

乳酸菌发酵液中胞外多糖的超滤浓缩技术研究

梅秀明, 潘道东*

(南京师范大学乳品生物技术研究所, 江苏 南京 210097)

摘要: 采用了内压式中空纤维膜超滤装置对乳酸乳球菌乳亚种发酵液中胞外多糖进行超滤浓缩分离。研究结果表明: 在操作压力 0.08MPa, 操作温度 25℃ 的条件下, 用分子量为 50ku 的膜超滤经离心除菌的发酵液, 发酵液的体积浓缩了 5 倍多, 而胞外多糖的含量从 949.54mg/L 上升到 4790mg/L。

关键词: 乳酸菌; 胞外多糖; 超滤浓缩

Study on Ultrafiltration Concentration Technology of Exopolysaccharide Produced by Lactic Acid Bacteria

MEI Xiu-ming, PAN Dao-dong*

(Dairy Biotechnology Institute, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The concentration of polysaccharide solution fermented by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* with hollow fiber membrane ultrafiltration was carried out. The results indicated that the exopolysaccharide concentration in fermentation broth increases to 4790 mg/L from 949.54 mg/L under the operation pressure 0.08 MPa, temperature 25 °C and 50 ku molecular of membrane, and the volume of the fermentation broth is reduced by 5 times.

Key words: lactic acid bacteria; exopolysaccharide; ultrafiltration concentration

中图分类号: TQ929.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)12-0413-04

随着膜分离技术的不断发展, 超滤技术在许多工业领域中得到了广泛应用, 如工业废水深度处理^[1-2]; 化学、食品与医药工业中高分子溶液的浓缩、纯化和分离, 生物制品溶液和饮料的除菌、澄清和纯化, 淀粉酶、糖化酶、碱性蛋白酶等的纯化、分离和浓缩, 多糖的提纯和浓缩等等^[3-4]。

中空纤维超滤法与其他形式的平面膜超过滤系统相比较, 由于膜孔径小增加了液体流动的剪切力, 过滤时不容易产生浓差极化, 提高了过滤效果, 并具有同时进行脱盐与浓缩、操作方便、能耗低、效率高、条件温和等许多优点, 已应用于食品与医药工业中高分子的浓缩、纯化和分离^[5]。

微生物胞外多糖发酵液经过浓缩分离可获得液剂或固体粉剂的产品。这些产品必须具有性能稳定, 易于处理、运输、储存和应用方便、溶解快的特点。含有菌体的多糖在食品和许多工业领域中的应用受到限制。经过过滤除菌或酶法除菌的多糖都进行了适当的稀释, 稀释的产品不方便运输和储存^[6]。此外, 残余的

培养基成分, 会使储存的多糖无论液剂还是粉剂产生异味。采用膜分离技术对多糖的发酵液进行预处理, 不仅可以浓缩澄清的多糖, 还可分离发酵液中残余的培养基组分, 包括: 糖、含氮物质、无机盐等。

本实验研究超滤浓缩乳酸乳球菌乳亚种产胞外多糖发酵液, 比较离心除菌和未经除菌的发酵液在超滤时的不同及探讨压力、温度等对超滤的影响, 并对超滤中存在的膜污染问题进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种: 乳酸乳球菌乳亚种(以下称乳球菌), 南京师范大学乳品科学研究所筛选并保存。

乳球菌发酵液的制备: 把乳球菌接种到本研究所改良的 BLX 培养基中(即在 BLX 培养基的基础上, 改进培养基成分: 葡萄糖 10.0g、果糖 10.0g、蛋白胨 12.5g、胰蛋白胨 12.5g), 放入 37℃ 恒温培养箱中培养 24h 后, 按 3.0% 的接种量活化两次, 培养 12h 后, 即成为种子

收稿日期: 2007-10-13

基金项目: 江苏省攻关项目(BE2006325); 国家高技术研究发展计划项目(2007AA10Z357);

“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD27B09)

作者简介: 梅秀明(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事乳品科学研究。E-mail: mxm_16020330@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 潘道东(1964-), 男, 教授, 主要从事乳品科学研究。E-mail: daodongpan@163.com

培养基; 扩大培养的发酵条件是: 发酵温度 35℃、初始 pH 值为 6.0、接种量 3.0%、发酵时间为 24h, 即得所需要的乳球菌产胞外多糖的发酵液。

1.2 仪器与设备

UF-4050 型超滤装置 上海摩速科学器材有限公司; 生化培养箱 广东省医疗仪器厂; 超净工作台 上海浦东跃欣科学仪器厂; 高速冷冻离心机 赛特湘仪离心机仪器有限公司; 高压灭菌锅 上海医用核子仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 膜通量的测定

膜通量是用单位时间内通过单位膜面积的透过液的数量来表示的。在一定压力、料液流速、温度等条件下, 取样, 然后记录一定时间内的透过液。按下式计算膜通量^[7]。

$$J = \frac{V}{TA}$$

式中, J 为膜通量(L/m²·h); V 为取样体积(L); T 为取样时间(h); A 为有效膜面积。

1.3.2 优化超滤工艺参数

考察经过离心除菌和未经处理的发酵液, 不同操作压力(0.02、0.04、0.06、0.08、0.10MPa), 不同的料液温度(15、25、35℃), 对超滤膜通量的影响, 确定最佳工艺参数。

1.3.3 胞外多糖的测量方法

用苯酚-硫酸法测胞外多糖的含量。

1.3.4 膜通量的恢复率的测定^[8]

膜的清洗效果可分别测定膜清洗溶液前、后及清洗后的水通量, 计算出膜通量的恢复率。

$$\text{膜通量的恢复率(\%)} = \frac{J_0'}{J_0} \times 100$$

式中, J_0 为膜处理前水的透过通量; J_0' 为清洗后水的透过通量。

1.3.5 膜通量衰减程度的测定

膜通量衰减程度是指由于超滤过程的浓差极化及膜压实以及膜孔堵塞等原因造成的膜通量随时间减少。分别测定膜处理溶液前、后的水通量。

$$\text{膜通量衰减程度(\%)} = \frac{J_0 - J_t}{J_0} \times 100$$

式中, J_t 为膜处理后水的透过通量。

2 结果与分析

2.1 纯水的透过通量与压力的关系

室温 25℃下, 选用截留分子量为 50ku 的膜, 分别测定蒸馏水在 0.02、0.03、0.05、0.08MPa 压差下透过膜的通量, 结果如图 1 所示。

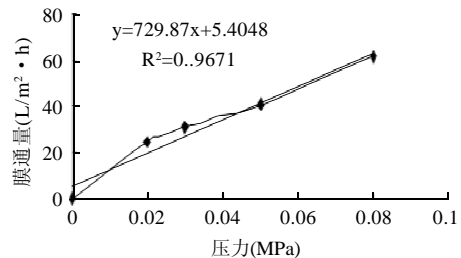


图 1 不同压力下纯水透过超滤膜的通量
Fig.1 Permeation flux of water at different pressures

结果表明, 在纯水超滤的情况下, 随着压力的增大, 膜通量也不断增大, 而且膜通量与压力差成线性关系, 线性关系良好。

2.2 发酵液预处理对膜通量的影响

超滤浓缩的料液必须是均一的溶液。如果含有不溶性的组分则会造成膜孔的堵塞, 降低超滤浓缩的效率。细菌菌体细胞直径在 1~10 μm, 容易堵塞膜孔。在 25℃, 0.06MPa 下, 截留分子量 50ku, 比较了经离心除菌和未经除菌的发酵液在超滤时的差异。离心除菌时的条件为: 转速 5500r/min, 时间 10min, 温度 4℃。经超滤浓缩发现(图 2), 离心去除菌体的发酵液通量大于不除菌的。未除菌的发酵液在超滤过程中通量的衰减明显快于除菌料液。这表明, 料液中的菌体造成了膜的严重污染, 阻碍了分离的进行。发酵培养基如果使用了不溶性的培养基成分, 超滤前的粗滤就显得更为重要^[9]。

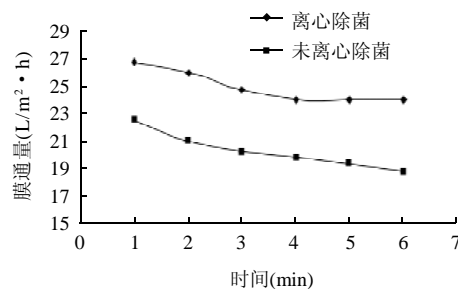


图 2 发酵液去除菌体对膜通量的影响
Fig.2 Effects of cell debris on flux of membrane

2.3 操作压力对膜通量的影响

压力是影响膜通量的一个重要因素。本实验在温度 25℃、50ku 滤膜的条件下考察了滤膜两侧压力差对膜通量的影响。一般情况, 滤液的压差越大, 滤速越快, 通量也越大。但浓差极化是膜操作过程中一个不可忽视的影响因素。

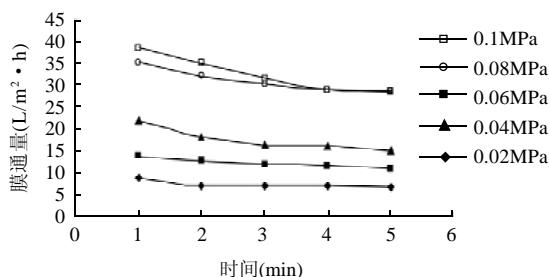


图3 不同操作压力对膜通量的影响
Fig.3 Effects of pressure on flux of membrane

从图3中可看出,超滤压差增大可提高超滤的流量。然而压差增大同时也会加速膜的压实,使流量下降,并且能耗大,故操作压力差也不是越大越好。从图中可以看出,压力越大,膜通量的衰减越快,从第1min到第3min,压力从小到大,膜通量分别降低了1.80、1.95、5.55、5.10、6.60L/m²·h。随着压力的增大,膜通量的下降幅度也不断增大,压力越小,膜通量的曲线越平缓。到第4min时,0.1MPa时的膜通量下降到0.08MPa时的膜通量,等到4min后,各压力下的膜通量变化幅度变小。所以选用0.08MPa的操作压力。

2.4 操作温度对膜通量的影响

压差为0.08MPa,膜大小为50ku,不同的温度(15、25、35℃)下,研究了温度对超滤流量的影响,结果如图4所示。从图4可看出,在相同的压力下,膜流量随发酵液温度的升高而增加。因为温度升高,发酵液的粘度下降,有利于溶液组分的扩散和发酵液在膜组件中的流动,减缓浓差极化。但提高发酵液的温度也必须考虑能耗、膜组件的性能,并且应限制在不使产品变性的范围内。本实验使用的膜组件要求处理温度小于50℃,因此研究中采用的最高温度为35℃,从研究的结果可以看出,温度的提高将更有利于超滤浓缩。而且胞外多糖是热敏性比较低的物质,在低于35℃的温度下,性质不会发生变化。

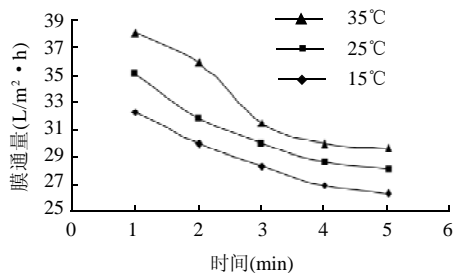


图4 操作温度对膜通量的影响
Fig.4 Effects of temperature on flux of membrane

2.5 不同截流分子量透过膜的流量比较

在相同压力(0.02MPa)、相同温度(25℃)下用不同截留分子量的膜对离心除菌后的发酵液进行超滤,比较膜流量的差异。

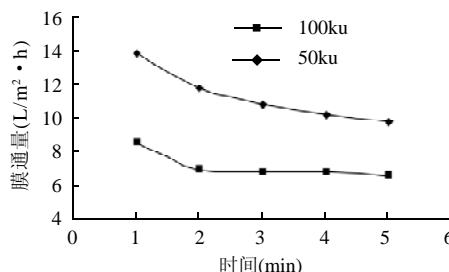


图2 不同截留分子量的膜对流量的影响
Fig.2 Fluxes of membranes with different molecular weights cut-off

由图2可知,在相同条件下,用不同截留分子量的膜对离心除菌后的发酵液进行超滤,对膜流量有很大的影响。分子量为100ku的膜在超滤的最初阶段,膜流量大,但膜流量衰减很快,平均膜流量为11.25L/m²·h;分子量50ku的膜流量比100ku的变化缓慢,平均膜流量为7.11L/m²·h。100ku膜的平均膜流量比50ku膜的平均膜流量高4.14L/m²·h。这是因为分子量为100ku的膜的孔径较大,料液中的多糖、蛋白质等大分子物质进入孔的几率也大,初始流量就大,但随着超滤时间的延长,由于浓差极化易造成膜孔堵塞,使流量下降较快;而分子量为50ku膜因绝大部分大分子物质大于其截留分子量,膜堵塞的几率很小,故膜流量下降平缓。综合考虑,本实验选择分子量为5ku的膜进行超滤。

在前面实验的基础上,又进行了一次超滤,条件为:操作压力0.08MPa,操作温度25℃,选用了分子量为50ku的膜,发酵液经过离心除菌的前处理,结果如表1。1L的发酵液离心后经过10min的超滤,发酵液的体积浓缩了5倍多,而胞外多糖的含量从949.54mg/L上升到4790mg/L,提高了5倍,所以超滤方法与旋转蒸发浓缩发酵液的方法相比,节约了时间,节省了能源,而且易于控制。

表1 超滤结果表

Table1 Indexes of fermentation broth before and after ultrafiltration				
超滤前 体积(L)	超滤后 体积(L)	超滤前 多糖含量(mg/L)	超滤后 多糖含量(mg/L)	多糖浓缩 倍数
1.0	0.194	949.45	4790.0	5.04

2.6 膜流量的恢复率和膜流量衰减程度的测定

在0.06MPa,25℃,透过分子量50ku条件下,分别测定了膜处理前、后以及清洗后纯水的膜流量J₀、J₁、J₀' ,结果如表2。

表2 膜通量的衰减和恢复
Table 2 Decrease and recovery of permeation flux

J_0 (L/m ² ·h)	J_t (L/m ² ·h)	J_0' (L/m ² ·h)	膜通量 衰减(%)	恢复率(%)
48.81	35.25	47.25	27.80	96.80

膜污染是指被处理物料中的微粒、胶体粒子和溶剂大分子由于与膜存在物理化学相互作用和机械作用而引起的膜表面或膜孔内吸附、堵塞使膜产生透过通量与分离特性的不可逆变化的现象^[10]，而浓差极化则是由于膜表面和膜孔内的选择透过性造成的膜面浓度高于处理液的现象。这两者虽然概念不同，但密切相关，常常同时发生、许多场合下是浓差极化导致了膜污染^[11]。

膜装置先用0.1%~0.2%的NaOH冲洗，再用大量的蒸馏水冲洗。测定清洗后膜的水透过通量，发现经过这次清洗通量恢复率为96.80%。延长冲洗时间可能会得到更佳的效果。

2.7 膜污染的处理及处理方法

为了最大程度的减少膜污染行为的发生，在料液处理后应及时的对超滤膜进行清洗，对长期不用的超滤膜应该用1%的甲醇浸泡^[12]。清洗过程中如果用清水难以处理，可以先用弱碱液进行清洗，然后用清水反复冲洗。若出现长期不用的超滤膜长菌现象，可利用10%左右的NaCl处理，以起到杀菌作用。总而言之，超滤虽然是一项非常高效的分离方法，但是膜污染一直是它最大的弊端，所以弄清膜污染的机理，找到解决膜污染的最佳途径以延长膜的使用寿命是今后膜分离的一个研究方向。

3 结论

采用截留分子量为50ku的内压式中空纤维超滤器对乳酸乳球菌乳亚种发酵液进行超滤浓缩的研究表明，经

过离心去除菌体的胞外多糖溶液可以采用此膜装置进行浓缩。超滤过程中提高料液的温度，加大操作压力则可减轻浓差极化提高超滤的通量。此膜装置超滤处理的料液量大，时间短。但是缺点是膜容易吸附多糖造成膜的堵塞，难于清洗。

纯水透过通量与压力成良好的线性关系，膜通量随压力的上升而上升。操作压力和操作温度都影响超滤浓缩发酵液时的膜通量，在膜设备允许的范围内，压力越大，温度越高，膜通量越大。经过离心除菌的发酵液比不经过处理的发酵液透过通量高，衰减慢。

参考文献：

- [1] 高孔荣, 黄惠华, 梁照为. 食品分离技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2005: 66-68.
- [2] 王竞, 周集体, 曹文伟, 等. 超滤浓缩担子菌发酵液聚合物的研究[J]. 大连理工大学学报, 1999, 30: 415 - 418.
- [3] 王景, 王小昌, 石成. 膜污染及其控制方法[J]. 给水排水, 2000(9):78-81.
- [4] CANNON J. Compiler: European, 02661634[P]. 1988-05-04.
- [5] 洪厚胜, 顾亚军, 黄原胶发酵液纯化精制研究[J]. 工业微生物, 2000, 30(2): 34-37.
- [6] LEE H L. Concentrated xanthan gum solutions: US, 3299825[P]. 1981-11-10.
- [7] 张宁, 彭志英. 中空纤维超滤膜浓缩胞外多糖 PS-9415 发酵液的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 24(3): 24-27.
- [8] 宋刚, 张宁, 彭志英. 超滤浓缩微生物胞外多糖 PS-9415 发酵液的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(2): 42-44.
- [9] TRIVENI R. Clarification of xanthan gum with extracellular enzymes secreted by *Trichoderma koningii*[J]. Process Biochemistry, 1999,34: 49-53.
- [10] 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, 1992, 23 (4): 184-193.
- [11] 王志, 甄寒菲, 王世昌, 等. 膜过程中防治膜污染强化渗透通量技术进展(1)操作策略[J]. 膜科学与技术, 1999, 19 (1): 1-5.
- [12] 姜安玺, 赵玉鑫, 李丽, 等. 膜分离技术的应用与进展[J]. 黑龙江大学学报自然科学学报, 2002, 19(3): 98-103.