



(21) 申请号 202410634225.6

CN 102021208 A, 2011.04.20

(22) 申请日 2024.05.22

审查员 陈阜

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 118240887 A

(43) 申请公布日 2024.06.25

(73) 专利权人 黑龙江大学

地址 150080 黑龙江省哈尔滨市南岗区学
府路74号

(72) 发明人 林宜萌 平文祥 葛菁萍 凌宏志

王美琦 徐静

(51) Int. Cl.

C12P 7/6427 (2022.01)

C12R 1/89 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 116396988 A, 2023.07.07

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种利用含铵离子溶液产油脂的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用含铵离子溶液产油脂的方法,属于微生物发酵技术领域。本发明的目的是为了促进含铵离子溶液的资源化利用,挖掘产含 α -亚麻酸油脂的微生物。具体方法:调整含铵离子溶液pH并灭菌;接种微芒藻 *Micractinium* sp.HDL02发酵;发酵液经离心、干燥、研磨与有机溶剂抽提即得到含有 α -亚麻酸的粗油。本发明获得的油脂产量达到309~534 mg/L,其中 α -亚麻酸达到170~292 mg/L,显著高于常规培养基的产量。

1. 一种利用含铵离子溶液产油脂的方法,其特征在于微芒藻属微生物利用含铵离子溶液产含 α -亚麻酸油脂的方法,所述含铵离子溶液的铵离子浓度为10~80 mM,所述铵离子由氯化铵、硝酸铵或碳酸铵提供,包括以下步骤:

步骤一、调整含铵离子溶液pH为6.5~8.5,121°C灭菌15 min,将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至含铵离子溶液中发酵6~8 d,得到发酵液;

步骤二、将步骤一得到的发酵液离心获得微芒藻藻泥,将藻泥干燥、研磨、有机溶剂抽提即得到含有 α -亚麻酸的粗油。

2. 根据权利要求1所述的利用含铵离子溶液产油脂的方法,其特征在于,所述步骤一中的含铵离子溶液,还包括以下组分:重量份数比0.02~0.06份硫酸镁、0.02~0.08份氯化钙、0.04~0.1份硫酸铁、0.1~0.3份磷酸氢二钠、0.5~1份微量元素溶液和800~900份水。

3. 根据权利要求1所述的利用含铵离子溶液产油脂的方法,其特征在于步骤一中微芒藻的接种量为0.1~0.3 g/L。

4. 根据权利要求1所述的利用含铵离子溶液产油脂的方法,其特征在于步骤一中微芒藻的发酵条件为光照强度3000 lux,光照周期12h光/12h暗,温度23~28°C,摇床转速120rpm。

一种利用含铵离子溶液产油脂的方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物发酵技术领域,具体涉及一种微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法。

背景技术

[0002] α -亚麻酸是一种含有三个顺式双键的不饱和脂肪酸,与机体免疫力调节、内源神经修复相关。 α -亚麻酸是一种必需脂肪酸,不能通过人体内代谢过程产生,需要通过饮食获得。一些微藻类在生长过程中产生含 α -亚麻酸的油脂,可用来提升人类食品或动物饲料中的营养水平,但微藻培养成本较高,限制了利用微藻生产含 α -亚麻酸油脂的应用。利用废水培养微藻,可大大降低微藻培养过程中的水源和氮源成本。但含有高浓度铵的废水对微藻光合系统有毒性,通常需要将铵浓度稀释到2 mM以下才能用来培养微藻。因此有必要挖掘含较高浓度铵离子溶液的使用场景,以回收其中氮元素,促进含铵废水的资源化应用。本发明针对含铵废水的利用问题,提供一种微芒藻利用含铵离子溶液产含 α -亚麻酸油脂的方法。目前尚无微芒藻属微生物利用含较高浓度铵离子溶液产含 α -亚麻酸油脂的报道。

[0003] 本发明中,微芒藻HDL02的拉丁名为*Micractinium* sp. HDL02,保藏于黑龙江大学微生物重点实验室,本发明中微芒藻HDL02的来源为:大庆地区微藻多样性分析及藻种资源挖掘 [D]. 黑龙江大学, 2016。

发明内容

[0004] 为了促进含铵离子溶液的资源化利用,挖掘产含 α -亚麻酸油脂的微生物。本发明提供一种微芒藻利用含铵离子溶液产含 α -亚麻酸油脂的方法。

[0005] 本发明的微芒藻利用含铵离子溶液产含 α -亚麻酸油脂的方法,按照以下步骤进行:

[0006] 步骤一、将由氯化铵、硝酸铵或碳酸铵提供铵离子的、铵离子浓度为10~80 mM的含铵离子溶液pH调整为6.5~8.5,121°C灭菌15 min,按照接种量0.1~0.3 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h / 12h(光/暗)、温度23~28°C、摇床转速120rpm的条件下发酵6~8 d,得到发酵液。

[0007] 步骤二、将步骤一得到的发酵液离心获得微芒藻藻泥,将藻泥干燥后研磨,以有机溶剂抽提即得到含有 α -亚麻酸的粗油。

[0008] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.02~0.06份硫酸镁、0.02~0.08份氯化钙、0.04~0.1份硫酸铁、0.1~0.3份磷酸氢二钠、0.5~1份微量元素溶液、8~15份葡萄糖和800~900份水。

[0009] 有益效果:

[0010] 1. 本发明中的微芒藻属(*Micractinium* sp.)藻株HDL02可通过光能自养和化能异养两种方式生长。可在利用CO₂进行光合作用的同时,利用含铵离子溶液中的氮、磷等营养元素。利用本发明的方法,微藻在合成高附加值产物的同时可实现含铵离子溶液中氮元

素的高效利用。

[0011] 2. 本发明提供的方法操作简单,所用试剂价格低廉。本发明中微芒藻属(*Micractinium* sp.)藻株HDL02在含铵离子溶液中培养时,油脂产量为309~534 mg/L,其中 α -亚麻酸产量达到170~292 mg/L,显著高于常规培养基的产量。

[0012] 3. 本发明所用微芒藻为绿藻类,可直接以藻粉形式加入食品或饲料,也可富集 α -亚麻酸后作为必需脂肪酸成分添加至营养补充剂或膳食中。本发明的制备方法对必需脂肪酸相关的食品及饲料生产具有积极促进作用。

具体实施方式

[0013] 下面将结合实施例对本发明的实施方式进行说明。需要理解的是以下实施例只是起到说明的目的,并非对本发明的范围进行限制。

[0014] 下述实施例中所使用的试剂、材料,若无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0015] 下述实施例中所使用的实验方法,若无特殊说明,均为常规实验方法。

[0016] 实施例1:

[0017] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0018] 步骤一、将由氯化铵提供铵离子的、铵离子浓度为20 mM的含铵离子溶液pH调整为7.0,121°C灭菌15 min,按照接种量0.1 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度24°C、摇床转速120rpm的条件下发酵7 d,得到发酵液。

[0019] 步骤二、将步骤一得到的发酵液离心获得微芒藻藻泥,将藻泥干燥后研磨,以氯仿/甲醇(v:v=2:1)抽提三次,静置后取下层有机相,用氮吹仪干燥有机溶剂即得到含有 α -亚麻酸的粗油。

[0020] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.02份硫酸镁、0.05份氯化钙、0.04份硫酸铁、0.1份磷酸氢二钠、1份微量元素溶液、9份葡萄糖和800份水。

[0021] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂334 mg,其中 α -亚麻酸208 mg。

[0022] 实施例2:

[0023] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0024] 步骤一、将由氯化铵提供铵离子的、铵离子浓度为50 mM的含铵离子溶液pH调整为7.5,121°C灭菌15 min,按照接种量0.2 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度25°C、摇床转速120rpm的条件下发酵8 d,得到发酵液。

[0025] 步骤二与实施例1相同。

[0026] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.06份硫酸镁、0.08份氯化钙、0.1份硫酸铁、0.3份磷酸氢二钠、0.5份微量元素溶液、13份葡萄糖和800份水。

[0027] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂534 mg,其中 α -亚麻酸292 mg。

[0028] 实施例3:

[0029] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0030] 步骤一、将由硝酸铵提供铵离子的、铵离子浓度为50 mM的含铵离子溶液pH调整为6.8,121°C灭菌15 min,按照接种量0.3 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述

灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度27°C、摇床转速120rpm的条件下发酵6 d,得到发酵液。

[0031] 步骤二与实施例1相同。

[0032] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.05份硫酸镁、0.02份氯化钙、0.08份硫酸铁、0.2份磷酸氢二钠、0.8份微量元素溶液、15份葡萄糖和900份水。

[0033] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂404 mg,其中 α -亚麻酸241 mg。

[0034] 实施例4:

[0035] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0036] 步骤一、将由硝酸铵提供铵离子的、铵离子浓度为80 mM的含铵离子溶液pH调整为7.0,121°C灭菌15 min,按照接种量0.2 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度25°C、摇床转速120rpm的条件下发酵8 d,得到发酵液。

[0037] 步骤二与实施例1相同。

[0038] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.06份硫酸镁、0.05份氯化钙、0.08份硫酸铁、0.1份磷酸氢二钠、0.5份微量元素溶液、10份葡萄糖和800份水。

[0039] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂360 mg,其中 α -亚麻酸187 mg。

[0040] 实施例5:

[0041] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0042] 步骤一、将由氯化铵提供铵离子的、铵离子浓度为10 mM的含铵离子溶液pH调整为8.5,121°C灭菌15 min,按照接种量0.3 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度28°C、摇床转速120rpm的条件下发酵6 d,得到发酵液。

[0043] 步骤二与实施例1相同。

[0044] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.02份硫酸镁、0.05份氯化钙、0.05份硫酸铁、0.1份磷酸氢二钠、0.5份微量元素溶液、8份葡萄糖和900份水。

[0045] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂309 mg,其中 α -亚麻酸170 mg。

[0046] 实施例6:

[0047] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0048] 步骤一、将由硝酸铵提供铵离子的、铵离子浓度为60 mM的含铵离子溶液pH调整为6.5,121°C灭菌15 min,按照接种量0.2 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度23°C、摇床转速120rpm的条件下发酵7 d,得到发酵液。

[0049] 步骤二与实施例1相同。

[0050] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.02份硫酸镁、0.05份氯化钙、0.08份硫酸铁、0.3份磷酸氢二钠、1份微量元素溶液、10份葡萄糖和900份水。

[0051] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂398 mg,其中 α -亚麻酸230 mg。

[0052] 由实施例1~实施例6可知,本发明微芒藻*Micractinium* sp. HDL02利用含铵离子溶液发酵,可产含 α -亚麻酸的油脂,且油脂产量、 α -亚麻酸含量较高。每升含铵离子溶液可获得油脂309~534 mg,其中 α -亚麻酸170~292 mg。

[0053] 实施例7:

[0054] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0055] 步骤一、将由硝酸铵提供铵离子的、铵离子浓度为60 mM的含铵离子溶液pH调整为7.0,121°C灭菌15 min,按照接种量0.3 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度25°C、摇床转速120rpm的条件下发酵8d,得到发酵液。

[0056] 步骤二与实施例1相同。

[0057] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.05份硫酸镁、0.05份氯化钙、0.08份硫酸铁、0.3份磷酸氢二钠、1份微量元素溶液、8份葡萄糖和850份水。

[0058] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂498 mg,其中 α -亚麻酸282 mg。

[0059] 实施例8:

[0060] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0061] 步骤一、将由碳酸铵提供铵离子的、铵离子浓度为60 mM的含铵离子溶液pH调整为8,121°C灭菌15 min,按照接种量0.2 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度26°C、摇床转速120rpm的条件下发酵7d,得到发酵液。

[0062] 步骤二与实施例1相同。

[0063] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.05份硫酸镁、0.05份氯化钙、0.08份硫酸铁、0.2份磷酸氢二钠、0.8份微量元素溶液、12份葡萄糖和800份水。

[0064] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂461 mg,其中 α -亚麻酸232 mg。

[0065] 实施例9:

[0066] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0067] 步骤一、将由氯化铵提供铵离子的、铵离子浓度为30 mM的含铵离子溶液pH调整为7,121°C灭菌15 min,按照接种量0.3 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度25°C、摇床转速120rpm的条件下发酵7d,得到发酵液。

[0068] 步骤二与实施例1相同。

[0069] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.05份硫酸镁、0.05份氯化钙、0.08份硫酸铁、0.1份磷酸氢二钠、1份微量元素溶液、15份葡萄糖和800份水。

[0070] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂386 mg,其中 α -亚麻酸228 mg。

[0071] 实施例10:

[0072] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0073] 步骤一、将由硝酸铵提供铵离子的、铵离子浓度为30 mM的含铵离子溶液pH调整为6.8,121°C灭菌15 min,按照接种量0.2 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度25°C、摇床转速120rpm的条件下发酵8d,得到发酵液。

[0074] 步骤二与实施例1相同。

[0075] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.05份硫酸镁、0.05份氯化钙、0.08份硫酸铁、0.1份磷酸氢二钠、1份微量元素溶液、10份葡萄糖和800份水。

[0076] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂357 mg,其中 α -亚麻酸194 mg。

[0077] 实施例11:

[0078] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0079] 步骤一、将由氯化铵提供铵离子的、铵离子浓度为70 mM的含铵离子溶液pH调整为7.0,121°C灭菌15 min,按照接种量0.2 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度25°C、摇床转速120rpm的条件下发酵7d,得到发酵液。

[0080] 步骤二与实施例1相同。

[0081] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.05份硫酸镁、0.05份氯化钙、0.08份硫酸铁、0.1份磷酸氢二钠、1份微量元素溶液、10份葡萄糖和800份水。

[0082] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂359 mg,其中 α -亚麻酸188 mg。

[0083] 实施例12:

[0084] 本实施方式微芒藻利用含铵离子溶液产油脂的方法按照以下步骤进行:

[0085] 步骤一、将由氯化铵提供铵离子的、铵离子浓度为60 mM的含铵离子溶液pH调整为7,121°C灭菌15 min,按照接种量0.2 g/L将微芒藻*Micractinium* sp. HDL02接种至上述灭菌溶液中,在光照强度3000 lux、光照周期12h /12h(光/暗)、温度25°C、摇床转速120rpm的条件下发酵6d,得到发酵液。

[0086] 步骤二与实施例1相同。

[0087] 本发明步骤一中含铵离子溶液还包括以下组分:重量份数比0.05份硫酸镁、0.05份氯化钙、0.08份硫酸铁、0.1份磷酸氢二钠、1份微量元素溶液、10份葡萄糖和800份水。

[0088] 本实施例每升含铵离子溶液可获得油脂368 mg,其中 α -亚麻酸208 mg。

[0089] 由实施例7~实施例12可知,本发明微芒藻*Micractinium* sp. HDL02利用含铵离子溶液发酵,可产含 α -亚麻酸的油脂,且油脂产量、 α -亚麻酸含量较高。每升含铵离子溶液可获得油脂357~498 mg,其中 α -亚麻酸194~282 mg。

[0090] 比较例1:

[0091] 本比较例与实施例1不同的是,步骤一中含铵离子溶液pH为5.2。其他步骤和参数和实施例1相同。

[0092] 比较例2:

[0093] 本比较例与实施例1不同的是,以微藻培养常用培养基BG-11替代含铵离子溶液,发酵时间为18天。其他步骤和参数和实施例1相同。

[0094] 比较例3:

[0095] 本比较例与实施例1不同的是,步骤一中无灭菌环节,其他步骤和参数和实施例1相同。

[0096] 比较例4:

[0097] 本比较例与实施例1不同的是,步骤一中不设置光照和摇床转速。其他步骤和参数和实施例1相同。

[0098] 比较例5:

[0099] 本比较例与实施例1不同的是,步骤一中温度设置为18°C。其他步骤和参数和实施例1相同。

[0100] 表1 实施例1与比较例的油脂及 α -亚麻酸产量对比

组别	油脂产量 (mg/L)	α -亚麻酸产量 (mg/L)
实施例1	334	208
比较例1	72	41
比较例2	61	30
比较例3	93	50
比较例4	169	77
比较例5	126	91

[0102] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。