

58.696
1096

应用微生物展览会
技术资料选编

酶制剂的生产和测定方法

应用微生物展览会编

(内部资料)

中国工业出版社

应用微生物展览会
技术资料选编

酶制剂的江苏工业学院图书馆
应用微生物展览会编
藏书章

(内部资料)

中国工业出版社

1971

内 容 简 介

本选編内容有淀粉酶、糖化酶、蛋白酶、脂肪酶、果胶酶和葡萄糖氧化酶等的深层发酵和固体生产工艺，以及这些酶的测定方法。可供从事酶制剂工作的工人、革命干部、科技人员和微生物专业师生参考。

应用微生物展览会
技术资料选編
酶制剂的生产和测定方法
应用微生物展览会編
(内部資料)

*

中国工业出版社出版发行

中国工业出版社第一印刷厂印刷

1971年9月第一版 1971年9月第一次印刷

15165·4757(綜合-52) 每册 0.30 元

毛主席语录

领导我们事业的核心力量是中国共产党。
指导我们思想的理论基础是马克思列宁主义。

备战、备荒、为人民。

阶级斗争、生产斗争和科学实验，是建设社会主义强大国家的三项伟大革命运动，……

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。

自力更生，艰苦奋斗，破除迷信，解放思想。

中国应当对于人类有较大的贡献。

前 言

在无产階級文化大革命伟大胜利发展中，广大工农兵，革命干部和革命科技人員，在毛主席无产階級革命路线和“备战、备荒、为人民”的伟大方針指引下，狠批了叛徒、內奸、工賊刘少奇的反革命修正主义科研路线，破除迷信，解放思想，大搞群众运动，土法上马，土洋結合，使微生物在工农医等方面得到广泛的应用，促进了应用微生物学的迅速发展。这是毛主席无产階級革命路线的伟大胜利，是毛泽东思想的伟大胜利。

为了满足广大革命群众的需要，进一步推动应用微生物工作的发展，我們將展出的有关技术资料，根据在工业、农业、医药上应用的情况，按內容选編成册，供同志們参考，并請有关方面根据实际应用推广的經驗，不断地修改、补充，促使这些經驗不断地完善化。

由于我們活学活用毛泽东思想不够，选編工作中定有不少錯誤和缺点，希望同志們批評指正。

应用微生物展覽会

一九七一年七月

目 录

BF7658細菌淀粉酶生产工艺	江苏省无錫酶制剂厂 (1)
JD32細菌淀粉酶固体生产工艺	山东省山东酒精总厂 (9)
利用酱渣制取淀粉酶	上海市粮油工业公司酿造实验工場 (17)
淀粉酶的生产	湖北省武汉飴糖厂 (20)
紅曲霉糖化型淀粉酶酶制剂的生产	江苏省无錫酶制剂厂 北京啤酒厂 (23) 中国科学院微生物研究所三連
AS1.398細菌蛋白酶生产工艺	江苏省无錫酶制剂厂 (27)
栖土曲霉3.942蛋白酶生产工艺	上海市工业微生物研究所 (34) 浙江省温州发酵化工厂
土法生产蛋白酶	黑龙江省哈尔滨白酒厂 (39)
碱性蛋白酶酶制剂的研制	辽宁省沈阳太阳升酒厂 辽宁省沈阳油 脂化学厂 辽宁省沈阳林业土壤研究所 (42)
5'-磷酸二酯酶	浙江省杭州味精厂 (49)
葡萄糖氧化酶的生产	山东省济南蛋品厂 (59)

葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶混合酶制剂的生产和应用

.....北京化工厂 江苏省靖江蛋品厂 江苏省
轻工研究所 中国科学院微生物研究所 (62)

果胶酶的生产.....山东省山东酒精总厂 (70)

深层发酵檸檬酸菌体提取703果胶酶

.....上海新型发酵厂 上海酵母厂 四川省
万县罐头厂 上海益民食品一厂 上海
益民食品三厂 上海梅林罐头厂 上海 (73)
华光啤酒厂 上海市工业微生物研究所

AS2.1203脂肪酶中型扩大试验

.....江苏省无锡酶制剂厂 上海丝绸工业公司
上海第二绢纺厂 中国科学院微生物研究所 (77)

菠萝蛋白酶水解酶

.....广西省南宁罐头食品厂 广西省轻工业厅
轻工研究所 中国科学院生物化学研究所 (80)

附录：酶活力测定方法

蛋白酶活力测定法一..... (83)

蛋白酶活力测定法二..... (85)

液化型淀粉酶活力测定法一..... (88)

液化型淀粉酶活力测定法二..... (90)

糖化型淀粉酶活力测定法一..... (92)

糖化型淀粉酶活力测定法二..... (93)

葡萄糖异构酶活力测定法一..... (95)

葡萄糖异构酶活力测定法二..... (98)

纤维素酶活力测定法一..... (99)

纖維素酶活力測定法二·····	(103)
半纖維素酶活力測定法·····	(105)
果膠酶活力測定法·····	(107)
5'-磷酸二酯酶活力測定法·····	(108)
谷氨酸脫羧酶活力測定法·····	(110)
葡萄糖氧化酶活力測定法·····	(112)
過氧化氫酶活力測定法·····	(113)
脂肪酶活力測定法·····	(115)
常用緩沖液配制法·····	(119)

BF7658 細菌淀粉酶生产工艺

江苏省无錫酶制剂厂

我厂广大革命工人遵照毛主席“独立自主”、“自力更生”的伟大方针，在国内外激烈的阶级斗争中，成功地生产出多种酶制剂，粉碎了苏修背信弃义撕毁协议，妄图破坏我国酶制剂工业的发展，狂言中国不能生产酶制剂的无耻澜言。无产阶级文化大革命中，在毛主席革命路线指引下，酶制剂的生产又得到了发展，成本大大降低，产量迅速增加，为我国社会主义革命和社会主义建设作出了贡献。

一、工艺流程（見第2頁）。

二、菌种

1. 菌种特征

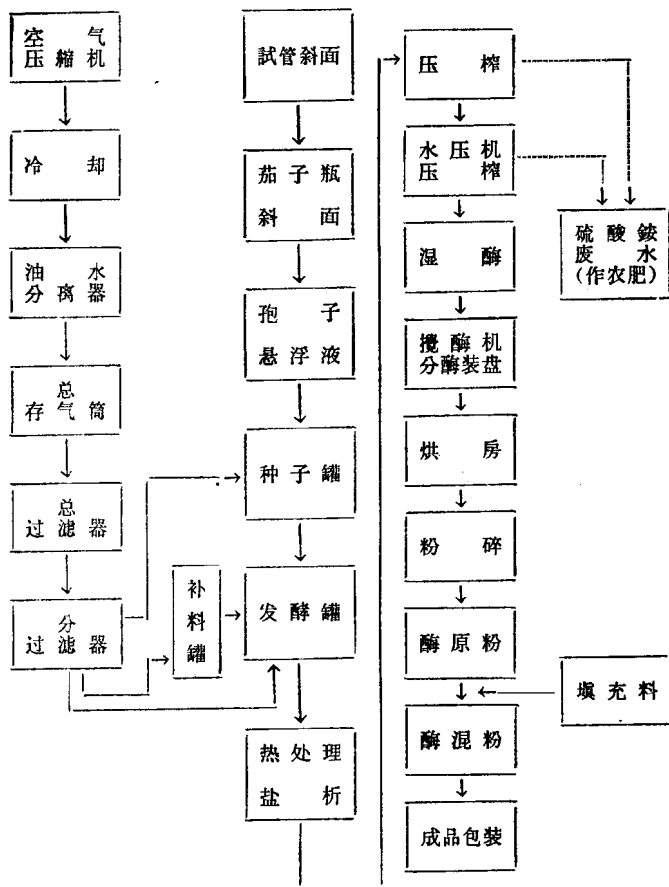
菌株系枯草杆菌（*Bacillus subtilis*），BF 7658，北京紡織工业研究所分离。該菌形态呈短杆状，两端鈍圓，单独或成对，或呈短鏈状生长，革兰氏阳性，寬1.0~1.3微米，長2.6~3.0微米，产生芽孢，需氧。淀粉培养基上菌落呈乳白色（貯久后呈灰黃色）折皺，干燥，不湿润，无光泽，边缘不規則，在含碘培养基上能产生透明圈。

2. 菌种斜面

培养基成分：

可溶性淀粉 (化学純)	氯化鈉(化学純)	蛋 白 胨 (細菌培养用)	琼 脂
2%	0.5%	1%	2%

工 艺 流 程



用 10% 氢氧化钠溶液调节 pH 在 6.7~7.0, 蒸汽灭菌 121°C, 40 分钟。

斜面接种, 在无菌室移植后, 置 37°C 培养 24~28 小时,

待乳白色皺紋狀菌落滿布斜面表面時，即成熟，取出貯存于0~5°C左右的冰箱中。抽樣經搖瓶和小罐試驗，檢測酶活性達到現生產水平者，即可應用。保藏期斜面不可超過二個月。為了防止菌種衰退，應不斷進行人工選擇。

三、種子培養

1. 設備

500升夾套種母罐，直徑70厘米，高160厘米，轉速300~330轉/分，電動機2.8瓩，具圓盤彎葉渦輪式攪拌器二檔，罐壁內裝擋板三塊。

2. 培養基配比與滅菌

按培養基200升的原料比：

名 稱	豆 餅 粉	玉 米 粉	磷 酸 氫 鈉	硫 酸 銨	氯 化 銨	水
百 分 比	4%	3%	0.8%	0.4%	0.15%	
重 量 (公 斤)	8	6	1.6	0.8	0.3	150

種子罐內先加入水，然後在攪拌的情況下將料投入，加熱到70°C，加入淀粉酶的發酵酶液（折合酶活性總計10萬單位），液化半小時。加消沫用豆油0.5公斤。繼續升溫到121°C，保持該溫度蒸汽滅菌半小時。消好後用無菌空氣保壓，同時開夾層冷卻水，使罐溫保持37°C，接種。

消罐前必須將空氣過濾器用蒸汽1.5~2.0公斤/厘米²先行滅菌半小時，保壓備用。

3. 孢子懸浮液的製備與接種

將一只茄子瓶斜面菌種，倒入少量無菌水，刮入預先滅菌過的血清瓶內（瓶內裝有300毫升滅菌過的自來水），做

成孢子悬浮液。装上接种头，罩好安全罩，以2公斤/厘米²蒸汽压力消接种管道10~15分钟，徐徐降低罐压至1公斤，用抽吸法接入种子罐内（操作时瓶压不得超过1公斤/厘米²以防发生事故）。

4. 种子培养条件

罐温 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ，罐压 0.5 ± 0.3 公斤/厘米²，过滤器罐压 $1.5 \sim 2.0$ 公斤/厘米²，通气量在0~6小时为0.2~0.3，在6~10小时为0.5，10小时以后为0.5~1.0（升空气/升醪液）。

5. 种子质量检查

培养时间约在14~16小时，pH 6.3~6.5，酶活性25~30单位/毫升左右。感官检查：嗅觉——有良好的酶味，无其他酸臭异味；镜检菌形密集，粗壮整齐，单独或成链状排列，有少量芽孢。符合以上条件者即可接入发酵罐。

四、发酵

1. 设备

10000升发酵罐，直径1.78米，高4.9米，转速为200~220转/分，10瓩~14瓩的电动机，圆盘弯叶涡轮式搅拌器二档，锯齿形泡沫浆叶一档，罐内装有冷却排管四组、挡板四块，附50升油罐一只，超细性玻璃纤维分过滤器一只。

2. 培养基配比与灭菌

为了改善细菌在发酵期间的培养环境和对物料的充分利用，采取基础料和补料的办法进行，各种成分的量见表1。

原料比为按基础料4吨、补料1.5吨。

除豆油、酶液以外的原料倒入配料罐中，加水，同时加热搅拌，定容到达3700升（基础料）。在70°C下加入发酵酶液150~200万单位，液化半小时。然后用泵打入发酵罐，继

表 1 基础料和补料成分组成

名 称	%	基础料	补 料	名 称	%	基础料	补 料
豆 餅 粉	5	200公斤	75公斤	氯 化 鈣	0.18	10公斤	
玉 米 粉	8	150公斤	300公斤	豆 油		4公斤	3公斤
磷 酸 氢 鈉	0.8	32公斤	12公斤	淀粉酶液		200万 单 位	120~150 万 单 位
硫 酸 銨	0.4	20公斤		水		4000公斤	1500公斤

續升温进行实罐消毒（灭菌条件和方法与种子罐相同），冷却到37°C进行接种。消罐后要测培养基的糖、氮量和pH。

油罐灭菌条件：2.0公斤/厘米²，灭菌1小时。

空气过滤器灭菌条件与种子罐的相同。

3. 接种操作

以2~3公斤/厘米²的蒸汽压力消接种管路1小时，将培养成熟种子接入发酵罐，接种量为4~5%。如在沒有种子的情况下，可使用倒种的方法，倒种用发酵醪作为种子。最适条件是在培养約15~20小时，酶活性約为150单位，pH在7.0左右的发酵醪，倒种后需用蒸汽冲洗管道。

4. 发酵过程中的控制

罐温37±1°C，罐压0.3~0.5公斤/厘米²，过滤器压力1.0~2.0公斤/厘米²，通气量与种子罐同，但补料后可加到1:1以上。

接种后应随时注意罐温、罐压、泡沫、pH、酶活性、菌形的变化情况，每隔半小时记录罐温、罐压、通气流量；培养到10小时即应测pH、酶活性，以后每隔2~4小时测一次，在30小时后每隔1~2小时测一次。

5. 补料

补料罐的消毒同发酵罐。

根据细菌的生长曲线，选择它产酶的最适糖、氮量和pH，对它进行中间补料，以保持和延长它最适产酶条件，这是提高酶活性和增加产量的一个十分有效的措施。根据BF 7658枯草杆菌的生长曲线，目前以控制pH不超过7为宜，一般在发酵10~12小时即可到达，便进行补料。为了使罐内pH变化不致过大，补料应按少量多次的原则进行。习惯的办法，补料一般分5~6次补入，每次补料量，应由pH值高低及升温情况来决定，在通常情况下，每次约补200~300升，放罐前10小时停止补料。

6. 发酵成熟放罐的条件：发酵成熟时有以下指标。

表 2 发酵成熟的指标

编 号	项 目	具 体 要 求
1	培养时间	约在35~40小时
2	pH值	在7.8~8.0
3	泡沫和温度	均不再上升，反有下降趋势
4	镜检菌形	营养体已少于芽孢
5	酶活性	二次测定酶活性单位相近

以上五个指标应综合分析，及时地掌握放罐时机，以防酶活下降。

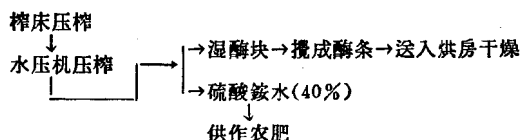
五、淀粉酶的提炼

1. 热处理和盐析

发酵结束后，即放入热处理罐。按5吨量计算，一面搅拌一面加入2%的含水氯化钙和0.8%的磷酸氢二钠，如果醪液体积超过5吨量，则多余部分按上述比例补加。然后加热到50~55℃维持半小时，冷却到35~38℃，调pH到6.7，

再加入硫酸銨（冬天用量為40%，夏天為42%），加完後繼續攪拌一小時，靜置16~24小時，再進行攪拌，用泵送往壓榨車間（冷天在泵送前可以加溫到35°C，以利壓榨）。

2. 壓榨



3. 干燥、粉碎、包裝

干燥溫度40°C，每隔6~8小時翻搓一次，基本上烘干後用粉碎機粉碎，再通過氣流干燥。注意調節電熱器，控制進風溫度在 $130 \pm 5^\circ\text{C}$ ，使氣流干燥終端出粉品溫不超過55°C，再經過粉碎機粉碎過篩（40目/時²），所得為淀粉酶原粉。測定原粉酶活力以後，用干燥過的硫酸銨將原粉稀釋配成2000（酶活力單位/克），在混粉機內混和均勻，經復測合格後進行包裝。為防止在貯藏期內可能發生的活性損失，故在計算時，每1000單位均需另加30活力單位保險因數。

六、淀粉酶（粉劑）質量標準

BF7658淀粉酶質量標準見表3。

表 3 BF7658 淀粉酶質量標準

序 号	項 目	產 品 規 格 和 質 量 指 標
1	外 觀	灰白色粉末狀
2	細 度	全部粉劑通過40目篩
3	酶 活 力	1000(單位/克)和2000(單位/克)二種
4	溫水不溶物	40%以下
5	水 分	8%以下
6	產 品 包 裝	聚乙烯塑料袋包裝，每袋淨重一公斤

七、主要原料的規格

1. 玉米粉：外觀黃色，無霉變味，細度全部能通過40目篩，含水分12~14%，總糖65~75%，粗蛋白質9.2~13%，粗脂肪4~5%，粗纖維2~3%，灰分1.3~1.5%。

2. 豆餅粉：外觀淡黃色，無霉壞味，細度全部能通過40目篩，含水分12~14%，總糖21%，粗蛋白45%。

八、注意事項

1. BF7658細菌澱粉酶對pH極為敏感，在pH6~8之間穩定，過低過高即造成酶活力的損失。因此，在提煉過程中應隨時注意pH的變化。

2. 如遇汞溫度計損壞，則各班應及時注意設法處理，以防止汞引起的汞中毒。處理時可以將汞回收在具有嚴密封口的汞瓶中；不能回收者可將硫磺粉洒在汞珠處，使其變成硫化汞，取出深埋土中。

3. 如在發酵前期發生染菌，可將發酵液進行滅菌，重新接種。如在後期發生染菌，放罐後，應認真清洗設備，更換過濾器，並進行空罐滅菌。同時研究染菌的原因，設法改進。

JD32細菌淀粉酶固体生产工艺

山东省山东酒精总厂

我厂革命职工在毛主席革命路线指引下，自力更生，艰苦奋斗，土法上马，土洋结合，根据我国制酒的丰富经验，摸索出 JD32 细菌淀粉酶固体生产工艺。固体生产酶制剂的工艺设备可土可洋，生产规模可大可小，尤其适合于县级酒厂或小厂生产酶制剂，为发展我国酶制剂工业提供了一种生产方式。现将生产工艺介绍如下。

一、细菌淀粉酶生产工艺流程

试管斜面→一级种子摇瓶→二级种子摇瓶→三级种子罐→
固体厚层通风培养→气流烘干→粗品。
↓
酶液浸提→压滤→调节pH→离心→冷冻→酒精沉淀→
离心→浓酒精洗涤→低温干燥→粉碎→成品。

二、试管原菌培养

1. 菌种

(1) 菌种的形态特征：JD32 细菌是从地瓜（山芋、白薯）的附土中分离，并经选育得到的一株枯草杆菌，能产生淀粉酶和蛋白酶。