



天津市高校“十五”规划教材

生物工程专业实验

贾士儒 主 编



中国轻工业出版社

天津市高校“十五”规划教材

生物工程专业实验

贾士儒 主编

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物工程专业实验/贾士儒主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2004.7

天津市高校“十五”规划教材

ISBN 7-5019-4390-7

I. 生… II. 贾… III. 生物工程-实验-高等学校-教材 IV. Q81-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 051907 号

责任编辑: 白洁 姚怀芝 责任终审: 劳国强 封面设计: 邱亦刚
版式设计: 铎声 责任校对: 李靖 责任监印: 吴京一

出版发行: 中国轻工业出版社(北京东长安街6号, 邮编: 100740)

印刷: 天津新华印刷一厂

经销: 各地新华书店

版次: 2004年7月第1版 2004年7月第1次印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 13.5

字数: 340千字

书号: ISBN 7-5019-4390-7/Q·019 定价: 25.00元

读者服务部邮购热线电话: 010—65241695 85111729 传真: 85111730

发行电话: 010—88390721 88390722

网址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: Club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

30367J1X101ZBW

前 言

生物技术是一门多学科、综合性的科学技术。生物工业是生物技术领域中的重要分支之一，是以在受控条件下利用生命过程本身作为产品生产和加工的手段，由此产生数以千万计的产品，形成新的现代工业。与之相对应的生物工程专业学生在学习过程中，往往由于缺乏相关的实验技能方面的教科书，使之对于相关知识的学习非常困难。没有理论的实践是盲目的，没有实践的理论则是无意义的，而以理论为基础的实践才会有真正的进步。由于实践机会的不足，生物工程专业的学生往往在毕业时感到动手能力和实际专业技能知识的缺乏。出版《生物工程专业实验》一书，正是为了与生物工程专业教学相配合，通过实践教学，培养学生的理论联系实际、实事求是的学风和分析、解决问题的能力，掌握基本的专业实验技术和操作技能，提高自学能力、独立思考和创新能力。

本书是天津市教育委员会批准的“十五”重点教材之一，是在本人主编的《生物工艺与工程实验技术》教材的基础上，由天津大学、中国农业大学、齐齐哈尔大学、河北科技大学、山东轻工业学院、大连轻工业学院和天津科技大学等单位的专业教师共同完成。

全书分三部分：专业实验基础、专业实验和附录。专业实验基础部分简要叙述了实验室的安全和环保、实验方案的确定与实施、实验技术与设备以及实验数据的处理与分析，这部分内容可采取自学的方式进行，或结合实验一同学习，也可利用较短时间（如4~6学时）重点讲述主要内容。专业实验部分是本书的核心内容，包括过程参数的检测技术，生物培养技术，生物过程控

制, 酶工程实验, 生物物质的分离、提取和精制实验及生物工业三废的处理实验等内容。考虑到分子生物学对生物工业的渗透, 书中安排了部分现代生物技术实验。本书采用了针对一个问题设计一个实验的方法, 共有 73 个实验。考虑到各院校实际情况不同, 可从这些实验中选取部分实验使用。也可根据需要, 按照工艺过程或单元的形式组成大的生物工程实验, 例如, 将糖化酶发酵、提取、糖化酶的固定化和利用固定化糖化酶生产葡萄糖等实验组成一个大实验, 这对于有些院校采取集中时间进行专业实验时很有必要。

由于本书是第一本关于生物工程专业实验技能方面的教材, 在编写过程中注意强调实验研究过程的多种能力和素质的培养与训练、增强创新意识。在实验内容上涉及的面比较宽; 从层次上强调了实验预习, 对实验过程进行了较为细致的叙述。实验报告部分注意了思考题的提出, 以便于学生学习。另外, 为扩大学生的视野, 在部分实验的后边增加了一些补充内容。附录部分为生物工艺与工程方面的部分常用数据, 以便于实验中查找。

本书由天津科技大学贾士儒主编, 白姝、刘晓兰任副主编, 范志华、张凯瑞协助审阅了部分稿件。各章节的编写人员如下: 第 1 章刘树中、贾士儒, 第 2 章刘晓兰、刘树中、贾士儒, 第 3 章江洁、贾士儒, 第 4 章孙君社、贾士儒, 第 5 章高年发、宋文军、肖冬光、刘晓兰、江洁、赵树欣、李政, 第 6 章程殿林、赵华、李颖宪, 第 7 章江洁、赵树欣、马霞、贾士儒、白姝、刘晓兰、徐旭、阮南, 第 8 章贾士儒、严新忠, 第 9 章殷丽君、白姝、贾士儒, 第 10 章张秀清、苏建宇, 第 11 章宋文军, 第 12 章肖本益、孙玉梅、贾士儒, 附录范志华。

徐旭还帮助进行了部分文字核对与插图的打印工作。在此, 对本书给予热心帮助和支持的同志表示衷心感谢。本书在编写过程中还参考了国内外同行、专家和学者的科研成果与著作, 在此一并表示感谢。

本书中很多内容源自作者的教学实践和科研工作，部分内容源自有关发酵工艺学专业书籍，不妥之处，衷心地希望读者给予指教，使之日臻完善。

编者

目 录

第 1 章 实验室安全与环保	1
1.1 实验室安全知识	1
1.1.1 实验室常用危险品及其预防措施	1
1.1.2 水、电、蒸汽的正确使用	2
1.1.3 高压容器的正确使用	4
1.1.4 实验室的防火与防爆	5
1.2 实验室环保知识	7
1.3 生物安全性	8
第 2 章 实验方案的确定与实施	12
2.1 实验方案的确定原则	12
2.2 实验内容的确定	13
2.3 实验设计	14
2.4 微生物培养条件的优化	17
2.4.1 微生物实验的优化方法	17
2.4.2 SAS 统计软件简介	18
2.4.3 SAS 统计软件在微生物培养条件优化中的应用方法	18
2.5 实验的实施	25
2.5.1 生物反应设备及其使用	25
2.5.2 分离与精制设备及其使用	31
2.5.3 测试设备及其使用	35
2.5.4 辅助设备及其使用	40
第 3 章 实验数据处理与分析	45
3.1 实验数据的误差分析	45
3.1.1 误差的种类及其产生的原因	45

3.1.2 误差的表示方法	46
3.2 实验数据的处理	51
3.2.1 有效数字及其应用	51
3.2.2 可疑测定值的舍弃	54
3.2.3 显著性检验法	56
3.3 实验报告的撰写	59
3.3.1 实验记录	59
3.3.2 实验报告	60
第4章 生物工艺过程参数检测与控制	63
4.1 菌体量的测定	63
4.1.1 微生物菌体量的测定实验	63
4.1.2 微生物菌体密度的测定	73
4.2 容积氧传递系数的测定	76
4.2.1 亚硫酸盐法测定容积氧传递系数	77
4.2.2 动态法	80
4.3 发酵液的黏度与混合特性的测定	86
4.3.1 发酵液黏度的测定	86
4.3.2 搅拌功率的测定	94
4.3.3 混合特性参数的测定	99
4.4 其他混合参数的测定	101
4.4.1 混合时间的测定	101
4.4.2 连续搅拌式发酵罐中的停留时间分布	103
4.5 不同生化反应器的使用方法	105
4.5.1 机械搅拌罐培养大肠杆菌的使用	105
4.5.2 气升式生化反应器的使用	109
4.5.3 中试发酵设备的使用方法	110
第5章 发酵工艺实验	114
5.1 抗生素发酵实验	114
5.1.1 抗生素发酵	114

5.1.2 有机溶剂萃取抗生素	118
5.2 代谢工程实验——抗结构类似物突变株的选育	120
5.3 黑曲霉发酵生产柠檬酸	125
5.3.1 柠檬酸发酵	126
5.3.2 钙盐-离子交换法提取(分离提纯)柠檬酸	130
5.4 谷氨酸发酵	137
5.4.1 淀粉水解糖的制备	137
5.4.2 谷氨酸发酵实验	139
5.4.3 谷氨酸的提取与精制	141
5.5 酵母发酵实验	144
5.5.1 糖蜜处理实验	144
5.5.2 酵母流加培养实验	146
5.6 发酵法生产黄原胶	150
5.7 发酵法生产纳他霉素	152
5.8 裂褶菌发酵生产裂褶胞外多糖	156
第6章 酿造工程实验	161
6.1 酱油酿造实验	161
6.2 食醋酿造实验	166
6.3 葡萄酒的酿制	170
6.4 淀粉质原料酒精连续发酵实验	181
6.5 酒精蒸馏实验	182
6.6 白酒酿造	185
6.7 啤酒酿造	189
6.7.1 糖化麦芽汁的制备	189
6.7.2 啤酒发酵及检测	191
第7章 酶工程实验	195
7.1 糖化酶发酵	195
7.2 糖化酶提取	198
7.3 酶促反应动力学参数的测定	200

7.4	酶促反应的连续操作技术	211
7.5	酶的固定化实验	216
7.5.1	固定化酶及其基本概念	216
7.5.2	糖化酶的非共价结合法固定化	220
7.6	应用固定化糖化酶生产葡萄糖	227
7.7	菌体转化实验	235
7.8	微生物细胞的固定化实验 (α -半乳糖苷酶菌体 细胞的固定化)	240
7.9	生物传感器的制作及其葡萄糖浓度的测定	244
第 8 章	发酵过程控制	255
8.1	过程动态特性及温度控制	255
8.2	发酵过程溶解氧浓度的控制	263
8.3	微生物发酵过程的实时预估控制	267
8.4	神经网络技术在发酵过程中的应用	274
第 9 章	生物产品分离技术	285
9.1	发酵液的预处理与滤饼质量比阻的测定	285
9.2	大肠杆菌细胞的超声波破碎	286
9.3	蛋白质溶液的凝胶层析脱盐	288
9.4	核苷酸的离子交换层析	289
9.5	胰蛋白酶的亲和层析	292
9.6	液相层析法分离蛋白质	295
9.7	错流微滤法回收酶	304
9.8	膜分离法精制浓缩酶	314
第 10 章	细胞工程实验	320
10.1	原生质体融合	320
10.2	动物细胞培养	322
10.3	植物组织培养	325
第 11 章	现代生物技术实验	328
11.1	微生物转化	328

11.2	转导	332
11.3	质粒 DNA 的快速制备	334
11.4	凝胶电泳	337
11.5	Southern 印记杂交及菌落杂交	339
11.5.1	Southern 印迹法	339
11.5.2	菌落杂交法或斑点杂交法	342
11.6	DNA 标记(缺口平移、末端标记、同聚物加尾)	344
11.6.1	缺口平移法	344
11.6.2	末端标记法	345
11.6.3	同聚物加尾	346
11.7	真核 mRNA 的制备和 cDNA 的合成	349
11.7.1	真核 mRNA 的制备	349
11.7.2	互补链 DNA (cDNA) 的合成	352
11.8	目的基因的克隆	354
11.9	DNA 文库的建立	356
11.10	体外诱变	361
第 12 章	环境工程技术	365
12.1	溶解氧的测定	365
12.2	化学需氧量的测定	368
12.3	生化需氧量的测定	372
12.4	UASB 反应器的启动与运行	376
12.5	固体废料的资源化利用	383
12.6	生物法净化有机废气	386
附录		391
参考文献		415

第1章 实验室安全与环保

实验室潜在各种危害因素。这些危害因素可能引发出各种事故，造成环境污染和人体伤害，甚至危及到人的生命安全。因此我们不但要学习实验室安全技术和环境保护方面的有关知识，而且应该在实验中加以应用，防患于未然。

1.1 实验室安全知识

1.1.1 实验室常用危险品及其预防措施

生物工程专业实验室可能会遇到的易燃、易爆及有毒物质如下：

可燃气体，如氢气、甲烷、乙烯、煤气、液化石油气、一氧化碳等；

可燃液体，如乙醚、丙酮、汽油、苯、乙醇等；

可燃性固体，如木材、油漆、石蜡、合成纤维等，化学药品有五硫化磷、三硫化磷等；

爆炸性物质，如过氧化物、氮的卤化物、硝基或亚硝基化合物、乙炔类化合物等；

自燃物质，如磁带、胶片、油布、油纸等；

遇水燃烧物质，如活泼金属钾、钠、锂及其氢化物等；

混合危险性物质，如强氧化剂（重铬酸盐、氧、发烟硫酸等）、还原剂（苯胺、醇类、有机酸、油脂、醛类等）；

有毒物品，如窒息性毒物（氮、氢、一氧化碳等）、刺激性毒物（酸类蒸气、氯气等）、麻醉性或神经毒物（芳香类化合物、醇类化合物、苯胺等）；

其他无机及有机毒物（如菌种诱变剂亚硝基胍等）和不能归

入上述类型的有毒物质。

表 1-1 给出了几种常用的有毒物质在空气中的最高允许浓度。为防止毒物侵入人体，关键要把好皮肤、消化道、呼吸道三条可能直接与毒物接触的途径。使用有毒物时要准备好或戴上防毒面具、橡皮手套，有时要穿防毒衣装。实验室内严禁吃东西，离开实验室应洗手，特别应注意对可能被污染的面部或身体进行认真清洗。采用通风、排毒、隔离等安全防范措施。尽可能用无毒或低毒物质替代高毒物质。实验装置尽可能密闭，防止冲、溢、跑、冒事故发生。凡是某种物质侵入人体而引起局部或整个机体发生障碍，即发生中毒事件时，应在现场作一些必要处理，同时应尽快送医院或请医生来诊治。

表 1-1 几种常用的有毒物质在空气中的最高允许浓度

单位: mg/m^3

物质名称	最高允许浓度	物质名称	最高允许浓度
一氧化碳	30	酚	5
氯	2	乙醇	1500
氨	30	甲醇	50
氯化氢及盐酸	150	苯乙烯	40
硫酸及硫酐	10	甲醛	5
苯	500	四氯化碳	5
二甲苯	100	溶剂汽油	350
丙酮	400	汞	0.1
乙醚	500	二硫化碳	10

1.1.2 水、电、蒸汽的正确使用

生物工程实验室中如何保证正确使用水、电、蒸汽，不仅关系到实验的正常进行，而且关系到人体安全。

生物工程实验室中不论是培养基制备与杀菌，还是生物制品发酵与提取过程，一刻也离不开水。实验中除了应注意节约用水外，也应注意正确的使用，应根据不同的用途选择自来水、蒸馏

水、纯净水或重蒸水。实验室供水压力会因使用设备的不同有不同要求。小型发酵罐的供水压力在 $1 \times 10^5 \text{ Pa}$ ，而中试规模的发酵罐的供水压力在 $5 \times 10^5 \text{ Pa}$ 。另外，生物实验中会产生大量废水，冷却水可以直接排放，有毒废水应按照有关规定进行处理。

电的不正确使用会造成较大的伤害，甚至危及生命。电流量和电压大小对人体的影响见表 1-2 和表 1-3。电气设备要接地线，一般要用三眼插座，安装漏电保护装置，严禁用潮湿的手接触电器按钮。一般不带电操作，在特殊情况下带电操作时，必须穿上绝缘胶鞋及戴橡皮手套等防护用具；一般规定其动作电流不超过 30mA，切断电源时间应低于 0.1s。实验室内严禁随意拖拉电线。使用马弗炉等设备时，应由专人负责。

当发生触电事故时，应迅速切断电源，如不能及时切断电源，应立即用绝缘的东西使触电者脱离电源。在将触电者移至适当地方后，及时解开衣服，使全身舒展，并立即找医生进行处理。如触电者已处于休克状态等危急情况下，应立即实施人工呼吸及心脏按摩，直至救护医生到现场。

表 1-2 电流量对人体的影响 (50 ~ 60Hz 交流电)

电流量 /mA	对人体的影响	电流量 /mA	对人体的影响
1	略有感觉	20	肌肉收缩，无法自行脱离触电电源
5	相当痛苦	50	呼吸困难，相当危险
10	难以忍受的痛苦	100	大多数致命

表 1-3 电压对人体的影响

电压/V	接触时对人体的影响	备 注
10	全身在水中，跨步电压界限为 10V/m	
20	为湿手的安全界限	

续表

电压/V	接触时对人的影响	备 注
30	为干燥手的安全界限	
45	为对生命没有危险的界限	
100 ~ 200	危险性极大, 危及到人的生命	
3000	被带电体吸引	最小安全距离 15cm
> 10000	有被弹开而脱险的可能	最小安全距离 20cm

生物实验室中使用蒸汽的地方主要有原位自控发酵罐的杀菌、培养基的高压蒸汽灭菌和大型发酵罐的温度控制等。如果实验室位于发酵工厂附近, 可以向工厂购买配套装置。实验室内的蒸汽管路系统应具有防护套, 外封套最好以镀锌套覆盖以使其美观、易于清洗并防止套封材料变湿。

空气在生物实验室中具有多种用途, 除用于向发酵罐通风外, 还用于气体分析仪器的校准等。

1.1.3 高压容器的正确使用

高压容器一般可分成固定式和移动式两大类。常用的固定式容器有高压反应釜、超临界提取装置等。移动式压力容器主要是压缩气瓶及液化气瓶等。压力容器的等级分类见表 1-4。

表 1-4 压力容器等级分类

类 别	工作压力 p/MPa	类 别	工作压力 p/MPa
低压容器	$0.1 \leq p < 1.6$	高压容器	$10 \leq p < 100$
中压容器	$1.6 \leq p < 10$	超高压容器	$p \geq 100$

气瓶一般由无缝碳素钢或合金钢制成, 适用于装介质压力在 15MPa 以下的气体或常温下与饱和蒸汽压相平衡的液化气体。由于介质流动性大, 因此容易引发事故。

各类钢瓶按所充气体不同涂有不同的标记, 有关特征见表 1-5。氧气瓶、可燃气体瓶应避免日晒, 不准靠近热源, 离配电源至少 5m。室内严禁明火, 氧气瓶阀门及减压阀严禁粘附油脂。钢瓶应直立放置并加固。搬运钢瓶应套好防护帽, 不得摔倒和撞击, 防止撞断阀门引发事故。氢、氧减压阀由于结构不同, 丝扣相反, 不准改用。开启钢瓶时, 操作者应侧对气体出口处, 在减压阀与钢瓶接口处不漏的情况下, 应首先打开钢瓶阀, 然后调节减压阀。关气应先关闭钢瓶阀, 放尽减压阀中余气, 再松开减压阀螺杆。钢瓶内气体(液体)不得用尽, 低压液化气瓶余压在 0.3~0.5MPa 内, 高压气瓶余压在 0.5MPa 左右, 防止其他气体倒灌。领用高压气瓶(尤其对可燃、有毒的气体)时应先通过感官和异味来检查是否泄漏, 对有毒气体可用皂液(氧气瓶不可用此方法)及其他方法检查钢瓶是否泄漏。使用时如发生泄漏, 应关紧钢瓶阀, 注明漏点, 并由专业人员处理。

表 1-5 常用钢瓶的特征

气体名称	瓶身颜色	标字颜色	装瓶压力/MPa	状态	性质
氧气瓶	天蓝色	黑	15	气	助燃
氢气瓶	深绿色	红	15	气	可燃
氮气瓶	黑色	黄	15	气	不燃
氩气瓶	棕色	白	15	气	不燃
氨钢瓶	黄色	黑	3	液	不燃(高温可燃)
氯钢瓶	黄绿色	白	3	液	不燃(有毒)
二氧化碳瓶	银白色	黑	12.5	液	不燃
二氧化硫瓶	灰色	白	0.6	液	不燃(有毒)
乙炔钢瓶	白色	红	3	液	可燃

1.1.4 实验室的防火与防爆

生物实验室中可能遇到的部分可燃气体和蒸气的爆炸极限见表 1-6。防燃防爆措施应针对易燃物和易爆物的用量和蒸气浓度

进行有效控制。

表 1-6 部分可燃气体和蒸气的爆炸极限

物质名称	化学式	沸点/℃	闪点/℃	自燃点/℃	爆炸极限	
					上限/%	下限/%
氢	H ₂	-252.3		510	75	4.0
一氧化碳	CO	-192.2		651	74	12.5
氨	NH ₃	-33			27	16
乙烯	CH ₂ =CH ₂	-103.9		540	32	3.1
苯 乙 烯	C ₆ H ₅ CH=CH ₂	145	32	490	6.1	1.1
乙 炔	C ₂ H ₂	-84(升华)		335	32	2.3
苯	C ₆ H ₆	81.1	-15	580	7.1	1.4
乙 苯	C ₆ H ₅ C ₂ H ₅	36.2	15	420	3.9	0.9
乙 醇	C ₂ H ₅ OH	78.8	11	423	20	3.01
异丙醇	CH ₃ CHOHCH ₃	82.5	12	400	12	2
甲 醇	CH ₃ OH	64.7	9.5	455		
丙 酮	CH ₃ COCH ₃	56.5	-17	500	13	
乙 醚	(C ₂ H ₅) ₂ O	34.6	-45	180	48	1
甲 醛	CH ₃ CHO			185	56	4.1

对易燃易爆物品的使用,要做到用多少领多少,不用的要存放在安全地方。使用过程中加强通风,目的在于有效控制易燃易爆物质在空气中的浓度。同时注意设备的密闭性,防止泄漏。另外,应管理好明火及高温表面,在有易燃易爆物质的场所,严禁明火(如:电热板、开式电炉、电烘箱、马弗炉、煤气灯等)及白炽灯照明;严禁在实验室内吸烟;避免摩擦和冲击。严禁各类电气火花,包括高压电火花放电、弧光放电、电接点微弱火花等。

实验室管理人员应了解基本的消防措施,掌握灭火器材的使用方法。当出现火灾时,必须根据火灾的大小、燃烧物的类别及其环境情况选用合适的灭火器材,灭火器材适用情况见表 1-7。通常实验室发生火灾时按下述顺序选用灭火器材:二氧化碳灭火器、干粉灭火器、泡沫灭火器。实验室管理人员在电器发生火灾时应立即切断电源,并进行灭火。在特殊情况下不能切断电源