

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 离心分离机。

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 的钨-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。

第一作者: 博士, 均瑶乳业科研中心主任。

收稿时间: 2004-06-08

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。

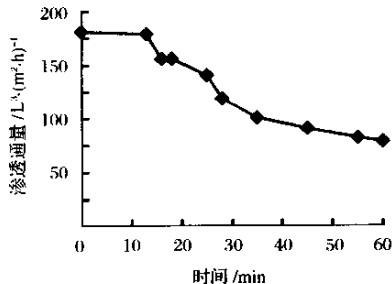


图 1 微滤过程中渗透通量的变化

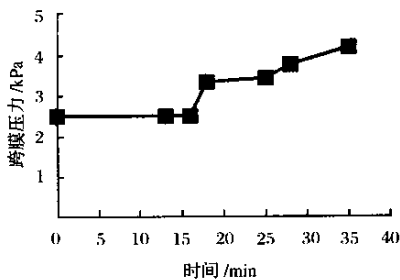


图 2 微滤过程中跨膜压力的变化

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 $2.9 \sim 7.6 \text{ kPa}$ 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

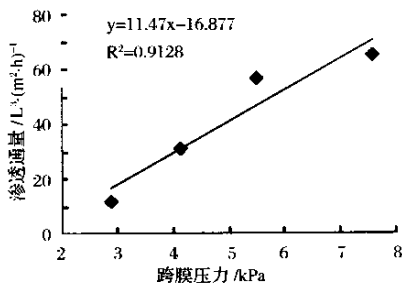


图 3 跨膜压力对渗透通量的影响

总通量对微滤过滤浓缩过程中渗透通量的影响见图 4。

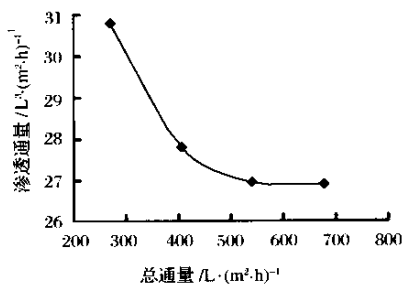


图 4 总通量对渗透通量的影响

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。

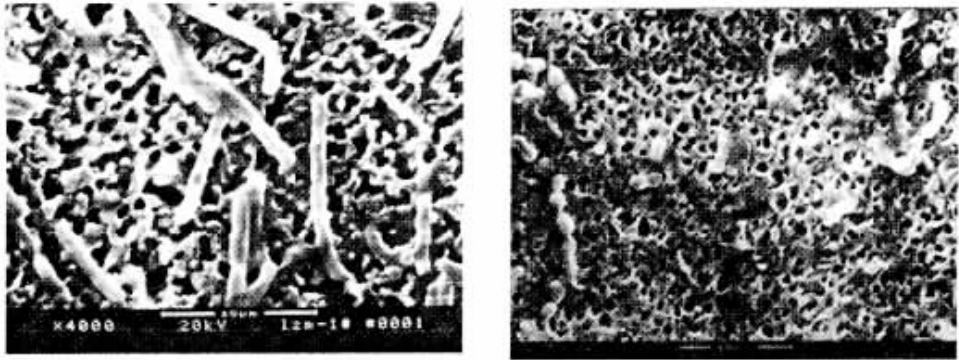


图5 微滤浓缩过程中德氏乳杆菌保加利亚亚种(左)和嗜热链球菌(右)的扫描电镜观察

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×g离心15 min,收集菌体;微滤(0.1 μm)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)

ABSTRAC 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 scan electrician microscope. The results showed that the mem-brane pore size varies ,which was related to the membrane guality. 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 micro-scope observation

信息窗

《功能食品研究与应用》 吴谋成主编 2004 年 1 月出版 30 元

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、无菌操作郊术、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、信号分析煌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。