

食品生物工程与设备实验指导书

编者：

西北农林科技大学食品科学与工程学院

二〇〇九年五月

《生物工程与设备》综合性实验大纲

一、实验课开设目的。

通过综合性实验要求学生掌握发酵的过程及发酵产物的分离提取的方法及一般步骤，增强学生的动手能力，培养工程素养。

二、实验课学时分配。

本课程总学时36，其中讲课27，综合性实验6。

序号	实验题目	学时
1	柠檬酸的发酵、提取及精制	6
合计		6

三、实验课教材、参考数目

1、理论讲授教材

梁世中主编, 生物工程设备, 中国轻工出版社, 2002年2月。

2、实验指导书

自编实验指导书

3、参考书

(1) 程丽娟, 薛泉宏, 微生物学实验技术, 兴界图书出版公司, 2000年4月。

(2) 贾世儒主编, 生物工艺与工程试验技术, 中国轻工业出版社, 2002年9月。

四、实验内容及要求

实验 柠檬酸的发酵、提取及精制 (6 学时)

柠檬酸的发酵

一、目的要求

了解利用黑曲霉生产柠檬酸的原理与流程，掌握柠檬酸的发酵生产方法。

二、基本原理

用于柠檬酸生产的原料有淀粉、废糖蜜等。本实验以糖为发酵原料，黑曲霉为产生菌。黑曲霉产柠檬酸多，耐酸力强。pH 1.6~1.7 时尚能生长。且酸度大时产生葡萄糖酸、草酸等副产物较少，故进行柠檬酸发酵时，培养液以在 pH 2-3 为宜。在一般发酵中，均产生多种酸，其中，低碳链的直链脂肪酸如甲酸、乙酸等称为挥发酸，而乳酸、柠檬酸等称为非挥发酸。挥发酸和非挥发酸的总和称总酸。酸的测定方法常采用中和法、电位滴定法及比色法等。若待测液色泽很深，可采用外指示剂法。本试验用中和法测定柠檬酸发酵中的总酸。柠檬酸的定性检验用 Deniges 试剂。

三、实验材料

1. 菌种 黑曲霉斜面菌种 3 支。

2. 器材 柠檬酸发酵培养液 硝酸铵 2.0g, KH_2PO_4 1.0g, MgSO_4 0.25g, 蔗糖 150g, 1mol / L HCl 17ml, 水 1000ml。取 100ml 上述培养液，加入 500ml 三角瓶中，包扎灭菌。

Deniges 试剂(HgO 1g 溶于 20ml 0.2L / L H_2SO_4 中); 0.1mol / L 标准 NaOH 0.1mol / L H_2SO_4 ; 酒精灯; 滤纸, 漏斗; 烧杯: 200ml, 500ml; 18X180 试管; 吸管 10ml、5ml, 150ml 三角瓶; 碱滴定管, 铁台、蝴蝶夹; 酚酞指示剂: 200ml 量筒; 广泛 pH 试纸; 玻璃棒; 牛角勺; 布氏漏斗, 抽滤纸, 抽滤水泵, 离心机和离心管, 滴管, 天平。

四、实验步骤

1. 接种 取柠檬酸发酵培养液 3 瓶，用接种环向每瓶接入黑曲霉孢子 2~3 环，25—28℃ 摇床培养 5~7d。另 1 瓶不接种留作对照。

2. 过滤 将 3 瓶培养液一并过滤，菌丝用蒸馏水略加洗涤后弃去。

3. 定性检验 取过滤液和对照液各约 5ml，放入试管内，加 Deniges 液 1ml，在酒精灯上缓缓加热至沸。逐滴加入 20g / L KMnO_4 溶液。若有柠檬酸存在，则出现白色沉淀。

4. 酸度滴定 将过滤液充分摇匀，用吸管吸取 10ml 放入 150ml 三角瓶中，加 2 滴酚酞指示剂，用 0.1mol / L NaOH 滴定酸度。对照亦按同法滴定。二者消耗 NaOH 毫升数的差额乘以 0.64，即得柠檬酸(g / L) 的大约数。

柠檬酸的提取及精制

一、实验目的与要求

了解柠檬酸的发酵、树脂提纯及精制柠檬酸的方法，进一步学习并掌握离子交换法的操作过程。

二、实验主要内容

通过柠檬酸的发酵、树脂提纯及精制柠檬酸

三、实验仪器与试剂

1. 实验所需仪器设备

三角瓶、酸式滴定管、烧杯、吸管、水浴锅、恒流泵、树脂交换柱、收集器、旋转蒸发仪、摇床、碱式滴定管、抽滤机

2. 实验所需试剂（每班所需试剂量）

阴离子交换树脂 2000g、阳离子交换树脂 2000g、碳酸钙 500g、硫酸 500ml、黑曲霉斜面菌种 3 支、硝酸铵 200g， KH_2PO_4 200g， MgSO_4 250g，蔗糖 2000g， HCl 500ml

四、实验步骤

（1）树脂预处理

分别称取一定量的树脂(阳离子交换树脂和阴离子交换树脂)，清洗漂去杂质，放在交换柱中，先用 1mol/L NaOH ，后用水洗，再用 1mol/L HCl ，最后用水洗至 $\text{pH} \geq 4$ 。每次所用溶液体积为树脂体积的 3 倍，流速的大小为柱截面积，两种树脂的预处理方法相同。

（2）柠檬酸提取

1) 过滤

取发酵液 2 L，趁热过滤，除掉菌丝体等不溶性杂质。取少量滤液，测定柠檬酸含量。

2) CaCO_3 中和沉淀

柠檬酸与 CaCO_3 形成难溶的柠檬酸钙沉淀， CaCO_3 的加量根据滤液中柠檬酸的总量，边搅拌边缓慢加入 CaCO_3 ，以防止产生大量泡沫。 CaCO_3 加完后放置于 85°C 恒温水浴中加热，保温搅拌 30min，趁热过滤，并用沸水洗涤柠檬酸钙沉淀，做柠檬酸钙的无糖检测(见后面的注意事项 2)。

3) 酸解

加入硫酸与柠檬酸钙反应，产生柠檬酸及硫酸钙沉淀，将中和沉淀得到的沉淀物取出，称重，加入 2 倍量的水，调匀然后加热至 85°C ，加入硫酸。硫酸的加量应根据所加入的 CaCO_3 的量来计算。加完硫酸后，继续保温，搅拌 30Min，趁热过滤，得清亮棕黄色的酸解液，取样测定含量。

4) 树脂脱色

取已处理好的树脂 100ml 装入柱中，通入酸解液进行脱色，当出口 pH ≤ 3 时，开始收集，流速为 5ml / min，当出口 pH > 3 时，脱色结束记录下收集液体，取样测定含量。

5) 树脂脱金属离子

取已处理好的树脂 150ml 装入柱中，通入上述收集液，当出口 ≤ 3 时，开始收集，流速为 5ml / min，当出口 pH > 3 时结束。在结束前用乙醇法检测终点，记下收集液总体积，取样测定含量。

6) 真空浓缩

将收集液倒入浓缩器中，真空度为 600~740mmHg (1mmHg=133.322Pa)，水浴温度为 60℃，浓缩约 10 倍后，倒入小烧杯中。

7) 结晶

将盛有浓缩液的小烧杯立即移至 50℃ 恒温水浴中，搅拌结晶，以后控制水浴温度。每小时下降 5℃，终了温度越低越好。结晶完毕后，抽滤，得到柠檬酸成品，称重。测定母液中柠檬酸含量，测定结晶品柠檬酸含量，计算柠檬酸的收率。

(3) 注意事项:

1) 柠檬酸含量测定 在一定量柠檬酸溶液中加入适量的去离子水，加入 2-3 滴酚酞指示剂，然后以 0.1mol / L NaOH 标准溶液滴定，记下体积 v，柠檬酸总量按下式计算。

$$m(\text{g}) = \frac{V_1 \times c_1}{V_2} \times 70 \times V_0$$

式中 v_1 ——0.1mol / L NaOH 标准溶液体积 (ml)

c_1 ——NaOH 标准溶液浓度 (mol / L)

v_2 ——所取柠檬酸样品体积 (ml)

V_0 ——柠檬酸溶液总体积 (L)

2) 柠檬酸钙中糖含量的检测 取柠檬酸钙的洗涤液 20ml，加入一滴 1%-2% 高锰酸钾溶液，3min 后溶液不变色，即说明糖分已洗除。

3) 乙醇法检测离子交换终点 取离子交换液 2ml，加入少量 95% 乙醇，摇匀，如发生浑浊，说明树脂已饱和，应立即停止交换。

五、实验报告要求

实验报告必须包括目的、原理、试验步骤和计算结果。