

采用微滤膜浓缩乳酸菌发酵液的工艺条件研究

刘振民

(均瑶乳业股份有限公司研发中心, 上海, 200032)

摘要 采用先进的微滤膜技术浓缩乳酸菌发酵液, 结果表明, 调整总通量、跨膜压力可以减少膜浓差极化及膜污染; 对微滤膜的超微结构、菌体状态、杂质吸附进行扫描电镜观察, 发现微滤膜孔径大小不一, 呈现宽窄不同的谱图。微滤膜孔径分布的均一性也与膜的质量有关。德氏乳杆菌保加利亚亚种、唾液链球菌嗜热亚种等发酵菌液在微滤膜中均可以得到有效截留。颗粒及吸附的菌体会形成膜的覆盖层。微滤浓缩、超滤浓缩、离心浓缩的浓缩比分别为 19.1、16.9、15.9 倍, 浓缩后的菌液浓度分别为 1.15×10^{10} cfu/mL、 9.79×10^9 cfu/mL、 5.38×10^9 cfu/mL。

关键词 乳酸菌, 微滤膜浓缩, 扫描电镜观察

膜分离技术是近几十年来迅速发展起来的高效分离技术。聚四氟乙烯和聚偏氟乙烯制成的微滤膜在美、德、日已经商品化。目前全世界微滤膜的销售量在所有合成膜中居第 1 位。与传统的分离技术相比, 它具有设备简单、操作方便、分离效率高和节能等优点, 被认为是“21 世纪最具有发展前途的高新技术之一”。目前膜技术主要用于水处理^[4~6]等。发酵乳的生产和品质改善与乳酸菌发酵剂有直接关系^[1]。文中应用平板式微滤法进行了浓缩乳酸菌发酵液的研究。

1 材料与方法

1.1 主要试验设备

美国密理博公司板式超滤装置、Giko 公司 IB-5 型离子溅射仪、KYKY-1000B 型扫描电子显微镜、LG10-2.4A 离心分离器。

1.2 试验菌株

德氏乳杆菌保加利亚亚种(LDB)活化 2 次后在 MRS 肉汤培养液中接种 5% 于 37℃ 培养, 菌体增殖到稳定期后从保温箱中取出, 冷却备用。唾液链球菌嗜热亚种(ST)在使用前活化 2 次, 在 M₁₇ 肉汤培养液中接种 5% 于 37℃ 培养, 菌体增殖到稳定期后从保温箱中取出, 冷却备用。

1.3 试验方法

在乳酸菌发酵液中添加无菌的 1.0 mol/L 的 NaOH, 调整 pH 值至 6.0, 利用美国密理博公司的平板式膜过滤设备通过微滤膜(0.1 μm)浓缩乳酸菌。操作的跨膜压力在 0~80 kPa, 操作温度为室温, 采用循环模式进行操作。

1.4 定义

膜通量: 单位时间、单位面积通过膜的液体体积(L/m²·h)。

浓缩比 = 原样液体积/浓缩液体积

截流比 =

$$\frac{\text{保留液体积} \times \text{保留液中某物质(菌体)的含量}}{\text{原样液体积} \times \text{原样液中某物质(菌体)的含量}} \times 100\%$$

1.5 乳酸菌微滤浓缩的扫描电镜观察

取微滤膜浓缩后的膜片, 于室温下自然干燥, 保证样品呈现原有形态。切取干燥后适当大小的膜片, 粘附于扫描电镜样品台的双面胶上, 于 Giko 公司 IB-5 型离子溅射仪中进行镀膜处理, 6 cm 的钽-钽合金丝溅射镀膜 4 min, 厚度约为 20 nm。镀膜后的样品置于样品篮中。根据需要在扫描电镜下观察。

1.6 测定方法

总固形物含量的测定: 采用 105℃ 烘干至恒重进行测定。

菌数测定: MRS 培养基为德氏乳杆菌保加利亚亚种的计数用培养基^[7], 37℃ 培养 72 h。

唾液链球菌嗜热亚种用 M_{17} 培养基培养,于 37°C 培养 48h 进行计数。结果以 cfu/mL 或 cfu/g 表示。

2 结果与分析

2.1 微滤浓缩过程中渗透通量和压力的变化

在乳酸菌微滤浓缩过程中,渗透通量和跨膜压力的变化如图 1 和图 2 所示。

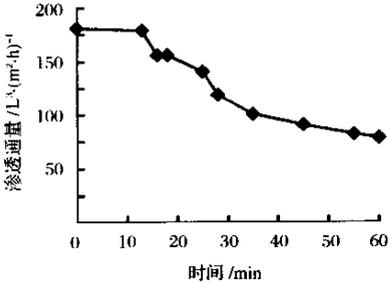


图 1 微滤过程中渗透通量的变化

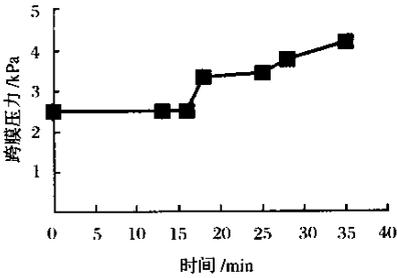


图 2 微滤过程中跨膜压力的变化

由图 1 可以看出,乳酸菌微滤膜浓缩过程中,在前 15 min 渗透通量基本保持恒定,之后开始缓慢降低,35 min 后又保持基本的恒定。由于覆盖层的形成,发酵液浓缩时会受到更大的阻力,则驱动膜的跨膜压力会自然增加,如图 2 所示。

2.2 跨膜压力对渗透通量的影响

测定了跨膜压力对渗透通量的影响,结果见图 3。

由图 3 可以看出在 2.9~7.6 kPa 的跨膜压力范围内,随着跨膜压力的增加膜通量也增加。在微滤膜过滤浓缩过程中为提高渗透通量,加快浓缩的速度,可以加大跨膜压力。

2.3 总通量对渗透通量的影响

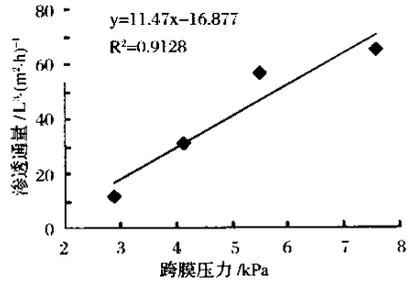


图 3 跨膜压力对渗透通量的影响

总通量对微滤过滤浓缩过程中渗透通量的影响见图 4。

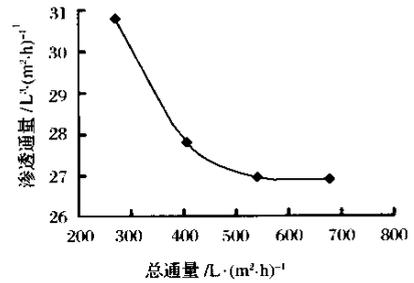


图 4 总通量对渗透通量的影响

由图 4 可以看出,总通量从 $260 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 增加到 $400 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$,渗透通量快速下降;总通量继续增加,渗透通量缓慢下降后保持恒定。总通量增加,单位时间单位膜面积流过膜表面的浓缩液增加,溢流速度增加,悬浮液没有足够的时间在膜表面停留进行膜过滤,使增加的通量以循环液形式返回,膜渗透通量反而降低。总通量继续增加,则在循环液与浓缩液之间达到平衡,渗透通量保持基本恒定。

2.4 乳酸菌微滤浓缩的扫描电镜

乳酸菌微滤浓缩的扫描电镜见图 5 所示。

从图 5 可以看出,德氏乳杆菌保加利亚亚种菌体长度在 $7\sim 12 \mu\text{m}$,宽度在 $1.5\sim 2 \mu\text{m}$,其体积远远大于膜的孔径;在菌液浓缩过程中菌体被微滤膜截留。嗜热链球菌菌体呈现典型的链状排列,大小在 $1.5\sim 3 \mu\text{m}$,其体积也大于微滤膜的孔径;在菌液浓缩过程中菌体被微滤膜截留。

微滤膜的孔径大小不一,呈现宽窄不同的谱图。另外,通过电镜观察发现,微滤膜孔径分

布的均一性也与膜的质量有很大的关系。

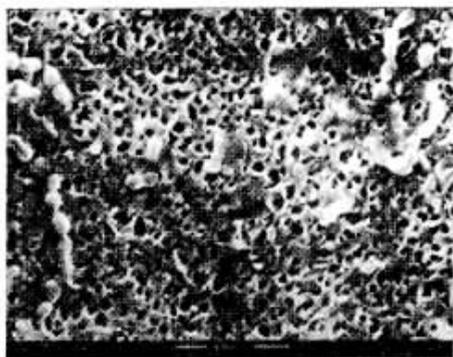
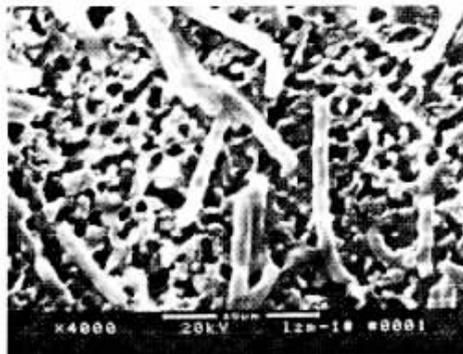


图5 微滤浓缩过程中德氏乳杆菌保加利亚亚种(左)和嗜热链球菌(右)的扫描电镜观察

从图5还可以看出,菌液微滤浓缩过程中,原料液在压差的推动下,水分及小于膜孔的颗粒透过膜孔,大于膜孔的颗粒及菌体被截留。菌体直径大于膜孔径时,菌体附着在膜的表面,依靠混合液的湍动容易清除;应用反冲法可以使附着的菌体再次返回到浓缩液中,减小了微滤膜的吸附,通量增加。

2.5 几种浓缩方式的比较

以德氏乳杆菌保加利亚亚种为试验菌株, MRS为培养介质,在37℃发酵至稳定期早期,以3种方式浓缩菌液:以 $5\ 000 \times g$ 离心15 min收集菌体,微滤($0.1\ \mu\text{m}$)浓缩收集菌液,超滤(截留分子量为30万)浓缩菌液,3种方式的浓缩结果见表1。

表1 3种浓缩方式的比较

浓缩方式	起始菌数 /cfu·mL ⁻¹	浓缩比	通透量 /L·(m ² ·h) ⁻¹	菌体截留比 /%
离心浓缩	6.4×10^8	15.9	—	52.9
微滤浓缩	6.1×10^8	19.1	101.2	98.7
超滤浓缩	5.8×10^8	16.9	86.9	99.9

由表1可以看出,膜过滤浓缩与离心浓缩相比,菌体损失率较小。

膜分离技术^[2,3]在分离过程中不涉及相变,无二次污染,易于自动化和扩大生产规模,分离效率较高。利用微滤技术可以收获菌体,富集菌体,更好地完成乳酸菌生物工程技术的下游操作。

3 结论

乳酸菌液微滤浓缩过程中,大于膜孔的杂

质、颗粒及菌体是形成膜吸附层的重要因素,引起膜通量降低,微粒的沉积与溢流的冲脱处于平衡,在一特定的时间膜通量会处于稳定状态。

调整总通量、跨膜压力以及进行反向冲洗,可以减小膜的污染或极化。

德氏乳杆菌保加利亚亚种、唾液链球菌嗜热亚种等发酵菌液在微滤膜中均可以得到有效截留。微滤膜技术是制备乳酸菌浓缩液的有效手段。

参 考 文 献

- 1 刘振民, 骆承庠. 乳酸菌发酵剂生物工程技术[J]. 食品与发酵工业, 2000(4): 68~72
- 2 刘茉娥. 膜分离技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998
- 3 Rautenbach R, 王乐夫译. 膜工艺-组件和装置设计基础[J]. 北京: 化学工业出版社, 1998
- 4 刘忠洲, 续曙光, 李锁定. 微滤、超滤过程中的膜污染与清洗[J]. 水处理技术, 1997, 23(4): 187~193
- 5 Kolb F R. Activated carbon membrane biofilm reactor for the degradation of volatile organic pollutants[J]. Water Science Technology, 1995, 31(1): 205~213
- 6 Choo K H. Effect of anaerobic digestion broth composition on membrane permeability[J]. Water Science Technology, 1996, 34(9): 173~179
- 7 Seppo S V, Atte W. Lactic acid bacteria[M]. New York: Marcel Dekker, Inc, 1998

Studies on Micro-Filtration Membrane Concentration of Lactic Acid Bacteria

Liu Zhenmin

(Research & Development Center Junyao Dairy Company Ltd., Shanghai, 200032)

ABSTRACT Micro-filtration membrane was used to concentrate lactic acid bacteria (LAB) in this study. By adjusting total flux and trans-membrane pressure could decrease membrane contamination and polarization. The micro-filtration membrane ultra-structure, existence state of LAB and impurity absorption state were observed by using scanning electric microscope. The results showed that the membrane pore size varies, which was related to the membrane quality. Fermented solutions of LDB or ST were hold back efficiently by micro-membrane while grain and the absorbed bacteria contributed to the overlay layer of membrane. The concentration ratio of micro-filtration, ultra-filtration, centrifugal concentration were 19.1, 16.9, 15.9 and the concentration of LAB were 1.15×10^{10} cfu/mL, 9.79×10^9 cfu/mL, 5.38×10^9 cfu/mL respectively. It was determined that micro-filtration technology was a very efficient way to concentrate LAB.

Key words Lactic acid bacteria, micro-filtration membrane concentration, scanning electric microscope observation

《功能食品研究与应用》 吴谋成主编 2004年1月出版 30元

信息窗

被人们称为“21世纪的食品”的第升代功能食品(保健食品),是食品营养与功能研究的热门课题,是当今的研究前沿与方向。本书上篇对第三代功能食品的概念、发展方向、各类功能活性成分及其性质与结构的研究方法、功能评价、提取、分离纯化、制备进行了详细的阐述,下篇对各生理阶段人群的营养及常见病,各类功能食品进行了介绍。

《发酵工程实验技术》 陈坚、堵国成、李寅、华兆哲编著 2003年5月出版 56元

该书是《生物实验室系列》丛书中的一本,重点介绍了涉及各种生物反应器的微生物细胞、动物细胞和植物细胞培养技术,包括发酵工程实验室的建立、实验室规模生物反应器的使用、菌种保藏、接种技术、无菌操作技术、发酵过程的检测与传感器、连续培养和补料分批培养操作技术等内容,还详细讨论了发酵过程控制、建模和仿真等发酵工程领域的前沿技术。本书将国外最新实验技术、国内现有的实验材料以及作者自己的科研有机地结合起来,前沿性、实践性和系统性构成了本书的拓色。

《食品与农产品品质无损检测新技术》 陈斌、黄星奕编著 2004年3月出版 25元

食品与农产品品质无损快速检测技术是20世纪后期发展起来的集物理学、化学、物料物性学、分析仪器、数据处理、信号分析、计算机应用等学科为一体的交叉型应用科学。本书从原理和应用两个方面,介绍了利用食品与农产品的力学特性、电学特性、光学特性、外形特征和嗅觉特性等快速检测其品质的新技术。

《动物细胞培养技术与应用》 王捷主编 2004年5月出版 32元

该书作为《实用生物技术丛书》(共7册,已出版5册)中的一册,全面系统地介绍了动物细胞培养技术的最新理论和应用。内容包括动物细胞培养的基本过程和放大技术,动物细胞在单克隆抗体制备、疫苗生产、基因重组蛋白药物生产、组织工程、SARS研究中的应用,外源基因在动物细胞中的表达与产物纯化,树突状细胞的制备技术。全书内容紧密结合实际,具有较高的学术价值。

其他已出版的4册分别为《酶的生产与应用》(郭勇主编,2003年10月出版,35元)、《基因克隆技术在制药中的应用》(杨汝德主编,2004年1月出版,45元)、《细胞融合技术与应用》(罗立新主编,2004年1月出版,25元)、《植物细胞培养技术与应用》(郭勇、崔堂兵、谢秀祯主编,2004年1月出版,33元)。

以上各书均可在编辑部订购,另加15%的邮费。