et al.* *Appl Microbiol and Biotechnol*, 1992, **38**: 135~138.
- [40] Sawayama S, Inoue S, Yokoyama S. *Appl Microbiol and Biotechnol*, 1994, **41**: 729~731.
- [41] Frenz J, Largeau C, Casadevall E *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1989, **34**: 755.
- [42] Frenz J, Largeau C, Casadevall E. *Enzyme Microb Technol*, 1989, **11**: 717~724.
- [43] Inoue S, Dote Y, Sawayama S *et al.* *Biomass and Bioenergy*, 1994, **6**(4): 269~274.
- [44] Hillen L W, Wake I V. 1st National Conference, Energy Sources—Australia's Needs, Newcastle. 1979, 18~25.
- [45] Largeau L, Casadevall E, Dif D. Renewable hydrocarbon production from the alga *Botryococcus braunii*. In: Palz W *et al* ed. *Energy from Biomass*. London: Appl Sci Publ, 1980. 653.
- [46] Mendes R L, Coelho J P, Fernandes H L *et al.* *J Chem Technol Biotechnol*. 1995, **62**(1): 53~59.

## A REVIEW OF STUDIES ON THE HYDROCARBON—RICH MICROALGA *BOTRYOCOCCUS BRAUNII*

Wang Xiuyuan

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)