

毛主席语录

鼓足干劲，力争上游，多快好省地建设社会主义。

中国人民有志气，有能力，一定要在不远的将来，赶上和超过世界先进水平。

在生产斗争和科学实验范围内，人类总是不断发展的，自然界也总是不断发展的，永远不会停止在一个水平上。因此，人类总得不断地总结经验，有所发现，有所发明，有所创造，有所前进。

T8925
2801

目 录

深层发酵法生产酶制剂

一、生产实例 (工艺条件)	(1)
1. BF7658 淀粉酶的生产	(1)
2. AS1.398 蛋白酶的生产	(2)
3. AT3.942 蛋白酶的生产	(4)
4. 166 蛋白酶的生产	(5)
5. 2709 蛋白酶的生产	(5)
6. 209 蛋白酶的生产	(6)
7. 289 蛋白酶的生产	(7)
8. 172 蛋白酶的生产	(7)
9. AS3.999 糖化酶的生产	(8)
10. AS2.1203 脂肪酶的生产	(9)
11. 3.350 酸性蛋白酶的生产	(9)
二、生产技术	(10)
(一) 培养基的制备	(10)
1. 试管斜面培养基的制备	(10)
2. 菌种扩大培养基的制备	(10)
3. 发酵培养基的制备	(12)
(二) 菌种的保藏和复壮	(12)
1. 菌种的保藏	(12)
2. 菌种的复壮	(13)
(三) 菌种的培养	(14)
1. 试管菌种培养	(14)
2. 菌种扩大培养	(17)

(四) 发酵	(19)
1、发酵条件的控制	(19)
2、染菌的防治	(28)
(五) 酶的提取	(31)
1、提取前的处理	(32)
2、盐析提取	(33)
3、喷雾干燥提取	(39)
4、有机溶剂沉淀提取	(40)
5、物料衡算	(41)

厚层发酵法生产酶制剂

一、生产实例 (工艺条件)	(42)
1. BF7658 淀粉酶的生产	(42)
2. JD32 淀粉酶的生产	(43)
3. AT3.942 蛋白酶的生产	(44)
4. AS1.398 蛋白酶的生产	(45)
5. 轻3092 糖化酶的生产	(46)
二、生产技术	(46)
(一) 培养基的制备	(46)
(二) 菌种的培养和发酵	(47)
1、菌种培养	(47)
2、厚层发酵	(47)

酶制剂的应用

一、几种酶制剂的作用特性	(49)
二、酶制剂在工业上的应用实例	(53)
三、使用酶制剂应注意的问题	(54)
四、酶活力的测定	(59)
(一) 测定酶活力的注意事项	(59)
(二) 几种酶的活力测定方法	(61)
1. 液化型淀粉酶 2. 蛋白酶 3. 糖化型淀粉酶 4. 脂肪酶	

酶是一种具有催化特性的蛋白质。用物理的或化学的方法将生物体产生的酶提取出来，这种制品就是酶制剂。

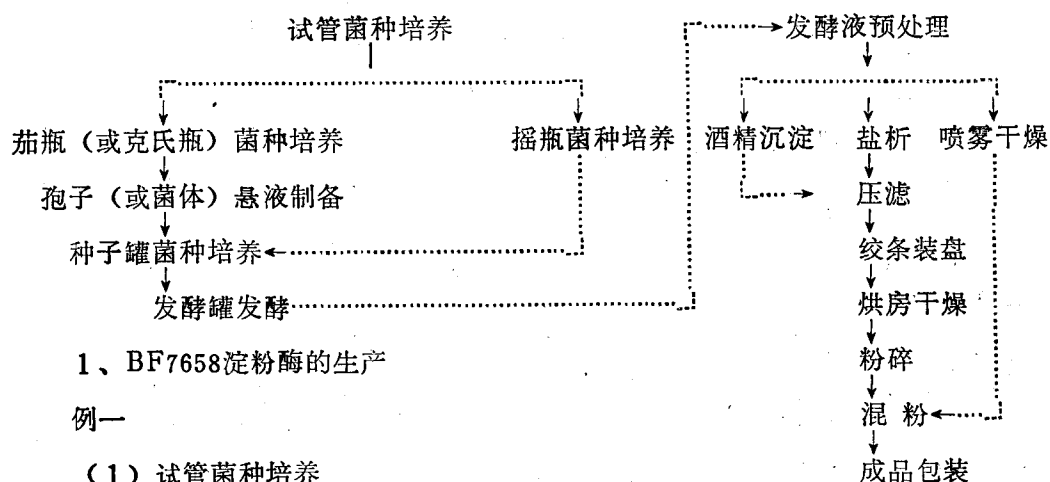
由于培养微生物不受气候和地理环境条件的限制，控制容易，使用的原料价廉，在较短时间内可以获得较大量的各种各样的酶，而且通过微生物生理学和遗传学的研究，还可以大幅度地提高微生物的产酶量，因此目前生产的酶制剂，绝大部分是用微生物生产的酶制剂。

由于用动物或植物的材料生产的酶制剂正逐步被微生物酶制剂所替代，而且它们的提取加工方法又基本与微生物酶制剂生产一样，因此这里仅讨论微生物酶制剂的生产和应用的一些技术问题（实践）。

深层发酵法生产酶制剂

一、生产实例（工艺条件）

一般工艺流程：



1、BF7658淀粉酶的生产

例一

（1）试管菌种培养

培养基：可溶性淀粉2%、氯化钠0.5%、蛋白胨1%、琼脂2%、PH6.7~7.0。
37°C培养24~48小时。

（2）茄瓶菌种培养（同试管菌种培养）

（3）种子罐菌种培养

培养基：豆饼粉4%、玉米粉3%、磷酸氢二钠0.8%、硫酸铵0.4%、氯化铵0.15%、消沫豆油约0.3%，液化酶量16单位/克玉米粉。

罐温 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ，罐压 0.5 ± 0.3 公斤/厘米²，通气量（参考数）0~6小时为0.2~0.3，6~10小时为0.5，10小时后为0.5~1.0（升空气/升醪液），培养14~16小时（此时PH 6.4 ± 0.1 ）。

(4) 发酵罐发酵

培养基：豆饼粉5%（基础料5%、补料5%）、玉米粉8%（基础料3.75%、补料20%）、磷酸氢二钠0.8%（基础料0.8%、补料0.8%）、硫酸铵0.4%（基础料加）、氯化钙0.2%（基础料加）、消沫豆油（基础料约0.1%，补料约0.2%）。液化酶量（基础料13.3单位/克玉米、补料4~5单位/克玉米）、基础料水量/补料水量为4/1.5。

罐温 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，罐压0.3~0.5公斤/厘米²，通气量同种子罐（补料后可加至1:1），培养35~40小时（此时PH7.8~8.0），补料时控制醪液不超过PH7.0。

(5) 发酵液预处理

加2%含水氯化钙和0.8%磷酸氢二钠，加热至50~55 $^{\circ}\text{C}$ 维持30分钟。

(6) 盐析

35~38 $^{\circ}\text{C}$ 、PH6.7、硫酸铵40%（夏天42%），搅一小时，静置16~24小时。

(7) 烘房干燥

烘温50 $^{\circ}\text{C}$ ，6~8小时翻搓一次，干酶条含水量6%以下结束干燥。

例二

(1) 试管菌种培养

培养基：去皮土豆200克，切片煮1小时，去渣定容至1000毫升，加硫酸镁5毫克，调节pH6.7~7.0。

37 $^{\circ}\text{C}$ 培养72小时。

(2) 茄瓶菌种培养（同试管菌种培养）

(3) 种子罐菌种培养

培养基：（同例一）

罐温 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，罐压0.5~0.8公斤/厘米²，通气量（参考数）0~10小时1:1.13，10~12小时1:1.45，培养12~14小时。

(4) 发酵罐发酵

培养基：豆饼粉5.5%（基础料5.5%、补料5.5%）、玉米粉11%（基础料7.2%、补料22.3%）、焦磷酸钠0.4%（基础料和补料各0.4%）、硫酸铵0.4%（基础料和补料各0.4%）、含水氯化钙0.5%（基础料0.33%、补料0.1%）、氯化铵0.15%（基础料0.13%，补料0.2%）、液化酶量（基础料3单位/克玉米、补料0.9单位/克玉米）、基础料水量/补料水量为4.5/1.5，不加消沫剂。

罐温 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，罐压0.5~0.8公斤/厘米²，通气量（参考数）0~12小时1:0.74，12小时~放罐1:1.48~1.1，培养45~50小时（此时PH7.1~7.6），补料时控制醪液不超过PH6.3~6.5。

(5) 发酵液预处理

加2%含水氯化钙。

（盐析、干燥同例一）

2、AS1.398蛋白酶的生产

例一

(1) 试管菌种培养

培养基：牛肉膏1%、氯化钠0.5%、蛋白胨1%、琼脂2%、PH7.0~7.2。

31±0.5℃培养24小时。

(2) 茄瓶菌种培养（同试管菌种培养）。

(3) 种子罐菌种培养

培养基：豆饼粉3%、玉米粉2%、麸皮3%、磷酸氢二钠0.4%、磷酸二氢钾0.03%。

罐温30±1℃，罐压0.5~1公斤/厘米²、通气量（参考数）1:0.3~0.5、培养18~22小时（此时PH6.3）。

(4) 发酵罐发酵

培养基：豆饼粉3%、玉米粉4%、麸皮4%、磷酸氢二钠0.4%、磷酸二氢钾0.03%、消沫豆油约0.08%

罐温、罐压、通气量同种子罐，培养30~35小时（此时PH6.3~6.6）。

(5) 发酵液预处理

加磷酸氢二钠0.12%，无水氯化钙0.4%，40~42℃搅拌30分钟。

(6) 盐析

作粗制品加硫酸铵40%（夏天加42%），搅1小时，静止20~24小时；作精制品将发酵液先板框压滤，滤液加40%硫酸铵（夏天加42%），搅1小时，静止20~24小时，加0.2%硅藻土，木榨压滤。

(7) 烘房干燥

烘温38~40℃，6~8小时翻搓一次，干酶条含水量6%以下结束干燥。

例二

(1) 试管菌种培养（同例一）

(2) 摇瓶菌种培养

培养基：豆饼粉3%、玉米粉2%、甘薯粉2%、麸皮3%、磷酸氢二钠0.4%、磷酸二氢钾0.03%、自然PH。

30±1℃振荡培养40小时。

(3) 种子罐菌种培养

培养基：豆饼粉3%、甘薯粉3%、麸皮1%、磷酸氢二钠0.4%、磷酸二氢钾0.03%、消沫豆油约0.5%。

罐温29~30℃，罐压0.5公斤/厘米²，通气量（参考数）1:0.5，培养15~18小时（此时PH6.3）。

(4) 发酵罐发酵

培养基：豆饼粉3.5%、玉米粉3%、甘薯粉3%、麸皮2.5%、磷酸氢二钠0.4%、磷酸二氢钾0.03%、消沫豆油约0.8%。

罐温0~4小时30~32℃、5~8小时每小时升2℃到40℃、9~12小时每小时

降 2°C 到 $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、直至放罐，罐压 0.5公斤/厘米^2 ，通气量（参考数） $0\sim 10$ 小时 $1:0.6$ ， $11\sim 20$ 小时 $1:0.7$ ， 20 小时后 $1:0.8$ ，培养 30 小时左右。

（提炼条件同例一）

例三

（1）试管菌种培养（同例一）

（2）摇瓶菌种培养

培养基：豆饼粉 3% 、甘薯粉 4% 、麸皮 4% 、磷酸氢二钠 0.4% 、磷酸二氢钾 0.03% 。

30°C 振荡培养 42 小时。

（3）种子罐菌种培养

培养基：豆饼粉 3% 、甘薯粉 2% 、麸皮 3% 、磷酸氢二钠 0.4% 、磷酸二氢钾 0.03% 。

罐温 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，罐压 0.5公斤/厘米^2 ，通气量（参考数） $1:0.5$ （前期）， $1:1$ （后期），培养 22 小时左右（此时 $\text{PH}6.5$ ）。

（4）发酵罐发酵

培养基：豆饼粉 2.5% 、甘薯粉 1.5% 、麸皮 5% 、磷酸氢二钠 0.4% 、磷酸二氢钾 0.03% 。

罐温、罐压、通气量同种子罐，培养 22 小时左右。

（5）发酵液预处理（无）

（6）盐析

加硫酸铵 40% ，搅拌 2 小时，静置 24 小时，保温 30°C ，用气鼓式板框压滤， $8\sim 9$ 小时后逐渐进气鼓压，压力最高 4公斤/厘米^2 。

（7）烘房干燥

烘温 $40\sim 45^{\circ}\text{C}$ ，约 24 小时。

3、AT3.942蛋白酶的生产

（1）试管菌种培养

培养基：蔗糖 3% 、麸皮 5% 、硝酸钠 0.2% 、硫酸镁 0.05% 、氯化钾 0.05% 、硫酸亚铁 0.001% 、磷酸氢二钾 0.1% 、琼脂 2% 、 $\text{PH}7.0$ 。

$33\sim 37^{\circ}\text{C}$ 培养 24 小时。

（2）茄瓶菌种培养（同试管菌种培养）

（3）种子罐菌种培养

培养基：麸皮 3% 、米糠 0.5% 、玉米浆 1% 、磷酸二氢钾 0.2% 、消沫豆油约 0.25% 、 $\text{PH}7.0$ 。

罐温 32°C 左右，罐压 0.5公斤/厘米^2 ，通气量（参考数） $1:0.25$ ，培养 40 小时左右（此时 $\text{PH}5.6\sim 5.8$ ）。

（4）发酵罐发酵

培养基：麸皮 3% 、米糠 1% 、玉米浆 0.5% 、磷酸氢二钠 0.2% 、LS净洗剂

0.1%、消沫豆油约0.25%、PH7.0。

罐温 0~24小时32°C, 24小时后30°C, 罐压0.5公斤/厘米², 通气量(参考数) 0~24小时微量, 24~40小时0.2~0.35, 40~55小时0.35~0.5, 培养55小时左右(此时PH6.2~6.8)。

(5) 盐析

发酵液不经预处理, 调PH6.5, 加60%硫酸铵, 搅拌数小时, 作粗制品静置20~24小时压滤, 作精制品静置36~48小时加入0.2%硅藻土压滤, 待大部水分压出再用石槽抽滤。

(6) 烘房干燥

烘温38~40°C, 每8小时翻搓一次。

4、166蛋白酶的生产

(1) 试管菌种培养

培养基: 蛋白胨0.5%、食盐0.5%、碳酸钙0.2%、葡萄糖0.5%、琼脂2%、PH7.2~7.4。

28°C培养3~5天。

(2) 茄瓶菌种培养

培养基: (同试管菌种培养基)

28°C培养10~12天。

(3) 种子罐菌种培养

培养基: 玉米粉5%、豆饼粉1%、甘薯粉1%、磷酸氢二钠0.4%、碳酸钙0.4%、硫酸铵0.4%、硫酸锌0.001%、氯化钠0.2%、消沫油约0.5%, PH自然。

罐温28~29°C, 罐压0.5公斤/厘米², 通气量(参考数) 20小时以前1:0.4, 20小时以后1:0.5, 培养40小时(此时PH5.5~6.0)。

(4) 发酵罐发酵

培养基: (同种子罐培养)

罐温、罐压同种子罐培养, 通气量(参考数) 0~20小时1:0.4, 20~40小时1:0.6, 40~50小时1:0.8, 培养50小时左右。

(5) 盐析

发酵液加0.6%氯化钙, 不经预处理加55%硫酸铵搅1小时, 静置24小时。

(6) 烘房干燥

烘温40°C

5、2709蛋白酶的生产

例一

(1) 试管菌种培养

培养基: 牛肉膏1%、蛋白胨1%、氯化钠0.5%、琼脂2%、PH7.0~7.2。

36±1°C培养24小时以上。

(2) 克氏瓶菌种培养(同试管菌种培养)

(3) 种子罐菌种培养

培养基：玉米粉 5 %、豆饼粉 3 %、磷酸氢二钠 0.4 %、磷酸二氢钾 0.03 %、消沫豆油约 0.75 %、PH 9.0~9.3。

罐温 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ ，罐压 0.6 ± 0.1 公斤/厘米²，通气量（参考数）0~10 小时 1 : 1
11~15 小时 1 : 1.5，16 小时~成熟 1 : 1.8，培养 20~22 小时（此时 PH 6.7~7.0）。

(4) 发酵罐发酵

培养基：玉米粉 4 %、豆饼粉 1.5 %、麸皮 5.5 %、磷酸氢二钠 0.4 %、磷酸二氢钾 0.03 %、消沫豆油约 0.4 %、PH 9.0~9.3。

罐温 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ ，罐压 0.5 ± 0.1 公斤/厘米²，通气量（参考数）1~10 小时 0.66~0.8，11~15 小时 1~1.1，16~20 小时 1.21~1.26，21 小时~放罐 1.4~1.5，培养 25~30 小时（此时 PH 7.0 左右）。

(5) 发酵液预处理

加磷酸氢二钠 0.2 %、无水氯化钙 0.4 %、 $46 \sim 48^\circ\text{C}$ 30 分钟。

(6) 盐析

冷至 36°C ，调 PH 6.5，加硫酸铵 45 %。

(7) 烘房干燥

烘温 40°C 。

例二

(1) 试管菌种培养

培养基：牛肉膏 1 %、蛋白胨 1 %、氯化钠 0.5 %、琼脂 2 %、PH 7.5~7.8。

37°C 培养 48 小时。

(2) 摇瓶菌种培养

培养基：豆饼粉 1.5 %、甘薯粉 4 %、麸皮 5.5 %、磷酸氢二钠 0.4 %、磷酸二氢钾 0.03 %，pH 8.5~9.0

37°C 振荡培养 50 小时。

(3) 种子罐菌种培养

培养基：豆饼粉 3 %、甘薯粉 2 %、麸皮 3 %、磷酸氢二钠 0.4 %、磷酸二氢钾 0.03 %，PH 9.0~9.2。

罐温 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ，罐压 0.5 公斤/厘米²，通气量（参考数）1 : 0.5（前期），1 : 1（后期），培养 24~25 小时（此时 PH 8.0）。

(4) 发酵罐发酵

培养基：豆饼粉 1.5 %、甘薯粉 4 %、麸皮 5.5 %、磷酸氢二钠 0.4 %、磷酸二氢钾 0.03 %，灭菌后 PH 6.7~6.9。

罐温 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ，罐压 0.5 公斤/厘米²，通气量（参考数）1 : 1，培养 24 小时（此时 PH 7.5 以上）。

（提炼条件同例一）

6、209 蛋白酶的生产

(1) 试管菌种培养

培养基：牛肉膏1%、蛋白胨1%、氯化钠0.5%、琼脂2%、PH7.0~7.2。

35°C培养30小时。

(2) 克氏瓶菌种培养（同试管菌种培养）

(3) 种子罐菌种培养

培养基：豆饼粉4%、麸皮4%、磷酸氢二钠0.4%、磷酸二氢钾0.03%、氯化钙0.3%、碳酸钠0.5%、消沫油约0.4~0.5%。

罐温 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，罐压0.5~0.8公斤/厘米²，通气量（参考数）0~10小时1:0.8~1，11小时到成熟1:1.3~1.5，培养20小时左右（此时PH7.1~7.4）。

(4) 发酵罐发酵

培养基：豆饼粉3.5%、麸皮4.5%、磷酸氢二钠0.4%、磷酸二氢钾0.03%、氯化钙0.3%、碳酸钠0.5%、消沫油约0.12%（灭菌后PH9.0）。

罐温 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，罐压0.5公斤/厘米²，通气量（参考数）0~10小时1:0.2~0.3，11小时~放罐1:0.4~0.5，培养25小时左右（此时PH8.6左右）。

(5) 盐析

发酵液加42%硫酸铵，搅1小时，静止16小时后压滤。

(6) 烘房干燥

烘温38~40°C

（如果发酵液不易压滤，有的厂将盐析好的发酵液再加水30~35%，然后压滤）

7、289蛋白酶的生产

(1) 试管菌种培养

培养基：牛肉膏1%、蛋白胨1%、氯化钠0.5%、琼脂2%、PH8。

30°C培养24小时。

(2) 克氏瓶菌种培养（同试管菌种培养）

(3) 种子罐菌种培养

培养基同发酵罐培养基（采用外循环式发酵罐），接种量10%，培养18~24小时。

(4) 发酵罐发酵

培养基：①麸皮2%、米糠2%、豆饼粉3%、磷酸氢二钠0.4%、磷酸二氢钾0.03%、氯化锰或硫酸锰0.05%、液体石蜡0.8%、PH9；②麸皮1.5%、米糠1.5%、豆饼粉4.5%、磷酸氢二钠0.4%、磷酸二氢钾0.03%、氯化锰或硫酸锰0.05%、液体石蜡0.8%、PH9。

罐温34~36°C，通气量（参考数），外循环式发酵罐采用1:1（前期）、1:2~2.5（后期），搅拌式发酵罐采用1:0.5（前期）、1:1（后期），培养13~24小时。

（提炼条件基本上同AS1.398蛋白酶生产）

8、172蛋白酶的生产

(1) 试管菌种培养:

培养基: 牛肉膏4%、蛋白胨1%、氯化钠0.5%、PH自然。不同代数、不同菌龄、室温或冰箱保存等斜面菌种都可转接至摇瓶菌种培养基。

(2) 摇瓶菌种培养

培养基: 牛肉膏0.5%、蛋白胨1%、氯化钠0.5%、PH自然、500毫升三角瓶装100毫升培养基。

30±2°C振荡培养12~24小时。

(3) 种子罐菌种培养

培养基: 豆饼粉3%、麸皮3%、玉米粉3%、磷酸氢二钠0.4%、磷酸二氢钾0.03%、PH9。

罐温32~35°C、罐压0.5公斤/厘米²，通气量(参考数)1:0.5，培养10~15小时(此时PH6.5~7.0)。

(4) 发酵罐发酵

培养基: 豆饼粉3%、玉米粉3%、麸皮5%、磷酸氢二钠0.4%、磷酸二氢钾0.03%、PH8.5~9.0。

罐温32~35°C，罐压0.5公斤/厘米²，通气量(参考数)1:0.5(初期)，1:1(8小时后到放罐)、培养20~26小时左右。

(5) 盐析

发酵液加40%硫酸铵，12~24小时沉淀，加温至40°C板框压滤。

(6) 烘房干燥

烘温45°C左右。

9、AS3.2199糖化酶的生产

(1) 试管菌种培养

培养基: 10~15波美浓度麦芽汁100%、琼脂2~2.5%，2%麸皮水(5克麸皮用50毫升水煮)。

35~37°C培养6天。

(2) 三角瓶菌种培养

培养基: 麸皮和米糠之比为5:1，水120%，500毫升三角瓶装30克湿料，1公斤/厘米²灭菌1小时。

35~37°C培养4~5天。头两天各摇振一次，斜堆培养料，第三天将料摊平。

(也可应用一般红曲摇瓶培养法: 蔗糖10克、蛋白胨1克、磷酸二氢钾0.1克、硫酸镁0.05克、酒石酸0.1克、L-天门冬酰胺0.3克、水100毫升)。

(3) 种子罐菌种培养

培养基: ①玉米粉3%、豆饼粉1.5%、磷酸二氢钾0.03%、硫酸镁0.05%、消沫豆油约0.2%、PH4.0; ②豆饼粉4%、玉米粉2.5%、甘薯粉1%、硫酸镁0.075%、硫酸铵1%、PH调4.0、消沫豆油约0.2%。

罐温37±2°C，罐压0.5公斤/厘米²，通气量较一般种子罐培养大，用第一例培养

基, 培养时间24~30小时, 用第二例培养基, 培养时间35小时以上 (此时PH4.0)。

(4) 发酵罐发酵

培养基: 豆饼粉4%、玉米粉2.5% (或1.5%)、米糠1%、硫酸铵0.1%、硫酸镁0.075%、消沫豆油约0.2%、PH3.8~4.0。

罐温37~40°C, 罐压0.5公斤/厘米², 通气量同种子罐, 培养时间60小时以上 (此时PH6.3~6.5)。

(5) 盐析

发酵液加40~50%硫酸铵, 第二天压滤。

(6) 烘房干燥

烘温40~50°C。

10、AS2.1203脂肪酶的生产

(1) 试管菌种培养

培养基: 10波林浓度麦芽汁、或6~7波林浓度米麴汁 (或甘薯糖液)、2%琼脂。

25~28°C培养24小时。

(2) 茄瓶菌种培养 (同试管菌种培养)

(3) 种子罐菌种培养

培养基: 豆饼粉4%、米糠2%、硫酸铵0.2%、磷酸氢二钠0.1%、消沫豆油约0.7%、PH自然。

罐温27~30°C, 通气量 (参考数) 在14~16小时 (PH值下降), 应加大 (不低于1:1), 培养20~26小时 (此时PH4.7左右)。

(4) 发酵罐发酵

培养基: ①豆饼粉5%、米糠3%、硫酸铵0.2%、消沫豆油约0.7%、PH自然 (约PH5.8)、②豆饼粉4%、米糠3%、硫酸铵0.2%、消沫豆油约0.7%、PH自然。

罐温28°C, 通气量 (参考数) 在4~8小时 (开始升温), 应加大到1:1~1:1.5, 培养20~24小时 (此时PH5.3左右)。

(5) 盐析

发酵液加35~40%硫酸铵, 静止24~36小时后进行压滤。湿酶中加入60%工业无水硫酸钠作为疏松剂, 搅匀后烘干。

(6) 烘房干燥

烘温38~42°C, 时间约20小时。

11、3.350酸性蛋白酶生产

(1) 试管菌种培养

培养基: 5波林浓度麦芽汁、2%琼脂。

30~32°C培养3天。

(2) 茄瓶菌种培养 (同试管菌种培养)

(3) 种子罐菌种培养

培养基：脱脂豆粉3.65%、玉米粉0.625%、饲料鱼粉0.625%、豆粉水解液10%（豆粉：水：石灰 = 1 : 6 : 0.06，1公斤/厘米²蒸汽1小时）、氯化铵1%、氯化钙0.5%、磷酸氢二钠0.2%、PH5.1~5.5。

罐温30~32°C，罐压1公斤/厘米²，通气量（参考数）1 : 0.3，培养24~28小时（此时PH4.9~4.7）。

(4) 发酵罐发酵

培养基（同种子罐培养基）

罐温、罐压同种子罐培养，通气量（参考数）0~12小时 1 : 0.25，12~48小时 1 : 0.5，48~72小时 1 : 1，接种量10%，培养72小时（此时PH4.5左右）。

(5) 盐析

发酵液加55%硫酸铵，搅溶后静置24小时，装袋压滤。

(6) 烘房干燥

烘温40°C。

二、生产技术

(一) 培养基的制备

1、试管斜面培养基的制备

制备试管斜面培养基，要用洗净的试管。最好用3%盐酸将试管煮半小时，再用水冲净，烘干备用。制备时培养基的各种成份要充分加热混溶，防止灭菌后出现生料块，招致染菌。培养基的原料应有一定的规格和牌号，以使每批培养基成份一致，有利于菌种稳定生长，否则可能会影响菌种的培养。例如：不同牌号的蛋白胨，往往含有不同数量的胨和脉；不同产地的琼脂，往往使斜面培养基的硬度不同。甚至水也有关系，一般都应用蒸馏水，因为自来水中含有钙、镁，培养基在灭菌后会产生很多沉淀。

混溶好培养基料后，如果不取自然PH，可用10%氢氧化钠或20%碳酸钠调节PH。PH的调节应仔细，要少量多次加碱，否则，即使利用酸来中和过多的碱，校正了PH，也会因培养基的盐份增加，影响菌种的生长和繁殖。

培养基料调节PH完毕就可以分装试管进行高压灭菌。分装时不能让培养基料沾湿管口和棉塞，装量应恰使培养基料斜面长为管长的1/3~1/2，而且棉塞的松紧程度要适当。灭菌时要充分排除灭菌器内的冷空气和冷凝水，保证足够的灭菌温度和时间（一般为1公斤/厘米²30分钟，含糖培养基的灭菌温度要低些，否则糖份遭破坏）。灭菌结束时要防止压力下降太快，试管内培养基上窜而沾湿棉塞。

灭菌结束后应等培养基自然冷却一段时间，再放置成斜面。最后便可将制备好的培养基放在菌种最适生长温度下培养20~24小时作无菌试验，检查有无菌落生长。如果培养基上无菌生长，就可取出使用。

2、菌种扩大培养基的制备

菌种扩大培养基的种类很多，制法不一。一般来说，茄瓶或克氏瓶斜面培养基、摇瓶液体培养基，制备方法基本类似试管斜面培养基，而种子罐菌种扩大培养基则与发酵

培养基的制备方法相类似。

制备种子罐的培养基，一般先在种子罐中加入自来水，并在搅拌的情况下直接加入营养料和消泡油加温灭菌。配料的时候，原料的称量应核对，原料与水要搅匀，罐壁的料要冲净，以免料块灭菌不透。培养基的总量一般为罐容量的一半以上。培养基的实际加水量，应在总水量中去除培养基灭菌过程中直接蒸汽加热所产生的冷凝水量。冷凝水的多少与气候和设备情况有关。例如夏天要比冬天少，各罐同时进蒸汽，管道内的冷凝水被分配，比个别罐进蒸汽，罐内的冷凝水要少。有的厂估计的冷凝水量约占总水量的10~20%。加温灭菌的时候，应先将种子罐夹套中的存水放尽，以免进入夹套的蒸汽和水顶撞，使罐剧烈振动受损。如果不用夹套预热，可将夹套水放尽后在培养基中直接通蒸汽加热。当加热至一定温度时（有的厂规定90℃），就可调节各路蒸汽的进汽量，尽量相互平衡，再关闭大排汽的管路，使罐压上升。在升压过程中逐渐地开启所有排汽口，到达1公斤/厘米²压力时，要调节好进汽、排汽平衡，保持此压力灭菌半小时。各管路进汽量或进汽和排汽的相互平衡可根据罐内培养基的翻动情况来调节。如果相互不平衡，罐压就不会稳定。罐压波动将促进泡沫上升，甚至外溢，影响灭菌的进行。特别是含麸皮的培养基，灭菌时泡沫很易外溢，罐压的控制更应仔细。一旦泡沫猛增，要立即开动搅拌器，以使灭菌继续进行。为保证灭菌能彻底，必须严格掌握灭菌的温度和时间。灭菌条件应以罐内实际温度为主，罐内的压力仅作参考，并要事先检查好管路的通畅情况，以防出现“死角”。检查的方法是在每一管路进汽时看总蒸汽管路的压力表所示蒸汽压力有无下降，如果下降，即证明此路蒸汽流通良好。

灭菌结束时，应立即关闭排汽的和进汽的管路，同时通入无菌空气，使罐保持一定的压力，最后在搅拌的情况下用水冷却培养基，使罐温迅速下降至接种的温度。接种前最好取培养基进行无菌试验，以便检查生产染菌和培养基灭菌的关系。常用的无菌试验培养基是普通肉汤培养基，其成份包括，0.5%葡萄糖、0.5%牛肉膏、0.5%食盐、1%蛋白胨、0.3%酚红（PH7.1~7.2）。如果培养结果发现培养基变色、发浑，说明已染菌，镜检时可见杂菌存在。

对于需要液化处理的培养基，如BF7658枯草杆菌的培养基，可在加温到70℃时加入淀粉酶液化。加酶的数量，有的厂要加16单位/克玉米粉。

在种子罐灭菌的同时，分空气过滤器需一起灭菌。先按实际需要拆检过滤器，确保过滤介质（棉花和活性炭或涂有2124树脂酒精溶液的超细玻璃纤维纸）良好，并排除管路内的冷凝水，然后用1.5~2公斤/厘米²的蒸汽灭菌半小时，最后立即由总过滤器通入无菌空气保持一定压力和吹干介质。分过滤器的压力应比罐内的压力高，要防止罐压过高引起培养基倒流入过滤器中，浸湿介质，招致染菌。总空气过滤器的灭菌可几星期进行一次。灭菌时要先排除夹套水及器底的油污、积水，然后用2公斤/厘米²的蒸汽从过滤器上方往下方流通灭菌一次，再由相反方向流通灭菌一次，每次40分钟或更多些。同时要防止管道中的冷凝水流进过滤器，这样既能彻底灭菌，又能将残留的污水从器底先排出。灭菌结束后就可通入空气，并适当排气吹干介质。介质（用玻璃纤维好）是否已吹干，可用干玻璃片试验排出的空气干湿情况来判断。有的厂规定三个月换去部

分污湿的棉花。如果棉花全部新换，则使用两天后，还应打开过滤器再补充些棉花重新灭菌，以保证棉花厚度，防止空气走“短路”。介质的厚度可根据空气流量决定，一般不少于1米。空压机的开闭要根据贮气罐压力升降，以免棉花层裂缝，空气走“短路”。

3、发酵培养基的制备

制备发酵培养基和制备种子罐的培养基一样，仅仅由于发酵培养基量大，一般需在配料罐中将原料加水搅匀后，再用泵将料液送入发酵罐中，并用水冲净送料管，通入蒸汽灭菌。另外，由于发酵过程要用消泡剂消泡，所以发酵罐灭菌的时候，油罐需另行灭菌，不像种子罐灭菌时消泡剂加在培养基中一起灭菌。油罐灭菌时，同样先要排除有关管路的冷凝水，然后用2公斤/厘米²的蒸汽灭菌1小时；再通入无菌空气保持一定的压力，待用。如果其他管路占用蒸汽而使油罐内的蒸汽压力突然下降时，应立即采取措施调正压力，否则消泡剂会因压力骤降而外溢。因此，每当发酵罐灭菌的时候，都必须事先和供汽部门联系好，以保证应用时有足够数量的蒸汽。其次对淀粉酶的生产来说，液化所用酶量比种子罐的量要少，特别补料罐比种子罐加酶量更少。

(二) 菌种的保藏和复壮

1、菌种的保藏

微生物具有易变的特性，因此需要将菌种妥善地保藏。各种保藏菌种的方法，不外乎是将菌种置于生理代谢受抑制的条件下，如低温、干燥、隔绝空气等，以防止培养物分裂，变异。一般保藏菌种的方法如下：

(1) 斜面冰箱保藏法

斜面菌种可直接放在4~6℃冰箱中保藏。所用冰箱的相对湿度应低些，以防长霉。在保藏过程中，每隔一定时间不超过半年要移殖一次。此外，也可将试管口的棉花烧去，将棉塞推入管中，再加橡皮塞塞紧，菌种保存的时间可达两年左右。用冰箱保藏试管斜面菌种的方法，是生产上最常用且最简便的方法，适于保藏一切菌种。

(2) 液体石蜡保藏法

液体石蜡先经15磅30分钟蒸汽灭菌，再30℃恒温箱中放置三天，试验有无杂菌生长，并有利于除去其中的水份，然后将液体石蜡小心加在试管斜面培养物上，防止石蜡沾壁，使石蜡浸没斜面，使菌种和空气隔绝，然后直立放在温度较低而干燥的地方保藏。这种方法适于保藏常见的霉菌和酵母菌。

(3) 砂土保藏法

将河砂(60目过筛)经1N稀酸(盐酸或硫酸)浸泡处理二小时，再用水洗涤成中性，烘干备用。将深土用水洗涤，同样经稀酸处理、水洗和烘干后，再磨碎，经80目过筛备用。

将上述砂和土以2:1混合，分装于安瓿瓶或小试管中(约1厘米高)，进行15磅30分蒸汽灭菌。为把握起见，有的厂隔天灭三次菌。灭菌后取砂土少许放入液体培养基中作无菌试验，试验合格即可应用，否则需再灭菌。

将培养成熟的试管斜面菌种，用3~5毫升水洗下，制成菌体悬浮液。将此菌液用1毫升的无菌吸管滴入砂土管中，每管约十滴，并用接种针拌匀。然后将其放在盛有无

水氯化钙或五氧化二磷的干燥器中，更换去数次吸足水份的干燥剂后，砂土管即可干燥。如果用真空泵将盛砂土管的干燥器抽气干燥，则效果更好。最后将各个小管封口备用。此法可用来保藏孢子杆菌，放线菌和某些真菌等。

（4）麸皮保藏法

麸皮与水以1:0.8，或1:1，或1:1.5拌和（按菌种而定），装入小试管，装量约1.5厘米高，15磅30分钟灭菌，放凉后接入菌种。经适宜的温度培养，待孢子长好后，将小管放入盛有无水氯化钙的干燥器中，室温下干燥数日，最后将此小管封口备用。此法是根据我国传统的制曲方法改进而来的，适于保存常见的真菌。

（5）冷冻干燥保藏法

将 0.5×3 厘米的滤纸装入小试管内，加上棉塞进行高压灭菌。用吸管在滤纸上点上0.05毫升新鲜的浓厚菌液，并扩散到滤纸全面。用剪刀剪去露出棉塞外的部份滤纸，并把棉塞塞入管内，用煤气灯将小试管口部灼热延长，冷却后将它进行冷冻真空干燥。在真空状态下再用煤气灯将管口熔封，把此试管放在 5°C 冷藏。使用时在棉塞的中心部切断封管，在无菌状态下将滤纸拉出管外，放入肉汤培养基中，于 37°C 培养。这是一种最简便的冷冻干燥保藏法。其他的方法很多，但比较麻烦，且需一定设备装置，并要严格控制冻干时间、温度、真空度等条件。此法适于保藏各类微生物（有些不生孢子的霉菌可能不适于冻干保藏）。

在以上各种保藏方法中，斜面冰箱保藏法虽利用低温的条件使微生物生长很慢，但不可能完全避免微生物发生突变。最好的方法是冷冻干燥法。上述各种方法，除斜面冰箱保藏法外，一般都可保存一年到数年。如果保藏条件不易掌握，最好每年能转代一次，作检查培养后再进行保藏，并且最好多采用几种方法同时保藏。

无论采用哪种方法保存菌种，都应将健壮的培养物进行保藏，并切实保证保藏的条件。如果以孢子形式保存，简便而有效。一般都选择生长处于最旺盛阶段的培养物保藏。培养菌种所用的培养基以含有机氮多，含糖份较少的为好。在使用保藏菌种时，应将保藏菌种移种到培养和育种所用的同一培养基上进行活化，这样可以收到较好的保藏效果。

2、菌种的复壮

菌种的保藏虽然可使菌种不活泼，但“变”是绝对的，“不变”是相对的。在生产实践中往往会遇到菌种衰退的问题，有的是菌种的发酵力（如糖、氮的消耗）或繁殖力（如孢子的产生）下降，有的是发酵产品的得率降低，这些都给生产带来很不利的影响。因此防止菌种的衰退和使衰退的菌种复壮，这是菌种工作的另一个重要的问题。

菌种退化是指整个菌株上述种种方面的变化，是在多次接种传代中逐渐发展的过程，不是指单个细胞的变化。一般来说，培养条件引起的暂时的变化是在一次接种中显现的。至于因染菌引起产量下降和影响菌种生长，容易和菌种退化混淆，需通过划线分离来确定污染还是退化。

菌种衰退的原因有两方面：一是菌种保藏不妥；二是菌种生长的要求没有得到满

足，或是遇到某些不利的条件，或是失去某些需要的条件。此外还有经诱变得来的新菌株发生回复突变，从而丧失新的特性的情况。

由此，要防止菌种的衰退，应该做好菌种的保藏工作，使菌种的优良特性得以保存，同时应该满足其生长的要求。由于每次培养不完全一致，而且微生物存在个体差异，取得培养条件也不一致，因此要使微生物得到比较恰当的生长条件，一方面要根据微生物生长、发育特性，尽可能满足其营养的条件，避免有害因素的影响；另一方面尽量减少传代次数。因为菌种每经一次传代，就会受各种不同培养条件的影响，如营养料、水份、温度等，尤其受不利因素的影响，容易发生变异，因此传代时不要将原始菌种一次移接完，可先移出少量应用，剩下的妥当保藏好备用。此外，还应采用幼龄菌培养，老年菌较易衰退。

对于诱变菌种退化的防止，一方面要使用一些高效诱变剂（如高剂量的紫外线和低剂量的亚硝基胍联合使用），因为这些诱变剂可以得到较多的纯菌落（即是不容易退化的菌株），另一方面进行很好地纯化，将初筛得到的高产量的菌株进行单菌落分离后再行复筛。

如果发现菌株已经发生退化，产量下降，则要进行分离复壮。因为在菌种发生衰退的同时，并不是所有菌体都衰退，其中未衰退的菌体往往是经过环境条件考验的，具有更强生命力的菌体。因此，采用单细胞菌株分离的措施，即用稀释平板法或用平板划线法，以取得单细胞所长成的菌落，再通过菌落和菌体的特征分析和性能的测定，就可获得具有原来性状的菌株，甚至性状更好的菌株。对于某些菌种，还可配合其他一些办法来分离单细胞菌株，如对芽孢杆菌，可先将菌液用沸水处理数分钟，再用平板进行分离，从所剩的孢子中挑选出最优的菌体来。

如果遇到某些菌株即使进行单细胞分离，仍不能达到复壮的效果，则可改变培养条件，达到复壮的目的。如AT3.942栖土曲霉的产孢子能力下降，可适当提高培养温度，恢复其能力，同时，通过实验选择一种有利于高产菌株而不利于低产菌株的培养条件，能够得到产量较高的菌株。如果将单菌落分离和一定的培养条件相结合进行复壮，则更为有效。

此外，由于许多退化现象，原因在于基因（一种与遗传有关的物质）突变，所以使用诱变剂处理，对退化类型的菌具有杀伤力，则经诱变剂处理后再进行单菌落分离，就可得到复壮的菌株。同样道理，其他不具诱变作用的物理和化学因素也可应用于复壮处理。

（三）菌种的培养

1、试管菌种培养

菌种培养都是由保藏的菌种开始的，使用前必须转移到新鲜的试管斜面培养基上活化，才能进行扩大培养和发酵，所以，不论是深层发酵法生产酶制剂，还是固体发酵法生产酶制剂，它们的菌种培养都须先进行试管菌种培养，避免从发酵液引入自发突变体。

试管菌种培养的目的，在于获得纯而壮的培养物。用试管斜面培养基活化菌种，有三个原因：斜面培养基上的游离氧充足，不致于像不通气的液体培养基缺氧而限制生