

Shengwu Gongcheng Zonghe Shiyan

生物工程综合实验

肖 雷 主编



中国矿业大学出版社

China University of Mining and Technology Press

生物工程综合实验

主 编 肖 雷

副主编 姚菁华 邵菊芳

何 环 盘赛昆

中国矿业大学出版社

内 容 简 介

本书全面介绍了生物工程专业学生需要掌握的实验内容和实验处理方法,内容包括实验误差及数据处理、试验设计方法、实验内容和附录。实验内容又分为三个部分,收录了12个生物化学基础实验,15个微生物学实验和17个综合实验,内容基本涵盖了生物工程专业涉及的主要实验以及特色专业实验。

本教材是高等学校生物工程专业实验教材,也可以作为食品、环境、化学、能源化工等专业学生的参考资料,也可供相关科研工作人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物工程综合实验/肖雷主编. —徐州:中国矿业大学出版社,2016.7

ISBN 978 - 7 - 5646 - 3168 - 0

I. ①生… II. ①肖… 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(2016)第 156476 号

书 名 生物工程综合实验

主 编 肖 雷

责任编辑 陈 慧

出版发行 中国矿业大学出版社有限责任公司

(江苏省徐州市解放南路 邮编 221008)

营销热线 (0516)83885307 83884995

出版服务 (0516)83885767 83884920

网 址 <http://www.cumtp.com> E-mail: cumtpvip@cumtp.com

印 刷 徐州中矿大印发科技有限公司

开 本 787×1092 1/16 印张 8.5 字数 212 千字

版次印次 2016 年 7 月第 1 版 2016 年 7 月第 1 次印刷

定 价 18.00 元

(图书出现印装质量问题,本社负责调换)

前 言

实验教学是生物工程专业教学过程中的一个重要环节,在人才培养过程中的地位和重要性越来越突出。生物工程是在生物学、化学和化学工程与技术等学科基础上形成的学科,它不仅涉及宽广的专业知识,而且需要丰富的工程实践经验。生物工程专业的学生要求掌握生物技术及其产业化的科学原理、工艺技术过程的基础理论和工程设计的基本技能,能在生物制药、食品发酵、能源和化工等领域,从事生物技术与工程相关的设计、生产、管理、产品研发、技术服务等工作,可在学校、研究院所从事相关的教学与科研工作。因此,通过实践教学培养学生理论联系实际、实事求是的学风,掌握基本的专业实验技术和操作技能,提高学生的自学能力、独立思考能力和创新能力显得尤为重要。

中国矿业大学生物工程专业自2001年开始生物工程专业实验,包括基础单元操作实验和综合设计性的实验。学生在基础实验过程中,通过对实验基本原理的分析、常规仪器的操作、实验方法的掌握以及实验结果的记录和实验数据的处理等,加强了对理论知识的掌握和实践能力的锻炼。而综合、设计类实验综合运用多种实验手段,强调理论与实验技能的综合,加强对理论知识和基础单元操作的贯通,同时培养学生的团队协作能力,理论联系实际和分析问题、解决问题的综合能力。

本书主要是在生物工程专业教师自编讲义《生物工程专业实验指导》的基础上,参考国内有关高校生物工程相关实验教材编写而成。全书分三部分:实验数据处理、专业实验和附录。实验数据处理包括实验误差原因及处理、实验数据的处理部分方法、试验设计方法等。专业实验部分根据生物工程专业本科生课程设置的要求基本按课程进行编排,内容包括生物化学、微生物学、生物反应工程和生物分离工程等课程的实验。本书由中国矿业大学肖雷、何环、姚菁华、邵菊芳和淮海工学院盘赛昆共同编写,其中第一章由盘赛昆编写,第二章、

第五章由肖雷、何环编写,第三章由姚菁华编写,第四章由邵菊芳编写,全书由肖雷统稿。

本书适合作为生物工程(技术)专业本科实验教学的教材,也可作为相近专业实验教材的参考书。由于生物工程发展迅速和编者自身水平的限制,书中难免存在不妥之处,衷心希望读者提出宝贵意见,以便不断完善。

编 者

2016年5月

目 录

第一章 实验误差及数据处理	1
第二章 试验设计方法	10
第三章 生物化学基础实验	14
实验一 生化实验要求及常用仪器的使用	14
实验二 植物组织中总糖与还原糖含量的测定	16
实验三 蛋白质的性质实验	18
实验四 紫外吸收法测定蛋白质含量	23
实验五 SDS-PAGE 测定蛋白质的分子量	25
实验六 淀粉酶活性的测定	27
实验七 酵母 RNA 的提取及组分鉴定	30
实验八 植物组织中 DNA 的制备	32
实验九 醋酸纤维膜电泳分离核苷酸	34
实验十 小规模制备质粒 DNA 及鉴定	35
实验十一 DNA 的限制性内切酶酶切	38
实验十二 水平式琼脂糖凝胶电泳法检测与分离 DNA	40
第四章 微生物学实验	42
实验组一 微观世界的揭秘之旅	42
实验一 显微镜的结构与基本观察方法	43
实验二 培养过程中的显微观察与应用	45
实验三 霉菌的形态观察	46
实验四 细菌的简单染色和革兰氏染色	46
实验五 放线菌形态观察	48
实验组二 谁动了神灵的祭坛	50
实验六 常用培养基的制备、灭菌与消毒	50
实验七 鹅颈管实验	51
实验八 巴斯德发酵本质学说的验证实验	53
实验九 利用科赫原则开展的污染菌判定实验	54
实验十 橘酒酒精度及芳香成分的检测	55
实验组三 生命活动的根本动力	57

实验十一	酶制剂的应用	57
实验十二	破壁细胞液的催化反应	58
实验组四	微生物的工业化应用	60
实验十三	黑曲霉发酵生产柠檬酸	60
实验十四	以酸治酸 可控的食物变质	61
实验十五	小球藻的自养厌氧培养	62
第五章	综合实验	64
实验一	紫外诱变育种	64
实验二	菌体的呼吸代谢	66
实验三	抗生素效价的生物测定	72
实验四	醋酸杆菌的发酵实验	76
实验五	柠檬酸的发酵调控实验	77
实验六	固定化活性干酵母细胞的制备及活力测定	78
实验七	超滤膜分离性能实验	80
实验八	双水相萃取蛋白质的相图及分配系数	83
实验九	酵母蔗糖酶的分离、纯化	86
实验十	离子交换层析的应用	90
实验十一	β -胡萝卜素和番茄红素的提取分离与测定	92
实验十二	细胞色素 C 的分离纯化	95
实验十三	嗜酸氧化亚铁硫杆菌的生长氧化特性研究	99
实验十四	嗜酸氧化亚铁硫杆菌脱除煤中硫的研究	101
实验十五	煤炭生物脱硫影响因素的研究	102
实验十六	白腐真菌降解褐煤研究	105
实验十七	白腐真菌产褐煤降解相关胞外酶的活性研究	107
参考文献		110
附录		111
附录 1	实验课的基本程序	111
附录 2	考马斯亮蓝法测蛋白质含量	112
附录 3	库仑滴定法测定全硫	113
附录 4	常用正交表	115
附录 5	均匀设计表格	119
附录 6	培养基配方	122
附录 7	Origin 数据处理软件应用	123

第一章 实验误差及数据处理

一、实验误差来源

在实验指标的分析检验中,误差是客观存在的,有必要先了解分析测试过程中误差产生的原因及误差出现的规律。

实验误差是指测定结果与真实值之间的差值,根据误差产生的原因与性质,正常情况下的误差可以分为系统误差和偶然误差两类。同时,还有可能由于操作不正确引起的过失误差。

1. 系统误差

系统误差亦称可测误差,是指在实验操作过程中由于某些固定原因造成的误差,具有单向性和重现性,若找出原因,可使误差减小到可以忽略的程度。根据误差的性质及产生的原因,系统误差可以分为:

(1) 方法误差:由于实验方法本身不够完善而引起的误差。例如:在质量分析中,由于沉淀溶解损失而产生的误差;在滴定分析中,化学反应不完全、指示剂选择不当以及干扰离子的影响等原因而造成的误差。

(2) 仪器误差:仪器本身的缺陷所造成的误差。如电子仪器精度不够($1/10\ 000$ 天平有 $\pm 0.000\ 1\text{ g}$ 的误差),砝码质量未经校正,滴定管、容量瓶的读数与真实值不符等引起的误差。

(3) 试剂误差:由于使用的试剂、蒸馏水不纯,含有被测物质或干扰物质所造成的误差。

(4) 操作误差:由于操作人员的个人主观原因造成的误差。例如,每个人对颜色的敏感程度不同,在辨别滴定终点颜色时,偏深或偏浅等都会引起误差。

2. 偶然误差

偶然误差是指在分析过程中由于某些偶然的原因所造成的误差,也叫随机误差或不可测定误差,通常是测定条件(如实验室的温度、湿度或电压波动等)有变动而又得不到控制,使某测定值异于正常值。这类误差的大小和符号都是不固定的,没有规律性,较难预测和控制。但是,在消除系统误差后,对同一试样在同一条件下进行多次重复测定,测定数据经数理统计处理,具有以下统计规律:

(1) 同样大小的正负值的偶然误差,几乎有相等的出现概率;

(2) 小误差出现的概率大,大误差出现的概率小,符合正态分布。

根据偶然误差的分布规律,只要在消除系统误差的情况下,测定次数越多,其平均值应越接近真实值,从而使偶然误差尽可以减少。因此,在分析操作中,采用算术平均值表示分析结果是合理的。

第五章由肖雷、何环编写,第三章由姚菁华编写,第四章由邵菊芳编写,全书由肖雷统稿。

本书适合作为生物工程(技术)专业本科实验教学的教材,也可作为相近专业实验教材的参考书。由于生物工程发展迅速和编者自身水平的限制,书中难免存在不妥之处,衷心希望读者提出宝贵意见,以便不断完善。

编 者

2016 年 5 月

品分析结果中扣除空白值。

(3) 仪器校正

对分析结果准确度要求较高时,应对测量仪器进行校正,并将校正值考虑到分析结果的计算中,或者在计算结果时直接采用校正值。如在化学分析中,对滴定管、移液管、容量瓶体积的校正,对分析天平砝码的校正等。一般情况下,最简单而有效的办法是在一系列操作过程中使用同一仪器,这样可以完全或部分抵消仪器误差。

(4) 方法校正

这些方法误差可以用其他方法进行校正。如重量分析中未完全沉淀出来的待测组分可以用其他方法测出,将这个测出结果加入分析结果内,即可得到可靠的分析结果。

2. 减少偶然误差

增加平行测定次数,取多次测定值的平均值作为分析结果,可以减少甚至消除偶然误差。在生物工程测试中,一般试样的平行测定次数通常为 2~4 次。

3. 减少测量误差

各类分析方法所要求准确度不完全相同,整个分析过程的误差要求应与分析方法的误差要求一致。如重量分析和滴定分析允许的相对误差不超过 0.1%,这两种分析方法的测量误差有称量误差和体积测量误差。

称量误差,一般分析天平的绝对误差为 $\pm 0.0001 \text{ g}$,称取一份样品可能造成的最大误差是 $\pm 0.0002 \text{ g}$,根据误差要求称取样品的最低质量应该是 $0.0002 \text{ g} / 0.1\% = 0.2 \text{ g}$ 。

体积测量误差,一般常量滴定管的读数误差为 $\pm 0.01 \text{ mL}$,完成一次滴定可能造成的最大误差是 $\pm 0.02 \text{ mL}$,根据误差要求,用滴定管滴定时消耗剂的最低用量应是 $0.02 \text{ mL} / 0.1\% = 20 \text{ mL}$,一般控制在 20~40 mL。

4. 选择合适的分析方法

不同分析方法的准确度和灵敏度是不同的。如重量分析和滴定分析的灵敏度虽不高,但是分析结果的相对误差只有千分之几,因此适于测定含量高的组分。而仪器分析的灵敏度虽然较高,但分析结果的相对误差可达到百分之几,所以适于测定含量低的组分。

5. 做回收试验

在样品中加入已知量的标准物质,然后做对照试验,计算标准物质的回收率,根据回收率的高低,来判断该方法的准确度和分析过程中是否存在系统误差。

回收率计算公式如下:

$$P = \frac{x_1 - x_0}{m} \times 100\%$$

式中 P ——加入的标准物质的回收率, %;

m ——加入的标准物质的量;

x_1 ——加入标准物质后的测定值;

x_0 ——样品的测定值。

中国药典规定:

① 准确度实验,其回收率的测定结果应在 95%~105% 范围内,其中对于一些前处理较复杂的方法,其回收率的测定结果可在 90%~110% 范围内;准确度实验的相对标准偏差 (RSD%) 应小于 5%。

② 精密度实验的相对标准偏差(RSD%)应小于3%。

③ 专属性实验(制剂)以不含被测成分的供试品试验,其含量测定数值应小于同样条件下供试品测定数值的5%。

四、表示实验结果常用的统计特征数及其计算公式

(1) 样本均值 $\bar{x}$, 即 n 个测定值 $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ 的算术平均值:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

(2) 绝对偏差 d , 算术平均偏差(或称平均差) $\bar{d}$, 相对平均偏差 $\frac{\bar{d}}{\bar{x}}$:

$$d = x_i - \bar{x} \quad \bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}|}{n} \quad \frac{\bar{d}}{\bar{x}} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{|x_i - \bar{x}|}{n}}{\bar{x}}$$

(3) 标准偏差(或称均方根差) S :

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

它是数理统计学中,表示一个统计分布离散程度最重要的指标,用以反映精密度。

(4) 相对标准偏差 RSD , 又称变异系数 CV , 是标准偏差与样本均值的比值, 即:

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

(5) 标准误差 $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

(6) 总体数学期望 μ , 在置信水平 $1-\alpha$ 下的一个置信区间:

$$\mu = \bar{x} \pm t_{\alpha} \frac{S}{\sqrt{n}}, \text{ 即 } \mu = \bar{x} \pm t_{\alpha} S_{\bar{x}}$$

式中 t_{α} ——可由给定的置信度 α 及自由度 $n-1$, 查 t 分布表(表 1-1)而得到(α 对称地分布于两侧尾部);

n ——测定次数, $n \geq 3$ 。

表 1-1 不同置信度和测定次数的 t 值

测定次数	t 值			
	置信度 90%	置信度 95%	置信度 99%	置信度 99.5%
3	2.92	4.30	9.92	14.98
4	2.35	3.18	5.84	7.45
5	2.13	2.78	4.60	5.60
6	2.01	2.57	4.03	4.77
7	1.94	2.45	3.71	4.32

续表 1-1

测定次数	t 值			
	置信度 90%	置信度 95%	置信度 99%	置信度 99.5%
8	1.90	2.36	3.50	4.03
9	1.86	2.31	3.35	3.83
10	1.83	2.26	3.25	3.69
11	1.81	2.23	3.17	3.58
12	1.72	2.09	2.84	3.15
∞	1.64	1.96	2.58	2.81

五、实验结果差异性的检验

1. t 检验法

设 $\bar{x}, \bar{y}$ 分别为两系列各次测定值的算术平均值, n_1, n_2 分别为两系列测定的次数, 计算下列值:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{S} \cdot \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

其中:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_1} (x_i - \bar{x})^2 + \sum_{i=1}^{n_2} (y_i - \bar{y})^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

再按自由度 $= n_1 + n_2 - 2$, 由给定的置信度 α 值, 查 t 分布表, 得出 t_α 值, 然后比较 t 与 t_α 的大小, 作出判断。

一般采用: 当 $t < t_{0.05}$ 差异不显著; $t_{0.05} \leq t < t_{0.01}$ 差异显著; $t > t_{0.01}$ 差异极显著。

2. F 检验法

设 S_1, S_2 分别为方法 1 和方法 2 的标准差, 且以 n_1, n_2 分别表示方法 1 和方法 2 的测定次数。计算下列值:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (S_1^2 > S_2^2)$$

再由给出的置信度 α 值, 按自由度 $N_1 = n_1 - 1, N_2 = n_2 - 1$, 查 F 分布表得 F_α 值。若 $F < F_\alpha$, 表示两方法差别不显著。若 $F \geq F_\alpha$, 表示两方法有显著差异, 且方法 1 的标准差比方法 2 的标准差大, 所以第二方法比第一方法精密。

六、实验结果数据处理

为了得到准确的分析结果, 不仅需要准确的测量, 而且还要正确记录和计算数据。

1. 有效数字及数字修约规则

在分析工作中实际能测量到的数字称为有效数字。在记录有效数字时, 规定只允许数的末位欠准, 末位数字可有 ± 1 的误差。

(1) 有效数字的位数

由有效数字构成的数值与通常数学上的数值在概念上是不同的。例如,在托盘天平和分析天平上分别称同一砝码,其测量值为 1.00 g 和 1.000 0 g。这两个数值,从数学上看它们是相同的,但从分析测量的角度看,二者代表的意义是不同的。它们不仅反映了砝码本身质量的大小,而且反映了测量砝码时的准确程度。1.00 表示测量的准确程度为 ± 0.01 g,相对误差为 $0.01/1.00 \times 100\% = 1\%$;而 1.000 0 表示测量的准确程度为 $\pm 0.000 1$ g,相对误差为 $0.000 1/1.000 0 \times 100\% = 0.01\%$ 。两个数值的区别就是有效数字的位数不同,1.00 是 3 位有效数字,而 1.000 0 是 5 位有效数字。

在分析工作中能实际测量到的数字如 1,2,3,⋯,9 为有效数字。而数字“0”在数据中具有双重意义。若作为普通数字使用,它就是有效数字;若它只起定位作用,就不是有效数字。一般来说,非零数字中间的“0”和数值末尾的“0”都是有效数字;而非零数字之前的“0”只起定位作用。如 10.258 0(6 位);3.105 4(5 位);0.210 4(4 位);0.015(2 位);0.012 0(3 位)。以“0”结尾的正整数,有效数字位数不确定,应根据实际测量的计数用 $\times 10^n$ 表示,如质量为 1.50 g,若以 mg 为单位,则可表示为 1.50×10^3 mg,而不能表示为 1 500 mg。

(2) 数字修约规则

一个分析结果常由许多原始数据经过多步数字运算才能得出,而分析结果的有效数字位数只能最后一位数是可疑数字,所以数据记录、运算及最后的分析结果都不能任意增加或减少有效数字位数,要做到这一点,必须掌握数字修约规则和有效数字运算规则。

数字的修约规则是“四舍六入五成双”。即当尾数小于等于 4 时,则舍去;尾数大于等于 6 时,则进 1;尾数等于 5 时,若 5 前面为偶数则舍去,为奇数时则入;当 5 后面还有不是零的任何数时,无论 5 前面是偶或是奇数均要入。修约口诀及实例见表 1-2。

表 1-2 数字修约口诀与实例对照表(修约至 3 位有效数字)

修约口诀		修约实例	
		修约前	修约后
四要舍		5.044 1	5.04
六要入		6.036 2	6.04
五后有数则进一		7.035 1	7.04
五后无数看前位	前为奇数则进一	7.035	7.04
	前为偶数要舍去	7.025	7.02
无论舍去多少位必须一次修约成		6.054 56	6.05

(3) 有效数字运算规则

有效数字的运算和修约先后顺序目前还没有统一规定,可以先修约然后运算,也可以直接运算然后修约到应保留的位数。两种方法的计算结果可能稍有差别,不过是差在最后的可疑数字上,影响不大。但无论哪种方法,对运算结果的要求是统一的。

① 加减运算的结果,其小数以后保留的位数,应与参加运算各数中小数后位数最少的那个数相同。如: $0.012 1 + 25.64 + 1.057 82 = ?$

直接计算的结果为 26.709 92,修约值应和小数后位数最小的 25.64 相同,即应保留到小数点后第二位。根据修约规则,这个算式的正确结果应为 26.71,多于或少于 4 位有效数

字都是不正确的。

② 乘法运算的结果,其有效数字保留位数,应与参加运算各值中有效数字位数最少的那个数值相同。如 $0.0121 \times 25.64 \times 1.05782 = ?$

直接计算的结果为 0.328182308,修约值应和有效数字位数最少的 0.0121 相同,即应保留 3 位有效数字。根据修约规则,这个算式的正确结果应为 0.328,多于或少于 3 位有效数字都是不正确的。

在运算中,当第一位有效数字 ≥ 8 时,有效数字位数可多计一位。如 8.34 在运算中可以作 4 位有效数字看待。

值得特别注意的是,在一些分析化学计算公式中,有时会出现一些倍数或分数的关系,如水的相对分子质量 $M_r(\text{H}_2\text{O}) = 2 \times 1.008 + 16.00 = 18.016$,修约后应为 18.02,而不是 18。式中:“ 2×1.008 ”中的“2”不能看作是 1 位有效数字,因为它是非测量所得的数值,是自然数,其有效数字位数可视为无限的。

总之,分析测量结果应保留的有效数字,要根据分析方法和仪器的准确度而定,在数据记录、运算和最后的检测结果中,都不能任意增加或减少有效数字的位数。通常,在常量分析中,一般保留 4 位有效数字,而在微量或痕量分析中,往往只要求保留 2 位或 3 位有效数字即可。

2. 可疑数据的取舍

为了减少实验的误差,我们需要做多次重复实验,然后求出平均值,但常发现有个别测定值比其他测定值明显偏大或偏小,称为可疑数据。这种明显偏大或偏小的数值能否直接参加平均值的计算应根据情况进行判断。如果查明的确是由于“过失”引起,则这一数据必须舍去;如果不能确定是由于“过失”引起,则不能随便舍去或轻易保留,特别是当测量数据较少时,可疑数据的取舍会对分析结果产生很大的影响,必须慎重对待。当一组实验数据中出现可疑值而我们却找不出原因时,可借助于统计学方法来决定取舍。统计检验的方法有多种,各有优缺点,比较简单的处理方法有 Q 检验法和 $4\bar{d}$ 法。

(1) Q 检验法

Q 检验法又称舍弃商法。它是将多次测定的数据,按从小到大的顺序将数据排列为: $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$, 设 x_i 为可疑值,根据统计量 Q 进行判断,确定可疑值的取舍。

$$Q = \frac{x_i - x_{i-1}}{x_n - x_1}$$

式中:分子为可疑值与相邻的一个数值之差,分母为整组数据的极差。 Q 值越大,说明可疑值偏离其他值越远。 Q 称为舍弃商,查 Q 值表(表 1-3),将 $Q_{\text{计}}$ 值与 $Q_{\text{理论}}$ 值比较,若 $Q_{\text{计}} > Q_{\text{理论}}$ 则应舍弃可疑值,否则应保留。

表 1-3

取舍可疑数据的 Q 值表

置信度 p	测定次数							
	3	4	5	6	7	8	9	10
置信度 $p=90\%$	0.94	0.76	0.64	0.56	0.51	0.47	0.44	0.41
置信度 $p=95\%$	1.53	1.05	0.86	0.76	0.69	0.64	0.60	0.58

例如：在某次实验中得到一组数据为 30.18, 30.56, 30.23, 30.35, 30.32。试问 30.56 这个数据是否要保留？

解：① 将数据由小到大排列：30.18, 30.23, 30.32, 30.35, 30.56。

② 计算统计量：

$$Q = \frac{30.56 - 30.35}{30.56 - 30.18} = \frac{0.21}{0.38} = 0.55$$

③ 查 Q 值表(表 1-3)，置信度为 95%，5 次测定的 Q 值为 0.86。

∵ $0.55 < 0.86$ ，即 $Q_{\text{计}} < Q_{\text{理论}}$

∴ 数据 30.56 应保留。

(2) 格鲁布斯(Grubbs)法

格鲁布斯法的步骤为：

① 测定数据按由小到大的顺序排列，即 $x_1, x_2, x_3, \dots, x_{n-1}, x_n$ 。

② 计算该组数据的平均值 $\bar{x}$ (包括可疑值在内) 及标准偏差 S 。

③ 计算统计量 T 。

$$T = \frac{x_i - x_{i-1}}{S}$$

④ 根据置信度，查 $T_{p,n}$ 表(见表 1-4)。

若 $T \geq T_{p,n}$ ，可疑值应弃去；若 $T < T_{p,n}$ ，则可疑值应保留。

表 1-4

$T_{p,n}$ 值

测定次数	置信度 p		测定次数	置信度 p	
	95%	99%		95%	99%
3	1.15	1.15	12	2.29	2.55
4	1.46	1.49	13	2.33	2.61
5	1.67	1.75	14	2.37	2.66
6	1.82	1.94	15	2.41	2.71
7	1.94	2.10	16	2.44	2.75
8	2.03	2.22	17	2.47	2.79
9	2.11	2.32	18	2.50	2.82
10	2.18	2.41	19	2.53	2.85
11	2.23	2.48	20	2.56	2.88

⑤ 如果可疑值有 2 个以上，而且又均在平均值的同一侧，如 x_1 和 x_2 均属可疑值时，则应检验最内侧的一个数据，即先检验 x_2 是否应弃去。如果 x_2 属于舍弃的数据，则 x_1 自然也应该弃去。在检验 x_2 时，测定次数应按 $n-1$ 次计算。如果可疑值有 2 个或 2 个以上，且又分布在平均值的两侧，如 x_1 和 x_n 均属可疑值，就应该分别先后检验 x_1 和 x_n 是否应该弃去，如果有一个数据决定弃去，再检验另一个数据，测定次数应减少一次，同时选择 99% 的置信度。

(3) $4d$ 法

$4d$ 法是先求出除可疑值以外的其余数据的平均值 $\bar{x}$ 及平均偏差 $\bar{d}$, 然后将可疑值与平均值之差的绝对值与 $4\bar{d}$ 比较。若其新绝对值大于或等于 $4\bar{d}$, 则应舍去可疑值, 否则应保留。

Q 检验法符合数理统计原理, 比较严谨, 方法也简便, 置信度可达 90% 以上, 适用于测定 3~10 次之间的数据处理, 测定次数受到一定限制。格鲁布斯法稍复杂, 但准确度高、应用范围宽。 $4d$ 法计算简单, 不必查表, 但数据统计处理不够严密, 适用于处理一些要求不高的试验数据。

3. 实验结果的检验

在生物工程实验中, 一般来说, 待测样品的真实值是不知道的, 分析结果的检验用精密度表示, 精密度越高, 说明各测定值的重现性好。在消除了系统误差的前提下, 精密度也反映了测定结果的准确度。

(1) 测定结果的精密度

多次测定结果的精密度可用标准偏差 S , 标准误差 $S_{\bar{x}}$ 和变异系数 CV 来表示。

(2) 测定结果的置信区间

置信区间是指在一定置信度下, 以测定结果平均值为中心, 包括总体平均值在内的可靠性范围。在消除了系统误差的前提下, 对于有限次数的测定, 总体平均值的置信区间为:

$$\mu = \bar{x} \pm t_{\alpha} \frac{S}{\sqrt{n}} \text{ 即 } \mu = \bar{x} \pm t_{\alpha} S_{\bar{x}}$$

第二章 试验设计方法

在科学研究和工业生产中经常会遇到需要通过试验来寻找试验对象的变化规律,优化生产工艺等实际问题。试验过程中只有进行科学的试验设计,才能用较少的试验次数,较短的时间取得预期的试验目标。试验设计方法部分主要介绍几种常见试验设计方法,如单因素试验设计、正交试验设计和均匀试验设计。

一、单因素试验设计和方差分析

在试验中我们将表示试验结果特性的值,如产品得率、酶活力、细胞浓度等作为试验指标值,可以用它们来考核试验结果;而将影响试验指标的条件称为因素,因素的不同状态称为水平。单因素试验是指只有一个因素(或仅考察一个因素)对实验指标构成影响的试验,该试验设计前提是假设因素间不存在交互作用,通过一次改变一个因素的水平而其他因素保持恒定水平,然后逐个因素进行考察。方差分析是一种非常实用、有效的统计检验方法,能用于检验试验过程中有关因素对实验结果影响的显著性^[1]。单因素试验的方差分析由于其操作起来简单容易,结果明了,因此一直都是生物工程发酵培养基组分优化和工艺参数优化中常用的方法。但是,通过单因素试验方差分析仅能得到单个因素对试验结果影响的显著性,而且当考察的因素较多时,其工作量会相当大,并且通过该方法不能得到最优化组合。因此该方法常用于初步筛选试验,得到主要因素后,再利用正交、均匀或者响应面设计对主要因素着重考察,得到其最优组合。

Excel 作为常规的数据处理工具,其各项功能在很多教程中均有详细介绍,在这里不再赘述。而其统计功能因为被封装在一个外挂模块中,受关注程度相对较少。其实其 Microsoft Excel 提供了多种非常实用的数据分析工具,只是在使用前需要进行专门的安装。其方法大致是:单击 Excel 界面中的“工具”菜单,选择“加载宏”,然后在弹出的加载宏对话框中选择“分析工具库”(以 Microsoft 2003 为例),点击“确定”后软件会把数据分析的功能加载到计算机上,在选定的加载完成后,在 Excel 的“工具”菜单栏出现“数据分析(D)”的一个选项,其功能组合中包括了常用统计分析功能如:单因素方差分析、可重复双因素及无重复双因素方差分析等试验设计需要的内容。

以表 2-1 为例说明 Excel 提供的单因素方差分析结果,其中 3 个数据大小可以判断出因素的重要性,分别为 F 、 F crit 和 P -value。 F 表示显著性水平为 0.05 时的临界值,表 2-1 中的 $F > F$ crit,表明因素对试验指标有显著影响; P -value 表示的是因素对试验结果无显著影响的概率,当 P -value ≤ 0.01 时说明因素对试验结果影响非常显著(* *), $0.01 < P$ -value ≤ 0.05 说明因素对试验结果影响一般显著(*)。