

ПРОИЗВОДСТВО БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *CHLORELLA* sp. И *SPIRULINA*

© 2018 г. А. Н. Saeedi Dehaghani¹, *, **, V. Pirouzfars², ***, ****

¹Department of Petroleum Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Young Researchers and Elite Club, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*E-mail: asaeeedi@modares.ac.ir

**E-mail: saidingh@yahoo.com

***E-mail: pirozfar@modares.ac.ir

****E-mail: pirozfar@gmail.com

Поступила в редакцию 10.05.2017 г.

Изучены особенности производства биодизельного топлива (БТ) с использованием двух видов микроводорослей (МВ) – хлореллы (*Chlorella* sp.) и спироулины (*Spirulina platensis*), в частности, процедура экстракции липидов и метод производства биодизеля. Установлено, что быстрый прирост массы хлореллы (с 0.2 до 0.5 г/л) делает эту водоросль более подходящей для культивированного производства биомассы, чем спироулина, прирост биомассы которой составляет 0.1–0.3 г/л. Водоросли заметно отличаются также по содержанию липидов, которое составляет 26.2% для хлореллы и 14.3% для спироулины. Выход БТ при прямой переэтерификации биомассы хлореллы составил 28.2%. Можно утверждать, что этот вид МВ обладает характеристиками, делающими ее наиболее подходящей для производства БТ: быстрый рост и высокая производительность, повышенное содержание липидов, упрощенная культивация в природных условиях, содержание подходящего набора жирных кислот (C14:0, C16:0 и C18:0). Наибольшую степень извлечения удалось добиться методом экстракции биомассы по Блай–Дайеру.

Ключевые слова: липиды, биодизельное топливо, спироулина, хлорелла, переэтерификация.

DOI: 10.1134/S0028242118040044

Биодизельное топливо известно как один из источников энергии, получаемый из возобновляемого биологического материала путем переэтерификации триглицеридов жирных кислот. Для производства БТ в США, Китае и Бразилии применяют рапсовое или пальмовое масло, отработанные масла и трансгенные соевые бобы [1–3]. Однако все эти виды сырья составляют конкуренцию пищевым продуктам – культивация растений, из которых производится масло, требует значительных площадей сельскохозяйственных земель. Несмотря на положительные эффекты коммерциализации производства масел, стоимость исходного масляного сырья ограничивает производство БТ [4–8], поскольку в конечной стоимости топлива затраты на растительные масла, пригодные для производства биодизеля, составляют 70–85% [9, 10].

Таким образом, в последнее время снижение стоимости производства БТ является одной из наиболее актуальных задач биотехнологии и синтеза биотоплив [11]. При производстве БТ на основе жиров и масел МВ часто рассматривают как альтернативу животному и растительному сырию.

Действительно, БТ, производимое на основе водорослей, не будет вступать в конкуренцию с производством пищевых продуктов и получением другой сельскохозяйственной продукции [12]. Кроме того, использование микроводорослей вместо пищевых культур позволяет увеличить эффективность производства: выход БТ из микроводорослей составляет 12000 л/ч по сравнению с 1190 л/ч, например, из рапсового масла [13].

Микроводоросли имеют короткий жизненный цикл, основанный на процессе фотосинтеза [14]. С точки зрения процесса фотосинтеза, они более эффективно, чем наземные растения, связывают углекислый газ [15], что может способствовать снижению выбросов парниковых газов. МВ по существу являются миниатюрными биотехнологическими и химическими заводами. Многие МВ особенно богаты маслами (более 80 мас. % на сухую биомассу) и могут использоваться для производства биотоплива, в частности, биодизеля [16, 17]. На этапе экспоненциального развития время удвоения биомассы для микроводорослей составляет 3.5 ч. МВ растут быстрее в морской воде, выход масла оценивается в диапазоне 4000–18000 м³, что

в 6–30 раз выше, чем из наземных растений [18]. Земельные ресурсы ограничены, в то время как МВ за счет быстрого роста способны удовлетворить большой спрос на производство биотоплива. Культивирование микроводорослей требует меньших затрат воды, чем земледелие [19, 20]. Большая часть биомассы МВ содержит три основных компонента — белки, жиры и углеводы [21]. МВ производят и накапливают жиры в виде гликолипидов, фосфолипидов и жирных кислот, которые могут быть использованы в производстве биодизельного топлива путем их переэтерификации в присутствии кислот [22, 23].

В настоящей работе рассмотрен рост микроводоросли хлорелла (*Chlorella* sp.), содержание в ней масел, скорость флокуляции. В связи со сложностью процессов производства БТ из двух видов микроводорослей (хлореллы *Chlorella* sp. и спирулины *Spirulina platensis*), основной задачей являлось исследование влияния температуры высушивания на извлечение масел. Для этого были выбраны метод Блай–Дайера, экстракция липидов по методу Фолча и получение производных от продуктов экстракции для последующего анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. Процесс производства БТ состоял из трех процессов: культивирование микроводорослей, экстракция липидов и реакция переэтерификации. Реактивы, используемые при культивировании микроводорослей: KNO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , NaCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, FeCl_2 , $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Также использовали хлороформ и метанол (99%) производства Merck (Германия), необходимые для экстракции липидов из микроводорослей [24–27].

Лабораторное оборудование включало в себя небольшой воздушный насос для подпитки кислородом культуры водорослей, а также системы сублимационной сушки, центрифуги, роторные испарители и др. [28].

Для экстракции липидов из биомассы микроводорослей использовали два известных метода — метод Фолча [29] и метод Блай–Дайера [30].

Метод Блай–Дайера. При жидкостной экстракции используют хлорную кислоту. Экстракцию липидов проводят следующим образом [30–32]: 1) к смеси 15 мл хлороформа и метанола в соотношении 2 : 1 и 4 мл воды добавляют 1 г биомассы и тщательно перемешивают; к полученной смеси добавляют 5 мл хлороформа и снова интенсивно перемешивают; затем добавляют 5 мл водного раствора хлорной кислоты (HClO_4) и вновь интенсивно перемешивают. Объемное отношение хлороформ : метанол : вода на этой стадии должно

составлять 0.9 : 1 : 1. Для разделения фаз полученную смесь аккуратно центрифугируют при скорости вращения 3000 об/мин. Органический слой (нижний), содержащий липиды, подвергают экстракции хлороформом. Экструдат переносят в новую емкость, растворители удаляют на роторном испарителе при температуре не выше 60°C или отгонкой в потоке азота на горячей водяной бане.

Метод Фолча. В процессе жидкостной экстракции используют хлорид натрия. По этому методу экстракцию липидов проводят следующим образом [29, 33, 34]: перед тем как добавить 1 г биомассы, смесь хлороформа и метанола в объемном отношении 1 : 2 интенсивно перемешивают 20 мин. Объем смеси растворителей должен быть в 20 раз больше, чем объем образца (например, 20 мл смеси на 1 мл биомассы). По окончании перемешивания смесь фильтруют через бумажный фильтр для удаления твердых частиц; к полученному раствору добавляют 5 мл 9.0%-ного водного раствора хлорида натрия, после чего 3 мин интенсивно перемешивают. Для разделения фаз полученную смесь аккуратно центрифугируют при скорости 2000 об/мин. Органический слой (нижний), содержащий липиды, подвергают экстракции хлороформом. Экструдат переносят в новую емкость, а растворители удаляют на роторном испарителе при температуре не выше 60°C или испаряют в потоке азота на горячей водяной бане.

Температура высушивания биомассы оказывает значительное влияние на экстракцию липидов. Влажную биомассу высушивали путем дегидратации при отрицательных температурах, методом сублимационной сушки и сушки в сушильном шкафу при 60, 80 и 100°C, после чего проводили экстракцию липидов различными методами, оценивая влияние температуры сушки в печи на процесс экстракции липидов [35–37].

Продукты экстракции переводили в метиловые эфиры, которые подвергали анализу. Этот метод детально описан в литературе [38].

Получение БТ методом переэтерификации включает несколько стадий: 1) к 3 г биомассы после сублимационной сушки добавляют смесь метанола (12 мл) и серной кислоты (1 мл); 2) затем к полученной смеси добавляют 15 мл хлороформа в качестве дополнительного растворителя для экстракции липидов; 3) смесь нагревают до 80°C и выдерживают при этих условиях 1 ч при перемешивании; 4) после окончания реакции смесь охлаждают до комнатной температуры, добавляют 5 мл дистиллированной воды и интенсивно перемешивают 3 мин; 4) полученную смесь разделяют на фазы в конической воронке. Органический слой, содержащий БТ (метиловые эфиры жирных кислот), переносят в отдельный сосуд, а

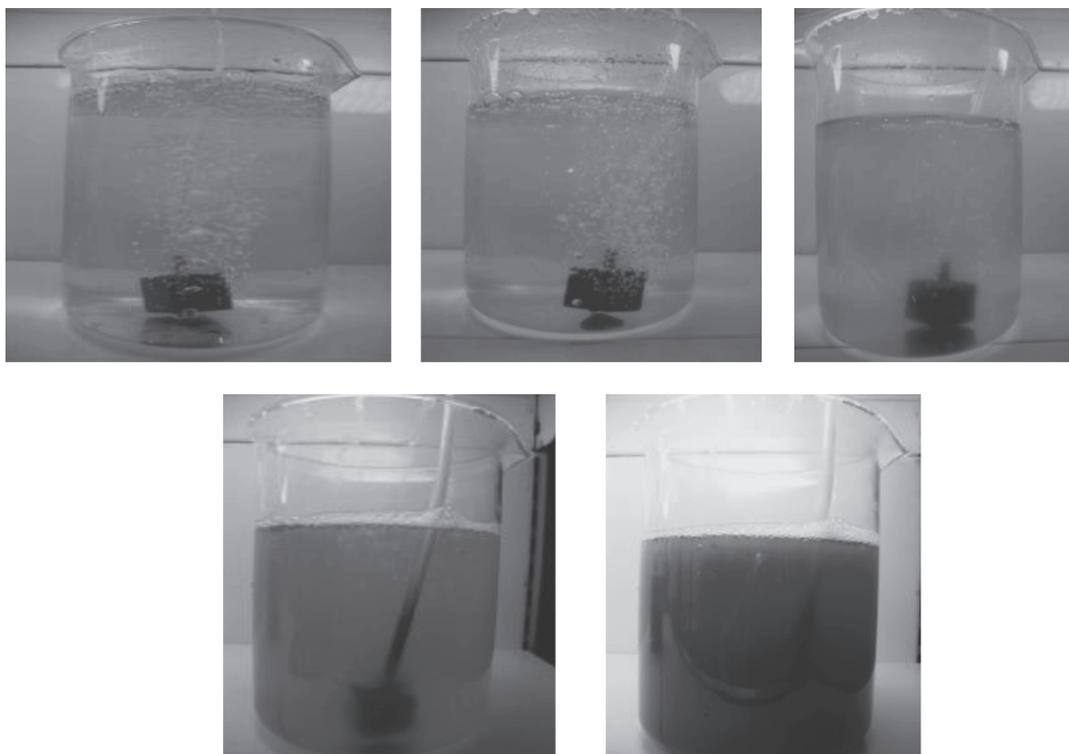


Рис. 1. Накопление массы микроводоросли хлореллы за дни: 1 – 1, 2 – 2, 3 – 3, 4 – 4, 5 – 5.

растворитель отделяют перегонкой в токе азота на горячей водяной бане.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение продуктивности двух видов водорослей. Рис. 1 демонстрирует накопление массы микроводоросли хлореллы в течение 5 дней в заданных условиях.

Как следует из данных, приведенных на рис. 2, рост водоросли заканчивается через 6 дней и, и ее можно отделять от питательной среды. Если (МВ)

микроводоросль после этого не изолировать, то размножение может остановиться и начнется гибель живых культур (рис. 1). Рис. 2 демонстрирует результат выращивания 1 мл исходной микроводоросли хлореллы в 1 л питательной среды

По сравнению с хлореллой, микроводоросль спирулина имеет меньшую скорость роста и клеточную плотность при большем размере клеток (около 40 мкм против размера клеток спирулины 4 мкм). Установлено, что продуктивность биомассы микроводоросли составляет 0.2–0.5 г и средний вес сухой массы хлореллы и спирулины в



Рис. 2. Культура микроводоросли хлореллы через 6 дней культивации.

Таблица 1. Состав жирных кислот, извлеченных из микроводоросли спирулины

Жирная кислота	Молекулярная формула	Структура	Относительное содержание, %
Миристиновая	$C_{14}H_{28}O_2$	C14:0	–
Пальмитиновая	$C_{16}H_{32}O_2$	C16:0	59.3
Пальмитолеиновая	$C_{16}H_{30}O_2$	C16:1	2.9
Стеариновая	$C_{18}H_{36}O_2$	C18:0	4.5
Олеиновая кислота	$C_{18}H_{34}O_2$	C18:1	6.7
Линолевая	$C_{18}H_{32}O_2$	C18:2	11.3
Линоленовая	$C_{18}H_{30}O_2$	C18:3	9.8
Выход, %			
насыщенных жирных кислот			63.8
ненасыщенных жирных кислот			33.9
масел (на сухой остаток)			11.2
Эффективность по МЭЖК*, %:			14.3

Таблица 2. Состав жирных кислот, извлеченных из микроводоросли хлореллы

Жирная кислота	Молекулярная формула	Структура	Относительное содержание
Миристиновая	$C_{14}H_{28}O_2$	C14:0	27.8
Пальмитиновая	$C_{16}H_{32}O_2$	C16:0	11.5
Пальмитолеиновая	$C_{16}H_{30}O_2$	C16:1	35.1
Стеариновая	$C_{18}H_{36}O_2$	C18:0	1.5
Олеиновая	$C_{18}H_{34}O_2$	C18:1	4.9
Линолевая	$C_{18}H_{32}O_2$	C18:2	13.3
Линоленовая	$C_{18}H_{30}O_2$	C18:3	3.8
Выход, %			
насыщенных жирных кислот			40.8
ненасыщенных жирных кислот			57.1
масел (на сухой остаток)			26.2
Эффективность по МЭЖК, %			22.7

Таблица 3. Состав жирных кислот, извлеченных из микроводоросли *Chlorella* sp. при использовании различных методов экстракции

Жирная кислота	Содержание кислоты при использовании метода, %		
	Блай–Дайер	Фолч	жидкостная экстракция
C14:0	26.6	27.3	28.5
C16:0	11.7	10.9	14.2
C16:1	36.4	33.8	32.1
C18:0	1.3	1.9	1.7
C18:1	5.2	4.9	6.5
C18:2	12.9	13.1	–
C18:3	3.3	3.6	–
Содержание масел, %	24.60	23.80	14.40
Эффективность по МЭЖК, %	20.90	20.60	10.10

Таблица 4. Состав жирных кислот, извлеченных из микроводоросли хлорелла, при различных температурах сушки

Жирная кислота	Содержание кислоты при разных режимах сушки, %			
	температура сушки, °С			сублимационная сушка
	60	80	100	
C14:0	26.6	38.4	35.8	27.8
C16:0	11.7	21.1	19.3	11.5
C16:1	36.4	27.5	25.4	35.1
C18:0	1.3	0.9	0.5	1.5
C18:1	5.2	3.5	2.9	4.9
C18:2	12.9	2.1	—	13.3
C18:3	3.3	—	—	3.8
Содержание масел, %	24.60	18.60	17.40	26.20
Эффективность по МЭЖК, %	20.90	13.90	13.10	22.70

конце культивирования на каждый литр культуры составлял 0.1 и 0.3 г, соответственно.

Выход жирных кислот и липидов. Был изучен состав жирных кислот липидов двух видов МВ. Масла, извлеченные из этих образцов, были исследованы методом хромато-масс-спектрометрии после выделения по методу Блай–Дайера и получения метиловых производных.

Получение биодизельного топлива из масел спирулины. В табл. 1 и 2 приведен итоговый состав насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, общее содержание масла на сухой остаток, выход метиловых эфиров жирных кислот для спирулины и хлореллы.

На примере микроводоросли хлорелла (*Chlorella* sp.) было проведено сравнение эффективно-

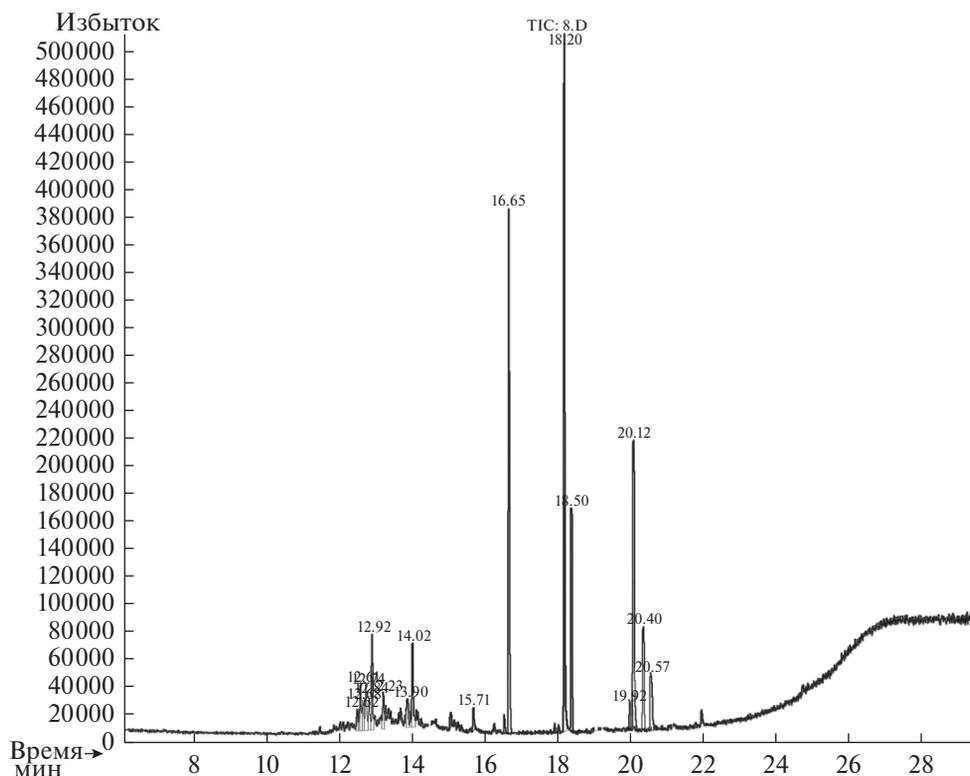
**Рис. 3.** Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот (биодизеля), полученных из микроводоросли хлореллы.

Таблица 5. Состав метиловых эфиров жирных кислот биодизельного топлива, полученного из микроводоросли хлореллы

Эфир жирной кислоты	Молекулярная масса	Молекулярная формула	Относительное содержание, %
Метил тетрадеcanoат	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	29.2
Метил гексадеcanoат	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	10.1
Метил-9-гексадеcanoат	268	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	37.2
Метил октадеcanoат	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	1.1
Метил-12-октадеcanoат	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	4.5
Метил-9,12-октадеcanoат	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	13.8
Выход биодизельного топлива (от массы сухого остатка), %			28.2

сти двух традиционных методов (Блай–Дайера и Фолча) экстракции липидов и рассмотрено влияние температуры сушки на извлечение этих соединений из микроводорослей. В табл. 3 приведен состав жирных кислот, содержание масел на сухой остаток и эффективность жидкостной экстракции МЭЖК для разных процедур экстракции. Полученные данные позволяют сделать вывод, что выбранные методы позволяют эффективно экстрагировать масла из микроводорослей. Метод Блай–Дайера более эффективен при извлечении жирных кислот, чем метод Фолча.

В табл. 4 показано влияние разных режимов сушки на содержание масел и состав жирных кислот, полученных из микроводоросли хлореллы. Установлено, что повышение температуры сушки в сушильном шкафу снижает общее содержание масел и оказывает влияние на соотношение жирных кислот. Использование сублимационной сушки позволяет получать показатели, близкие к сушке при 60°C.

Получение биодизельного топлива из масел хлореллы *Chlorella* sp. На рис. 3 показана хроматограмма продуктов переэтерификации масел, полученных в процессе переработки микроводоросли хлореллы (*Chlorella* sp.), – метиловых эфиров жирных кислот (биодизеля).

В табл. 5 показан состав метиловых эфиров жирных кислот БТ, полученного из микроводоросли хлореллы, а также выход БТ, который представляет собой отношение общей массы метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) к общей массе сухого остатка биомассы.

На основании полученных данных можно утверждать, что микроводоросль хлорелла обладает наилучшими характеристиками для использования в производстве БТ: быстрым ростом и высокой продуктивностью биомассы при подходящем содержании липидов; легкостью культивирования в условиях окружающей среды; подходящим профилем кислотного состава.

Жирные кислоты C14:0, C16:0 и C18:0 представляют собой наиболее часто встречающиеся кислоты в составе БТ. Наилучшие результаты их экстракции могут быть получены при использовании метода Блай–Дайера с последующей сублимационной сушкой.

Прямой метод переэтерификации позволяет достичь большей эффективности, чем двухступенчатая экстракция и переэтерификация.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mehri B., Pirouzfard V., Bagheri S., Pedram M.Z. // Can. J. Chem. Eng. 2017, V. 95. № 6. P. 1054.
2. Singh R.K., Kukrety A., Sharma O.P., Poddar M.K. At-ray N., and Ray S.S. // Pet. Chem. 2017. V. 57. P. 100.
3. Kanateva A.Y., Kurganov A.A., Yakubenko E.E. // Pet. Chem. 2014. V. 54. P. 459.
4. Berenblyum A.S., Danyushevsky V.Y., Katsman E.A., Podoplelova T.A., Flid V.R. // Petrol. Chemistry. 2010. V. 50. P. 305.
5. Jerman M.S., Stefanovič S.C., Moder M., Gregorc A. // Petrol. Chemistry. 2009. V. 49. P. 147.
6. Fayyazbakhsh A., Pirouzfard V. // Fuel. 2016. V. 171. P. 167.
7. Fayyazbakhsh A., Pirouzfard V. // Renew. Sust. Energ. Rev. 2017. V. 74. P. 891.
8. Sanchez F., Vasudevan P.T. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2006. V. 135. P. 1.
9. Dincer K. // Energ. Source. 2016. V. 30. № 10. P. 963.
10. Demirbas A. // Energ. Source. 2009. V. 31. № 11. P. 889.
11. Miao X., Wu Q. // Bioresource Technol. 2006. V. 97. P. 841.
12. Fulton L. International Energy Agency (IEA), 2004, 105-12. IEA, France.
13. Krawczyk T. // JEAS. 1996. V. 7. P. 801.
14. Schenk P., Thomas-Hall S., Stevens E., Marx U., Mussgnug J., Posten C., Kruse O., Hankamer B. // Bioenerg. Res. 2008. V. 1. P. 20.
15. Chen C.H., Chen W.H., Chang C.M.J., Lai S.M., Tu C.H. // J. Supercrit. Fluids. 2010. V. 52. P. 228.
16. Pirt S.J. // New Phytol. 1986. V. 102. № 1. P. 3.

17. *Banerjee A., Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C.* // Crit. Rev. Biotechnol. 2002. V. 22. P. 245.
18. *Chisti Y.* // Biotechnology Adv. 2007. V. 25. № 3. P. 294.
19. *Pringsheim E.G.* In: Culturing of algae, Eds. *Brunel J., Prescott G.W., Tiffany L.H.* The Charles F. Kettering Foundation, New York. 1950. P. 19.
20. *Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P.A.* Biodiesel from Algae (National Renewable Energy Lab., Golden, CO, USA. 1998).
21. *Sharp C.A.* Emissions and lubricity evaluation of rapeseed derived biodiesel fuels (Southwest Research Institute, Final Report for Montana, USA. 1996).
22. *Cadenas A., Cabezudo S.* // Technol. Forecast. Soc. 1998. V. 58. № 1–2. P. 83.
23. *Campbell M.N.* // Guelph. Eng. J. 2008. V. 1. P. 2.
24. *Vyas A.P., Verma J.L.* // Fuel. 2010. V. 89. № 1. P. 1.
25. *Brennan L., Owende P.* // Sust. Energ. Review. 2010. V. 14. № 2. P. 557.
26. *Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S.* // Renew. Sust. Energ. Rev. 2010. V. 14. № 1. P. 217.
27. *Richmond A.* Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology (Wiley, Blackwell, USA. 2004).
28. *Braun G.Z., Braun B.Z.* Algal Physiology and Biochemistry (Illinois, USA. 1974. P. 346).
29. *Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H.* // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497.
30. *Bligh E.G., Dyer W.J.* // Can. J. Biochem. Phys. 1959. V. 37. № 8. P. 911.
31. *Molina Grima E., Fernandez F., Garcia Camacho F., Chisti Y.* // J. Biotechnol. 1999. V. 70. № 1–3. P. 231.
32. *Pulz O.* Evaluation of GreenFuel's 3D Matrix Algae Growth Engineering Scale Unit (APS Red Hawk Unit AZ. Performance Summary Report. 2007. P. 1–14.).
33. *Schneider D.* // American Sci. 2006. V. 94. P. 408.
34. *Bryner M., Scott A.* // Chem. Week. 2006. V. 168. P. 17.
35. *Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C.Q., Dubois-Calero N.* // Biotechnol. Progress. 2008. V. 24. № 4. P. 815.
36. *Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A.* // J. Biosci. Bioeng. 2006. V. 101. № 2. P. 87.
37. *Weissman J.* Screening for Lipid Yielding Microalgae (Final subcontract report, USA. 1984).
38. *Boateng A.A., Mullen C.A., Goldberg N., Hicks K.B., Jung H.J.G., Lamb J.A.F.S.* // Ind. Eng. Chem. Res. 2008. V. 47. № 12. P. 4115.