

S HENGWU GONGYIXUE
SHIYAN ZHIDAO

生物工艺学 实验指导

陈 敏
戴德慧 主 编
高永生



浙江工商大学出版社
ZHEJIANG GONGSHANG UNIVERSITY PRESS

生物工艺学实验指导

主 编 陈 敏 戴德慧 高永生

编委会 陈 敏 戴德慧 高永生 蒋予箭

杨海龙 蒋新龙 严婷婷



浙江工商大学出版社
ZHEJIANG GONGSHANG UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

生物工艺学实验指导 / 陈敏, 戴德慧, 高永生主编.
— 杭州: 浙江工商大学出版社, 2014. 1
ISBN 978-7-5178-0028-6

I. ①生… II. ①陈… ②戴… ③高… III. ①生物工程—实验—高等学校—教材 IV. ①Q81—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 241737 号

生物工艺学实验指导

陈 敏 戴德慧 高永生 主编

责任编辑 王黎明
封面设计 王妤驰
责任印制 汪 俊
出版发行 浙江工商大学出版社
(杭州市教工路 198 号 邮政编码 310012)
(E-mail: zjgsupress@163.com)
(网址: <http://www.zjgsupress.com>)
电话: 0571-88904980, 88831806(传真)
排 版 杭州朝曦图文设计有限公司
印 刷 杭州杭新印务有限公司
开 本 710mm×1000mm 1/16
印 张 19.25
字 数 378 千
版 次 2014 年 1 月第 1 版 2014 年 1 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-5178-0028-6
定 价 38.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江工商大学出版社营销部邮购电话 0571-88804228

目 录

第一部分 综合性实验

综合实验一	柠檬酸发酵技术	003
综合实验二	灵芝发酵制备技术	019
综合实验三	啤酒酿造技术	033
综合实验四	黄酒酿造技术	048
综合实验五	食醋酿造技术	061
综合实验六	味精制备技术	078
综合实验七	酸奶发酵技术	088
综合实验八	抗生素发酵技术	096
综合实验九	红曲色素发酵技术	118
综合实验十	平菇多糖制备技术	132
综合实验十一	淀粉酶发酵制备技术	149

第二部分 开放性实验

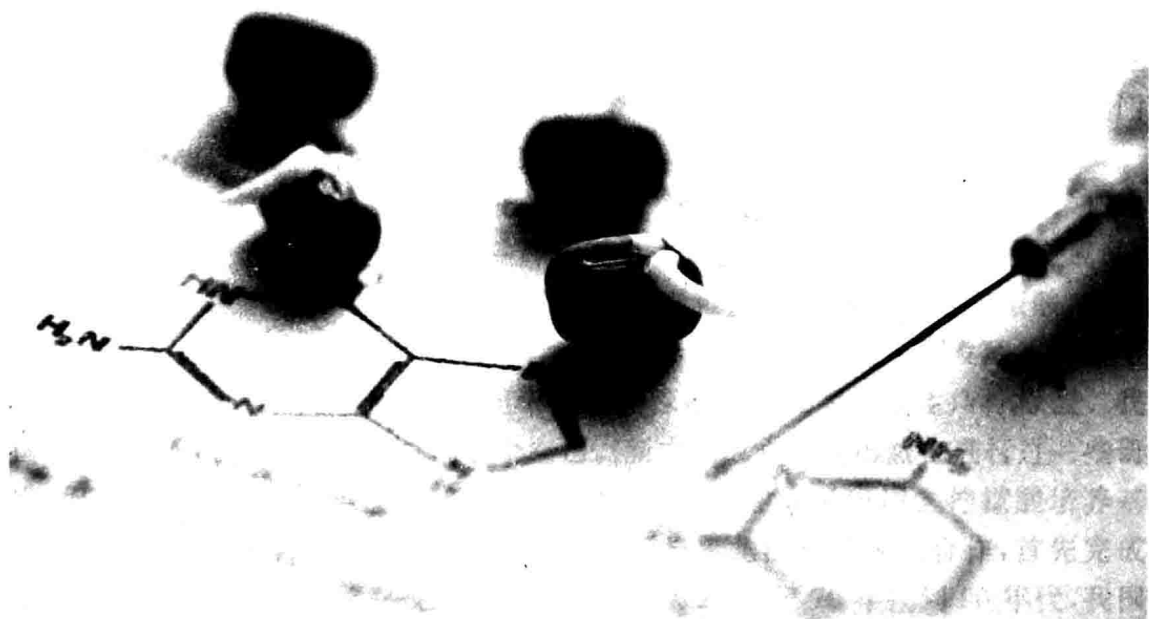
实验一	甜酒酿的制作	167
实验二	豆腐乳的制作	171
实验三	酸奶的制作	177
实验四	城市生活污水的生物处理及 COD/BOD 检测	185

第三部分 附 录

附录 1	国内外主要菌种保藏机构	197
附录 2	发酵工业常用理化分析方法	204
附录 3	双乙酰含量测定方法	249
附录 4	食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌的鉴定	252
附录 5	食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验	262
附录 6	酒精计温度浓度换算表	271

第一部分 综合性实验

生物工艺学实验指导



综合实验一

柠檬酸发酵技术

一、背景知识

(一)柠檬酸的发展概况

柠檬酸(citric acid),学名 2-羟基-丙烷三羧酸,是典型的有机酸,其结构式为:

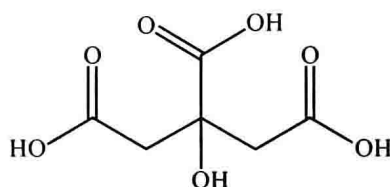


图 1-1-1 柠檬酸结构式

柠檬酸具有令人愉快的酸味,在水中溶解度极高,能被生物体直接吸收代谢。它本身也是化学合成的中间体,因此被广泛应用于食品、化工、医药、纺织、电子、建筑等行业。柠檬酸发酵的原料品种繁多、资源极广,可以说凡是能通过微生物代谢而产生柠檬酸的物质都能作为柠檬酸发酵的原料。

柠檬酸的生产,始自 1784 年 Seheel 从柠檬汁中提出制成了结晶柠檬酸。1891 年 Wehme 从腐败的柑橘中分离出一种丝状真菌,它能使含碳酸钙的糖液变成酸,并分离得柠檬酸。1916 年, Thom 与 Currie 发现很多微生物能产生柠檬酸,并利用黑曲霉工业化生产柠檬酸。1923 年,美国 Pfizer 公司以浅盘表面发酵法大量生产柠檬酸。1951 年,美国 Miles 公司率先采用深层发酵法大规模生产柠檬酸。我国的柠檬酸工业在新中国成立前是个空白。新中国成立初期虽然也进行过一些研究,但进展缓慢。1959 年,国家轻工业部发酵所首先建立了应用含柠檬酸培养基淘汰不耐酸菌株的自然选育法。1968 年,该所与黑龙江和平糖厂合作,首先完成了甜菜糖蜜浅盘表面发酵并投入工业化生产。从 20 世纪 70 年代到 90 年代,我国一直致力于柠檬酸生产菌种的改进,柠檬酸发酵取得了举世瞩目的成就。据统计,2010 年我国柠檬酸产量已达 98 万吨,2011 年柠檬酸产量与上一年基本持平。目前,全国柠檬酸年产能占世界的 70% 左右,年产量占世界的 65% 左右,是全球最大的柠檬酸生产国。国内主要生产企业有安徽丰原集团、湖南银海石化集团、安徽阜阳制药、山东四沙股份及无锡罗氏中亚等。

我国是农业大国,生产柠檬酸的原料资源丰富,发酵指数处于世界前列。但后续的提取工艺和设备比较落后,能耗高,深度开发产品少。近年来,由于柠檬酸生产能力增长过快,市场出现供过于求。再加上技术创新滞后及国际竞争日趋激烈,导致经济效益呈现下滑趋势。

综观当前的柠檬酸发展形势,柠檬酸生产企业应从多种方向上提高自身的竞争力:

不断改进生产工艺,提高产品的质量和档次。

加快产业升级,积极开发下游产品,如柠檬酸钙、柠檬酸醋、柠檬酸铁、柠檬酸二氢铵等。

向有市场潜力的国家和地区扩展。

结合市场需求,积极研发便利型、多功能产品,如柠檬酸和营养甜味剂混合体等。

(二)柠檬酸发酵的生产原理

1940年克雷伯斯提出三羧酸循环学说以来,柠檬酸的发酵机理逐渐被人们认识。研究已经证明,糖质原料生成柠檬酸的生化过程中,由糖变成丙酮酸的过程与酒精发酵相同,即通过E-M途径(双磷酸己糖途径)进行酵解,然后丙酮酸进一步氧化脱羧生成乙酰辅酶A,乙酰辅酶A和丙酮酸羧化生成的草酰乙酸缩合成为柠檬酸并进入三羧酸循环途径。柠檬酸是代谢过程的中间产物。正常的生物细胞内,一般是不会积累柠檬酸的。在发酵过程中,当微生物的乌头酸水合酶和异柠檬酸脱氢酶活性很低,而柠檬酸合成酶活性很高时,才有利于柠檬酸的大量积累。

柠檬酸是生物机体TCA循环的中间代谢物之一,在许多微生物中都可以检测到。但不是所有能产柠檬酸的微生物都可以作为柠檬酸发酵的生产菌种。目前,工业生产柠檬酸几乎都是用黑曲霉作为产生菌。黑曲霉发酵柠檬酸过程中,在发酵初期,发酵液中葡萄糖含量较高,而高浓度的葡萄糖正是黑曲霉 α -酮戊二酸脱氢酶合成的抑制物,这样一来TCA循环就中断了,酸度得到积累(注意此时积累的是酸度而不仅是柠檬酸),但是当酸度积累到 $\text{pH} \leq 2.0$ 时,催化柠檬酸 $\rightleftharpoons$ 顺乌头酸 $\rightleftharpoons$ 异柠檬酸正逆反应的顺乌头酸水合酶失活,有利于柠檬酸积累并排出体外。

为了提高柠檬酸的产量,黑曲霉发酵柠檬酸的过程中需要掌握一定的温度及通风量等条件。一般认为,黑曲霉在 $28 \sim 30^\circ\text{C}$ 时,柠檬酸产率最高,发酵速度较快,温度过低会导致发酵时间延长;温度过高时,虽然初期产酸较快,但是菌体大量繁殖会大量消耗糖以致产酸降低,同时生成较多的草酸、葡萄糖酸。目前,我国已经培养出高温发酵的产酸菌株,可以在 37°C 发酵。柠檬酸发酵要求培养基中有较高的溶解氧。通风和搅拌是增加培养基内溶解氧的主要方法。随着菌体生成,发酵液中的溶解氧会逐渐降低,从而抑制了柠檬酸的合成。采用增加空气流速及搅

拌速度的方法,使培养液中溶解氧达到 60% 饱和度对产酸有利。另外,某些氨基酸、B 族维生素、生物素和金属离子(如锌离子、亚铁离子、铜离子)等也是影响菌种产酸的重要因素。

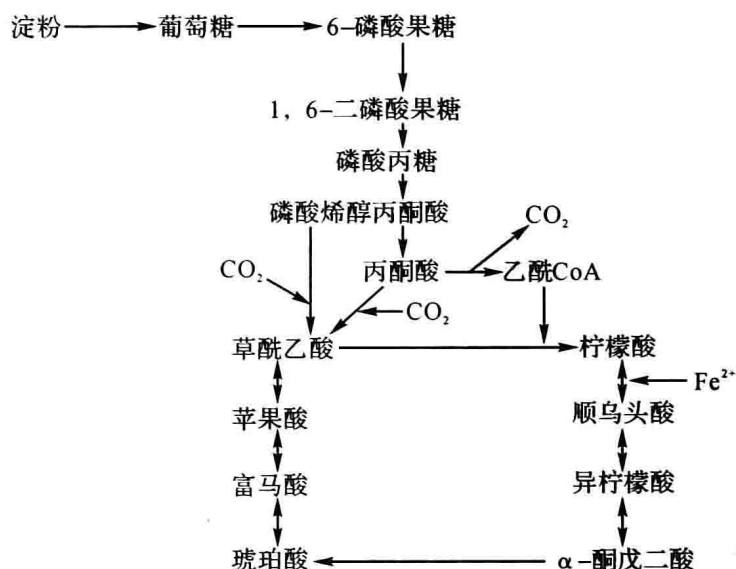


图 1-1-2 柠檬酸生物合成途径

(三)柠檬酸固态发酵的生产工艺

根据培养基物理性状的不同,发酵方式分为两大类:液体发酵和固体发酵。这里着重介绍后一种方法。

固体发酵是指一类使用不溶性固体基质来培养微生物的工艺过程。既包括将固体悬浮在液体中的深层发酵,也包括在没有游离水的湿固体材料上培养微生物的工艺过程。影响固体发酵技术的关键是固态发酵反应器,迄今为止已有许多类型的固体发酵反应器问世。常用的固体发酵反应器主要有以下几种类型:浅盘式反应器、填充床反应器、转鼓式反应器、流化床反应器、盆式反应器、柱式固体反应器、贮仓式固体发酵反应器、搅拌罐式反应器、螺旋推进式反应器、传输带输送盘式反应器及塔式反应器等。目前,固体发酵罐在实验室研究中应用较为普遍。这种反应器结构简单、温度和 pH 值容易控制、能处理胶状和非水溶性底物、原料更换方便。

柠檬酸固体发酵以薯干淀粉或薯渣等为原料,先进行菌种扩大培养后,将菌种与原料通入发酵罐得到柠檬酸发酵液,并通过一系列提取过程得到柠檬酸。其流程图如下:

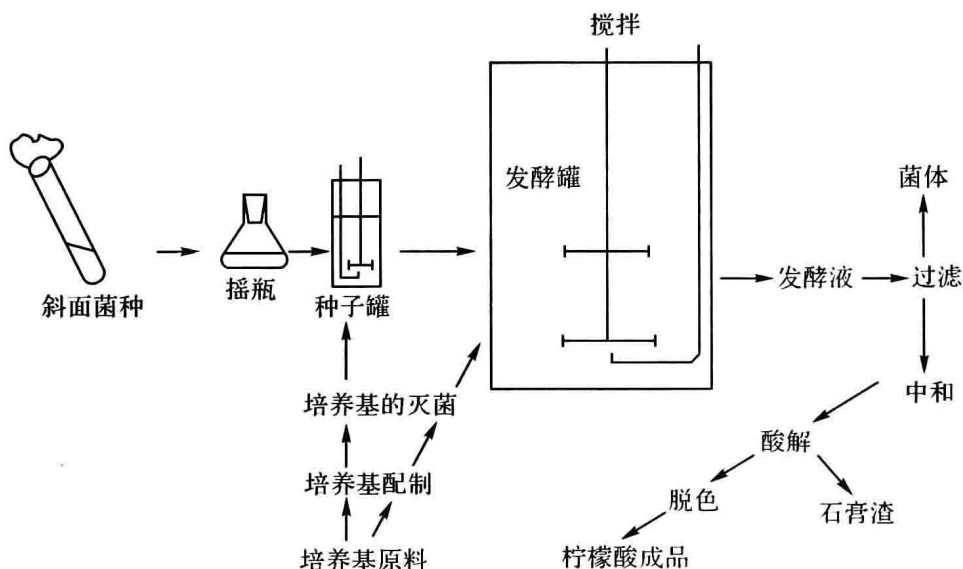


图 1-1-3 柠檬酸固体发酵流程图

(四)固体发酵罐的结构原理与使用操作

1. 发酵罐示意图与管路说明

该流程图中空气管路阀门标号为“AXX”，蒸汽管路阀门标号为“SXX”，冷却水管路阀门标号为“WXX”，冷凝水管路阀门标号为“VXX”，电磁阀标号为“CXX”，物料管路阀门标号为“PXX”，冷冻水管路标号为“CWX”，其他气体管路标号为“NXX”。

(1)空气及其净化

来自空压机的压缩空气经净化器(外接减压稳压器、除水、除尘、空气预过滤器)进入发酵罐空气总管,空气阀 A01、空气流量计、阀 A02、空气过滤器,阀 A03 到达加湿器内或经电磁阀 C02 进入发酵罐底部分布器,尾气经阀 VT1 排出,本管路具有计量、净化作用。

(2)蒸汽

蒸汽进夹套。蒸汽经阀 S01 进入夹套(上进),经阀 V01 排出冷凝水。蒸汽对培养基预热。

蒸汽进反应器。蒸汽经阀 A02、空气过滤器、阀 A03、电磁阀 C02 进入罐内,由排气口控制阀 VT1 排出。蒸汽对过滤器和空气管线消毒。

(3)自来水

自来水进夹套。当电磁阀打开时,自来水经多功能阀、阀 W01 进入反应器夹套(下进),由夹套(上口)、电磁阀 C01 排出;当电磁阀关闭时,夹套水经 W02 进入电加热器、循环泵、单向阀进入夹套(下口),通过夹套水的循环,将加热器的热能带

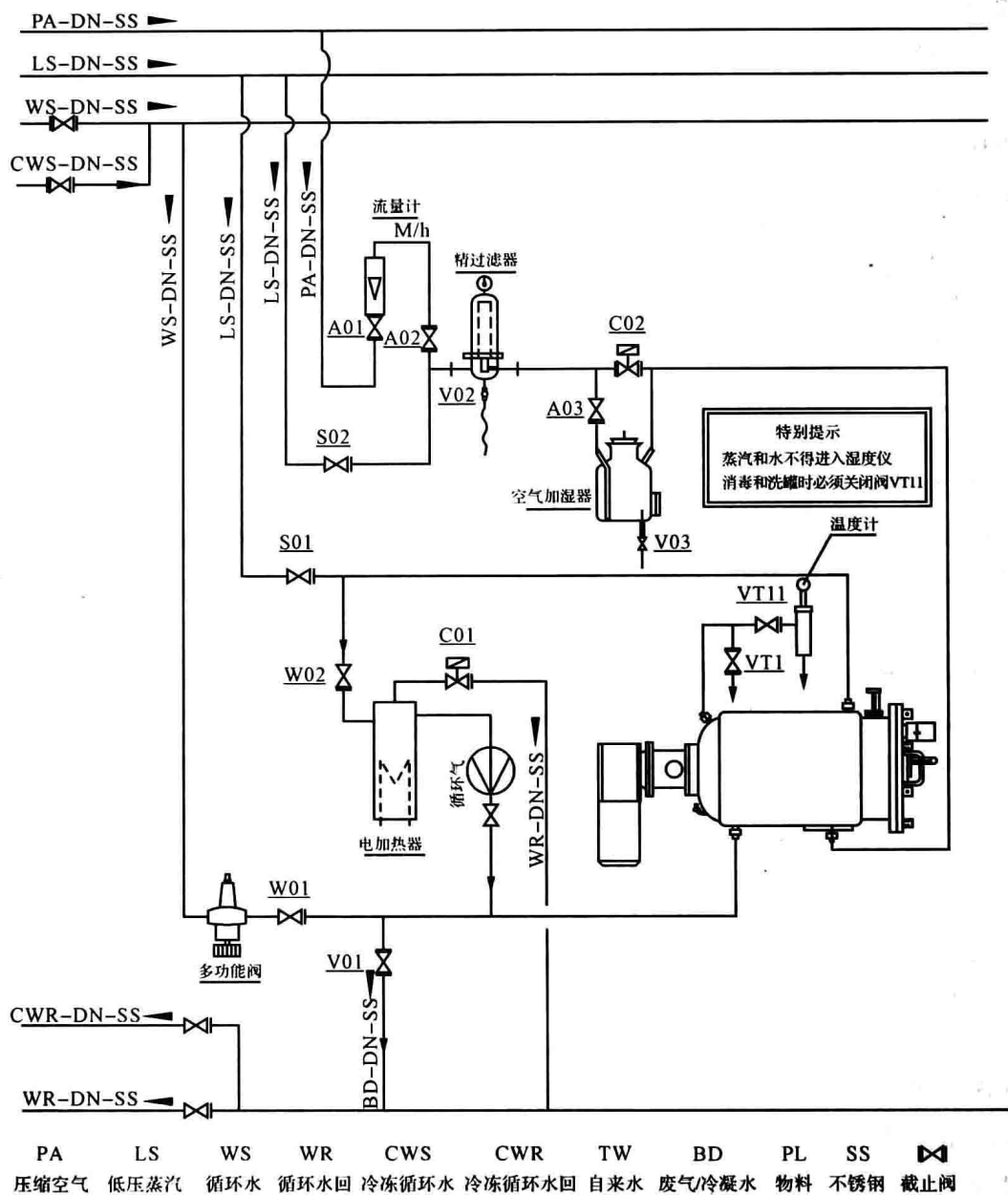


图 1-1-4 固体发酵工艺流程图

人夹套,通过夹套的换热加热发酵液。

自来水进排气冷凝器。自来水经阀 W03 进入排气冷凝器,对发酵尾气进行冷却,以尽可能减少培养基的水分蒸发。

(4) 冷冻水(选配)(消毒后降温应优先采用自来水)

冷冻水经切换阀 T02(关 T01)进入自来水管线,经切换阀 T04(关 T03)返回冷冻水回路。

(5) 纯氧管线(选配)

纯氧管线:纯氧进入流量计、电磁阀 C03、切断 A21 进入空气过滤器。纯氧流

量调节:开 C03、A21 后调节流量计的调节手柄。

(6) 空气流量检测与控制

空气热质量流量计,与空气玻璃转子流量计并联安装,且在热质量流量计前后安装切断阀。热质量流量计内通道必须保持干燥无尘,因此只有在发酵过程中才开质量流量计的前后切断阀 A11、A12,发酵结束后应及时关闭 A11、A12。

(7) 补氨水管线

氨水经电磁阀 C04、切断阀 A31、补料针进入发酵罐,电磁阀由控制器控制。

2. 实罐灭菌操作

(1) 准备工作

盖紧罐盖上各种盖帽,旋紧罐盖,压紧螺栓。

(2) 培养基预热

准备工作。预先启动蒸汽发生器及空气压缩机。将控制器中的温度开关拨向“关”(向下);开排气阀 VT1,关闭其他所有阀门;温度仪不耐高温和不可水浸,消毒前必须关闭排气旁通阀 VT11。

开排气阀 VT1,开夹套冷凝水阀 V01 排夹套水,关闭其他阀门。

启动反应器搅拌电机,调转速 $20\sim 30\text{ r/min}$ 。

蒸汽进夹套(固体物料可以取消本操作)。缓缓开夹套蒸汽阀 S01 蒸汽进夹套。待排水总口排出蒸汽时调节阀 V01,控制蒸汽排出量以有少量蒸汽冒出即可。并控制夹套内压力不超过 0.2 MPa 。当培养基预热至 98°C 时,进入实罐灭菌操作。当培养基温度在 $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ 时,可以适当减慢升温速度,在泵稳定区域可以杀灭大部分微生物。

(3) 实罐灭菌

蒸汽进过滤器。微开过滤器上排冷凝水阀 V02,开过滤器前蒸汽阀 S02,微加湿器底阀排冷凝水阀 V03,缓缓开切断阀 A03,蒸汽经过滤器进入发酵罐,同时在湿度的 Rkc 仪表中,将设定值 SV 设为 0,然后按“SET”键确认。电磁阀 C02 在消毒过程中始终开着,以保证空气管线消毒彻底。冷凝水阀 V02、V03 以有少量蒸汽排出为宜,当排气口有蒸汽排出或罐温达到 100°C , 2 min 后,关闭排气阀 VT1。调节切断阀 A03 和蒸汽阀 S02,维持过滤器前蒸汽压力为 $0.12\sim 0.16\text{ MPa}$,同时必须保证切断阀有一定开度,不得关死。

当达到预定温度或罐压,开排气阀 VT1 至有少量蒸汽排出,关紧或微开夹套蒸汽阀 S01,根据罐压或罐温变化的趋势,及时调整蒸汽阀 S02、S03。阀门调节宜微调,应避免大幅度开关。当反应器罐压或罐温维持在预定的范围内开始计时。

保温阶段应旋松接种口盖至有少量蒸汽冒出。

(4) 灭菌完成及降温

保温结束首先旋紧接种口盖。

关紧冷凝水阀 V03,关紧过滤器前蒸汽阀,全开空气阀 A01、A02,用空气吹过过滤器,当过滤器冷凝水阀 V02 排尽冷凝水后就可以关闭。

关夹套蒸汽阀 S01 和夹套排冷凝水阀 V01,开夹套进水阀 W01 和循环水阀 W02。将温度控制开关拨向“开”,并在控制仪上设定控制温度值,温度自动控制,发酵罐进入自动降温。

在降温过程中,始终监视罐压,严禁压力到零。当温度达到工艺要求时,调节搅拌转速、空气流量、罐压。

3. 发酵操作流程

(1) 准备

(2) 接种

摇瓶接种:调节进气量至 0.2VVM,开排气阀 VT1 至罐压接近 0(不得大于 0.02 MPa),预先旋松接种口,在接种口处放好火焰圈并点燃(在火焰圈中放置少量的棉花可以助燃提高火焰的高度),打开接种口,导入种子,然后旋紧接种盖,立即调高罐压。

发酵初始化:在控制器的发酵罐状态画面输入“发酵批号”,再按“就绪”或“开始”并“确认”,发酵数据才能自动保存。设定发酵过程参数及适宜的控制模式。

(3) 湿度控制

关阀 A03,将经灭菌消毒的补水瓶及输液管放置底座上,用硅胶管将补水瓶上的呼吸过滤器与空气经过滤器阀 V02 连通。

旋下加湿器补料口上闷头,用酒精棉球对补料口内橡胶塞外表面消毒,然后将针头插入并穿透密封盖,并用补料针上的螺母锁紧。

开输液管上的弹簧夹,缓缓开阀 V02 将无菌水压入加湿器内。关阀 V02,拔出针头,盖紧补料口上闷头。

湿度控制。在控制器空气子画面上设定,F1:空气 50~100(说明:这里的“空气”实际是“湿度”,单位 L/min 应为%),F2:控制方式为“自动”,开阀 A03。当湿度低于设定值时电磁阀自动关闭,空气进入加湿器。当湿度高于设定值时,电磁阀自动打开,大量空气经电磁阀直接进入发酵罐。

开排气阀 VT11,关 VT01。

(4) 取样

取样器:开罐盖 N09 口上闷头,将取样管垂直于罐盖插入罐内(建议取样时关闭搅拌器),抽出取样管,盖紧上闷头。

(5) 发酵开始前设定发酵参数

(6) 放料

(7) 发酵结束

发酵结束必须在控制器的发酵罐状态画面按“正在发酵”并“确认”。发酵数据

自动整理并保存。

(8) 搅拌正反转设定

在时间比例控制器拨动数字盘设定正转时间、反转时间,拨动数字盘上端的时间单位;M—分钟,S—秒。设定完成后,打开时间比例控制器右侧的控制开关(向右开,向左关),任何一次设定后必须重新开关“控制开关”。

二、实验简介

本实验分为三部分,第一部分为柠檬酸的固态发酵,第二部分为柠檬酸的提取与纸层析,第三部分为柠檬酸的液相色谱分析。实验涵盖了目前柠檬酸发酵的主要工艺技术以及柠檬酸检测分析的基本方法,通过这三部分内容的学习和实践,可为今后从事柠檬酸的发酵生产奠定理论和实践基础。

实验 1-1 柠檬酸的固体发酵

(一) 实验目的

1. 了解黑曲霉发酵生产柠檬酸的原理。
2. 掌握固体发酵罐的发酵过程及控制方法。
3. 测定黑曲霉培养过程中还原糖含量、总糖含量、pH 值、总酸含量及柠檬酸含量的变化。

(二) 实验原理

黑曲霉是柠檬酸发酵的主要菌种。其存在糖酵解途径(EMP)、磷酸戊糖途径(HMP)、三羧酸循环(TCA)和乙醛酸循环的酶系。黑曲霉用糖类产生柠檬酸的生物合成途径:首先,黑曲霉利用 α -淀粉酶、糖化酶将薯干粉等物质中的淀粉转变为葡萄糖,葡萄糖经 EMP 或 HMP 降解,形成丙酮酸;丙酮酸一方面氧化脱羧生成乙酰辅酶 A,另一方面经二氧糖羧化成草酰乙酸;草酰乙酸与乙酰辅酶 A 缩合生成柠檬酸。

(三) 实验材料

1. 材料

玉米粉、黑曲霉(*Aspergillus niger*)2333 等。

2. 试剂

去离子水、 α -淀粉酶、 CaCl_2 、碘液、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等。

3. 主要设备

接种环、三角瓶、立式压力灭菌器、恒温培养箱、摇床、离心机、水浴锅、铁架台、显微镜、固体发酵罐等。

(四) 实验方法与步骤

1. 种子培养

15 g 玉米粉与 100 mL 去离子水混匀, 调节 pH 至 5.5~6.0, 加热并搅拌至 65 °C, 按 20 U/g 原料加入 α -淀粉酶及 1 g/L CaCl_2 , 搅拌均匀, 恒温保持 60 min, 液化 15 min 后用 0.1% 碘液检测, 不显蓝色或极微淡蓝色为止, 即为糖化完全, 四层纱布过滤于 250 mL 三角瓶, 即得糖化清液。300 mL 摇瓶中加入 50 mL 糖化清液, 并加入 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 后, 121 °C 灭菌 20 min。待冷却至室温, 用酒精灯烧过的接种环轻轻刮下黑曲霉孢子, 接种到已冷却的种子培养基中, 恒温 35 °C、200 r/min 摇床培养 24 h 左右, 即得菌液。取培养液稀释后在显微镜下计数, 计算出黑曲霉菌丝球浓度, 一般可达 6.0×10^5 个/mL~ 1.0×10^6 个/mL。合格的菌丝球应是致密型的, 菌丝短且粗, 分支少, 瘤状, 部分膨胀。

2. 发酵培养

900 g 玉米粉, 加入 6 L 去离子水, 调节 pH 至 5.5~6.0, 加入 10 L 发酵罐中, 按 20 U/g 原料加入 α -淀粉酶及 1 g/L CaCl_2 , 搅拌均匀, 恒温保持 30~60 min, 液化 20 min 后用 0.1% 碘液检测, 不显蓝色或极微淡蓝色为止, 再加入 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 封罐。蒸汽实罐灭菌后冷却至 35 °C, 火焰法接入菌种, 按接种量为 10% 接入罐内, 400 r/min, 恒温 35 °C, 通空气发酵, 罐压控制在表压 0.1 MPa。通风量控制 400~800 L/h。当发酵罐酸度不再上升, 3~5 天后即可放罐。接种后, 每 24 h 取发酵液一次, 测定菌体浓度、残糖、酸度、pH 值。

3. 各项指标测定方法

菌体浓度: 参见附录 2-12。

残糖测定: 参见附录 2-14。

酸度测定: 参见附录 2-5。

pH 值测定: pH 值测定方法, 用发酵罐 pH 电极直接测定。

(五) 实验结果与分析

1. 做好柠檬酸发酵实验记录。

表 1-1-1 柠檬酸发酵实验记录

发酵时间(h)	0	24	48	72	96
菌体浓度					
残糖					
pH 值					
溶氧					

2. 思考影响黑曲霉发酵生产柠檬酸的因素有哪些。

(六) 实验注意事项

1. 注意 pH 值变化,当 pH 值降至 2.0 左右时,加入一定量的灭菌碳酸钙乳剂,使 pH 值回升至 2.2 左右时,有利于糖化作用,促进产酸。
2. 需通过发酵罐控制面板了解溶解氧变化情况,调节通气和搅拌的强度(前期通风量低些对糖化有利,后期适当增加风量)促进产酸。

实验 1-2 柠檬酸的提取与纸层析

(一)实验目的

1. 学习柠檬酸提取方法。
2. 学习柠檬酸的鉴定方法——纸层析法。
3. 掌握柠檬酸含量的测定方法。

(二)实验原理

成熟的柠檬酸发酵醪中,除含有主产物柠檬酸之外,还含有纤维、菌体、有机杂酸、糖、蛋白类胶体物质、色素、矿物质及其他代谢产物等杂质,它们或来自发酵原料,或在发酵过程中产生,或溶存或悬浮于发酵醪中。要制备结晶柠檬酸必须设法除去这些杂质。

分离纯化过程主要涉及几方面:过滤除去发酵液中菌丝体,原料残渣及其他固形物质;通过理化方法除去柠檬酸以外的杂质,初步纯化柠檬酸;得到精制的柠檬酸。

提取柠檬酸的方法主要有钙盐离子交换法、液-液萃取法、全离子交换法、电渗析提取法、连续离子交换法以及色谱分离法(ILCS)。

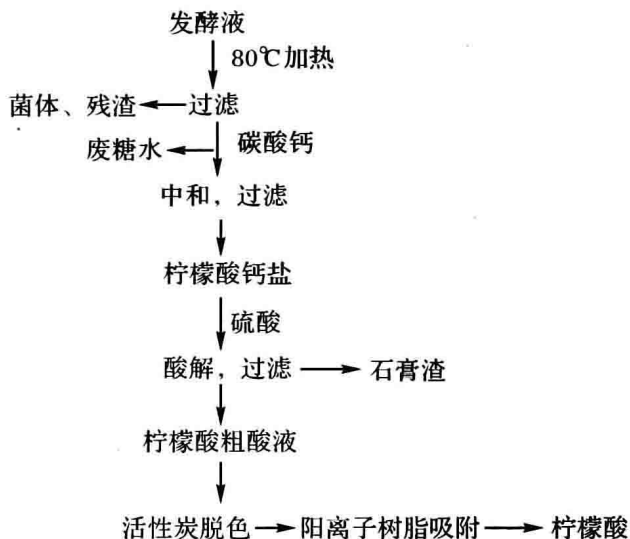


图 1-1-5 钙盐法提取柠檬酸流程图

目前,柠檬酸提取普遍采用的是钙盐离子交换法。碳酸钙可与发酵液中的柠檬酸发生中和反应,生成难溶性的柠檬酸钙沉淀,柠檬酸钙在 80~90℃ 时溶解度极低,通过过滤或离心可将其与糖、蛋白质、其他有机酸、无机离子等可溶性杂质分开。在柠檬酸钙沉淀中加入硫酸,在 80~90℃ 反应,生成柠檬酸和硫酸钙沉淀,硫酸钙在 80℃ 左右时溶解度极低,趁热过滤或离心可将其与柠檬酸分开,获得较纯净的柠檬酸解液。此法总收率可达到 80%~90%,且操作简单,易掌握。

纸层析法依据极性相似相溶原理,是以滤纸纤维的结合水为固定相,而以有机溶剂作为流动相。由于样品中各物质分配系数不同,因而扩散速度不同,从而达到分离的目的。试样经层析后可用比移值(R_f)表示各组成成分的位置,由于影响比移值的因素较多,因此一般采用在相同实验条件下对照物质对比以确定其异同。作为单体鉴别时,试样所显主色谱斑点的颜色(或荧光)与位置,应与对照(标准)样所显主色的谱斑点或供试品-对照品(1:1)混合所显的主色谱斑点相同。作为质量指标(纯度)检查时,可取一定量的试样,经展开后,按各单体的规定,检视其所显杂质色谱斑点的个数或呈色(或荧光)的强度;作为含量测定时,可将色谱斑点剪下洗脱后,再用适宜的方法测定,也可用色谱扫描仪测定。

$$\text{比值}(R_f) = \frac{\text{原点中心至色谱斑点中心的距}}{\text{原点中心至流动相前沿的距}}$$

(三)实验材料

1. 样品

柠檬酸固态发酵产物。