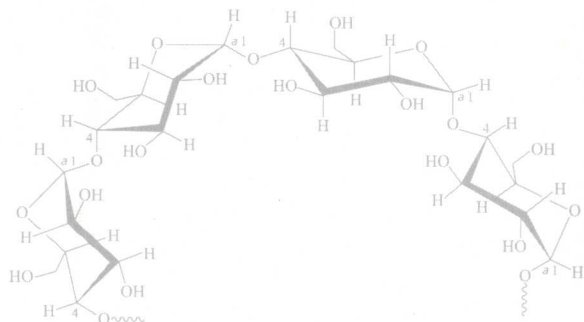


Industrial Enzymes for Bioethanol Production:
Technology and Application

新型酒精工业用酶制剂 技术与应用

段钢◎著



化学工业出版社

Industrial Enzymes for Bioethanol Production:
Technology and Application

新型酒精工业用酶制剂 技术与应用

段 钢◎ 著



化学工业出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

新型酒精工业用酶制剂技术与应用/段钢著.

北京: 化学工业出版社, 2010.1

ISBN 978-7-122-07237-5

I. 新… II. 段… III. 乙醇-酶制剂

IV. TQ223.12

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 226185 号

责任编辑: 孟 嘉

文字编辑: 张春娥

责任校对: 徐贞珍

装帧设计: 王晓宇

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 14 字数 316 千字 2010 年 3 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 68.00 元

版权所有 违者必究

序 言

自 2000 年起，我国在部分省市开始了由生物燃料酒精调配的车用乙醇汽油的试点工作。2008 年，我国燃料酒精的使用量已达到 150 万吨，成为继美国、巴西之后，世界第三大燃料酒精生产国。燃料酒精的使用对增加农民收入，减少汽车尾气中碳氧化物、碳氢化物的排放，以及对缓解我国经济高速发展带来的能源紧张问题都产生了巨大影响。

我国也是传统的食用酒精生产国。2008 年，食用酒精产量达到 420 万吨。其中，约有 50% 用于白酒调配，另外 50% 分别用于医药、化工、食品和化妆品等领域。食用酒精同时也是最安全的有机溶剂之一。因此，食用酒精的生产也在国民经济的各行业中发挥着重要作用。

虽然如此，我国的燃料酒精和食用酒精的生产技术与国际先进水平，尤其是在以谷物为原料、以双酶法为核心的酒精生产技术的关键环节上与美国等国家差距较大。酶是生物技术的核心和基础。对燃料酒精和食用酒精的生产来说，我国在对酶的复混、调配和使用上还存在较多的误区和缺陷，因此导致了酶的效力发挥不彻底，进而导致了原料、公用工程以及辅助化学品消耗的增加。随着以基因技术为核心的生物技术的发展，以及对酶的制造、储存和使用等的认识不断深入，再加上新品种的谷物燃料酒精和酒精生产用酶的不断推出，都对生产企业如何正确使用酶、最大程度地发挥酶的作用带来了新的挑战。因此，如何既能在理论上有清晰的指导，又能在实践中解决这些问题的要求就显得更为迫切了。酶对燃料酒精和酒精的生产技术进步起着极为重要的作用。在某种程度上，每一次酒精技术的革命，都伴随着新型酶的引入而发生。因此，正确掌握酶的使用技术对燃料酒精和酒精生产的技术水平的提高尤其重要。

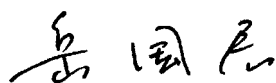
认识段钢博士在十多年前，当时我还在工厂（华润酒精）做总工程师。段钢博士不仅给工厂引入了新的酶制剂品种，还在酶的使用技术上对相关技术人员进行了培训。他与基层技术人员一起，针对新型酶的使用不断调整和改进工艺，为整个燃料酒精和酒精的生产技术水平的提高做出了重要贡献。段钢博士理论功底深厚、实践经验丰富，富有创新思维，解决问题思路清晰，在工业酶的应用技术研究和生产实践方面拥有丰富经验，特别是在谷物加工和生物酒精生产用酶方面有独到见解。

本书的许多章节来自于段钢博士自身对酶使用实践的认识。语言通俗，技术介绍由浅入深，书中大量应用图形、图表来形象地阐述复杂的理论问题，可读性强。因为酶是典型的面对对象解决问题的产品，所以本书不但详细介绍了燃料酒精和食用酒精方面的新型酶和酶技术，还包括了一些生产过程问题和过程中技术问题的阐

述。因此，本书就更加适合于从事酶的使用和应用方面的技术人员阅读。

相信《新型酒精工业用酶制剂技术与应用》一书对我国燃料酒精和食用酒精生产中新技术的应用、对我国在该领域的生产和技术水平的提高都会起到一定的促进作用。

我非常愿意将此书推荐给读者和我的同行们。

Handwritten signature of Yao Tongjun in black ink.

中粮集团生化能源事业部

总经理、高级工程师

前言

酒精的生产从人类历史有记载就开始了。古埃及人通过蔬菜自然发酵来制酒精，我国人民从古代就掌握了蒸馏技术用来提高发酵液的酒精浓度。酒精除了可应用于饮食外，还可以用作燃料。1907年，亨利·福特设计的第一辆车就是用酒精来驱动的，后来石油工业的发展使得汽油成为了主要燃料。另外，用酒精也可以生产化工原料，如乙醇胺、环氧乙烷、乙二醇等都可以用生物酒精来生产，这里讲的生物酒精是指从发酵过程生产的乙醇。以乙醇为原料可加工生产100多种产品，其中的重要产品有60多种，目前国内需要大量进口的有10多种。由于日益严重的能源危机和环境问题，再加上生物技术的高速发展等诸多因素，近年来生物酒精的发展速度非常快。在过去的几年里，其市场几乎每年都以大于20%的速度增长；很多大的化工、石化和生物技术公司，以及大学、政府和研究单位等都斥资研究以淀粉质为原料的第一代和以木质纤维素为原料的第二代酒精的生产。

从酒精生产技术的发展来看，新的酶技术与酒精生产的进步是密切相关的。分子生物学、生物化学、蛋白质组学、生物化学工程等学科的发展，以及高通量筛选工具的应用，促使各种新的高性能的酶种被开发出来，且工业化的速度也越来越快。这些酶技术的发展又大大促进了酒精工业的技术革新和发展。作者希望本书的出版能为酒精的生产提供更好、更新的酶技术；为与酒精相关的科研选题提供前沿的背景和方向；为新的工程设计提供新的工艺。

作者有幸在世界著名生物工程公司杰能科工作，有应用酶制剂服务于酒精行业的多年经验，且参加过很多国际会议并进行大会报告，也参观服务过很多不同类型的工厂，这使得作者有较全面并独特的视角来看新型酒精工业用酶制剂的问题。

本书共分5章。第1章简单介绍了酶和酶制剂，及其未来发展趋势，以及酒精生产技术和应用酶制剂的酒精生产过程。第2章展示了很多新型的酶制剂在当前酒精生产过程中的应用，具体阐述新的液化酶、糖化酶、蛋白酶和黏度降低酶等对过程效率的提高，其中新型植酸酶的应用及液化系统是全新的概念。第3章阐述了生料酿酒的基本工艺、复合酶的概念和作用方式，并依据原料分类展开。继而介绍了生料过程可提高酒精的产出率，并且对节水、节能和减少污染都有很大帮助。第4章叙述了酶制剂在非淀粉质领域的应用，不仅全面介绍了在科学、技术和工程上都具有挑战性的纤维素酒精的研究结果，还包括了一些以前认为不需要酶制剂或酶制剂没有帮助的领域。如糖蜜发酵中新酶制剂的应用，可使糖蜜中的非发酵成分变成可发酵糖，从而提高原料的酒精转化率，并减少废水处理的压力。第5章简单介绍了生物炼制（Biorefinery）的概念，以及对与酒精生产有关的生物炼制技术的展望。

本书的内容介绍了很多酶制剂在酒精生产中发挥的明显作用，充分显示了酶制剂的奇妙性，然而酶制剂本身不能创造奇迹，一定要提供合适其发挥作用的条件。著名的《酒精教科书》(Alcohol Textbook)的作者曾指出：因为(近来)有很多新酶，包括木聚糖酶、半纤维素酶、酯酶等其他酶的出现，液化系统一定要有足够的弹性来使用它们，目的是使酶的作用得到充分发挥而使酒精的产率最大化，而不是要酶制剂来适合现有的工程设计。这也就是本书要讨论的如何在酒精生产中要考虑发酵的具体条件，来使酶制剂和酵母的配合达到最佳，从而使转化率高，经济效益最优。

在本书的编写过程中，得到了杰能科公司很多专家和同事的支持和帮助，如 Dr. JK Shetty，他的渊博知识和教导使我受益匪浅，是他的不断鼓励才使我在所做的工作中有所进步；同时也感谢杰能科公司的其他同事 Gerhard K-Janda, Dr. OJ Lantero, Craig Pilgram, Dr. Gopal Chotani 等。我也要特别感谢我无锡的同事：许宏贤、钱莹、周红伟、阮振华、刘飞、李艳萍和赵振峰等，没有他们的辛勤和创造性的工作，书中很多内容就不会在此出现。杰能科的姜锡瑞先生的多年经验和建议也对作者颇有帮助。此外，我也要特别感谢在写作中一直给我支持和鼓励的亲人。

最后，衷心感谢化学工业出版社各位编辑，是他们的辛勤劳动和建设性的意见，才使本书得以与读者见面。由于时间和作者水平有限，书中难免有不足和偏颇之处，恳请读者、专家和学者批评指正。

这本书献给我最亲爱的妈妈棣华！

段 钢

2009 年，上海

目 录

第 1 章 概论

1

1.1 酶制剂的基本知识	1
1.1.1 酶的定义及分类	1
1.1.2 酶的构型及催化机理	2
1.1.3 工业酶的发展及市场	4
1.2 世界各国生物酒精生产概况	10
1.2.1 巴西	10
1.2.2 美国	11
1.2.3 欧洲	13
1.2.4 澳大利亚	14
1.2.5 印度	14
1.2.6 泰国	14
1.2.7 我国生物酒精发展现状	14
1.3 生物酒精发展条件分析	15
1.4 生物酒精生产过程及成本分析	16
1.4.1 生物酒精生产过程	16
1.4.2 生物酒精生产成本分析	18
1.5 生物酒精工业面临的挑战	20
1.5.1 原料价格	20
1.5.2 能源价格增长	20
1.5.3 环保压力	21
1.6 酒精生产的发展趋势	21
1.6.1 原料多样化	21
1.6.2 工厂设计大型化	23
1.6.3 技术/操作先进化	23
1.7 工业酶制剂的进步对生物酒精工业的影响	24

第 2 章 新型酶在传统酒精生产工艺中的应用

26

2.1 淀粉质原料的基本结构及水解	26
-------------------------	----

2.1.1	淀粉质原料的结构	26
2.1.2	淀粉的糊化和液化	28
2.1.3	糖化过程	32
2.2	酒精生产用各种酶制剂的介绍和新酶的应用	33
2.2.1	α -淀粉酶	33
2.2.2	糖化酶	41
2.2.3	普鲁蓝酶	45
2.2.4	酸性蛋白酶	45
2.2.5	纤维素酶和半纤维素酶	59
2.2.6	植酸酶	74
2.2.7	果胶酶	77
2.2.8	复合酶	80
2.3	影响酒精发酵中酵母功能的因素	83
2.3.1	酵母的酶系	83
2.3.2	酵母酒精发酵过程	83
2.3.3	影响酵母发酵的因素	84
2.4	其他酒精发酵菌的种类和发展方向	85
2.5	传统工艺的问题与酶解决方案	85

第3章 生料复合酶

87

3.1	生料制酒的发展过程回顾	88
3.2	生料酶的作用原理及影响酶作用的因素	90
3.2.1	作用机理	90
3.2.2	影响因素	92
3.2.3	新型生料酶 STARGEN TM	95
3.3	以玉米为原料的生料发酵	96
3.3.1	pH 对 STARGEN TM 酶作用效果的影响	96
3.3.2	原料颗粒大小对 STARGEN TM 酶作用的影响	96
3.3.3	不同玉米淀粉与 STARGEN TM 酶作用效果的关系	97
3.3.4	酶添加量对于发酵的影响	98
3.3.5	酸性蛋白酶对玉米生料发酵的影响	98
3.3.6	生料水解酶 STARGEN TM 对玉米发酵的益处	101
3.4	大米的生料发酵制酒	102
3.4.1	颗粒对大米生料发酵的影响	103
3.4.2	颗粒淀粉酶添加量对发酵的影响	105
3.4.3	发酵温度对生料大米发酵的影响	106

3.4.4	传统高温发酵与生料发酵新工艺的比较	106
3.4.5	大米生料水解发酵在米酒（黄酒）生产上的应用	113
3.4.6	大米蛋白	117
3.5	以高粱为原料的生料制酒	117
3.5.1	高粱的组成和对传统过程的影响	117
3.5.2	高粱的生料过程	120
3.5.3	新过程与传统工艺的比较	122
3.5.4	脱壳对加工的影响	123
3.5.5	与玉米混合发酵	124
3.5.6	DDGS 中的植酸含量分析	124
3.6	小麦生料制酒过程	125
3.6.1	全磨小麦	126
3.6.2	小麦淀粉/脱谷朊粉的淀粉浆的生料酒酒精发酵过程	137
3.7	大麦生料发酵	141
3.7.1	大麦的组成	141
3.7.2	大麦生料预处理过程和黏度变化	142
3.7.3	不同干物下的发酵结果	143
3.7.4	与传统过程的产酒和 DDGS 质量的比较	144
3.8	木薯生产酒精的新过程	145
3.8.1	木薯的生产和加工	145
3.8.2	木薯生产酒精与其他原料的产量和成本对比	146
3.8.3	新鲜木薯生产酒精的新过程	149
3.9	甘薯/马铃薯	154
3.9.1	鲜薯的 STARGENTM 过程和传统过程的比较	155
3.9.2	薯干的生料发酵制酒	157
3.9.3	马铃薯生料水解的研究	158
3.10	生料发酵间歇补料酒酒精生产新工艺	158
3.10.1	传统生料发酵酒精生产工艺	159
3.10.2	生料发酵间歇补料酒酒精生产新工艺	159
3.11	生料酒酒精与传统酒精的进步及应用中应注意的问题	163
3.11.1	颗粒尺寸的控制	163
3.11.2	搅拌混合问题	163
3.11.3	染菌的控制	163
3.11.4	温度的控制	164
3.12	总结与展望	164

4.1 酒精生产原料的发展趋势 166

4.2 以糖蜜/糖汁为原料酒精的生产..... 168

 4.2.1 糖蜜的类型 168

 4.2.2 糖蜜的组成 168

 4.2.3 非发酵组分的酶转化 170

 4.2.4 糖蜜的酒精发酵过程和复合酶的应用 172

 4.2.5 糖汁用于酒精发酵 174

4.3 木质纤维素和酒精的生产 175

 4.3.1 木质纤维素的组成和处理过程 175

 4.3.2 酶水解和糖化发酵过程 179

 4.3.3 纤维素酶研究进展 182

 4.3.4 挑战 185

 4.3.5 国内外产业化进程 186

第 5 章 未来生物技术的展望和对酒精生产的影响 **190**

5.1 生物精炼、过程集成和酒精的生产 190

 5.1.1 生物精炼厂的概念 190

 5.1.2 以谷物为基础的生物精炼 192

 5.1.3 以木质纤维素为原料的生物精炼 197

 5.1.4 过程集成 200

5.2 生物技术进步对酒精生产可能产生的影响 203

 5.2.1 对酶制剂/酶工程的要求..... 203

 5.2.2 对发酵菌株的要求 204

参考文献 **207**

第1章

概论

由淀粉质原料生产酒精的有关化学工程方面的重大革新已在 20 世纪完成，而生物技术所带来的变革正方兴未艾。酶制剂作为高效率的生物催化剂，其的进步对谷物加工行业的影响巨大，酒精的生产亦不例外。

在谈及酶制剂在酒精方面的具体应用前，有必要先简要介绍酶、酶制剂和工业酶制剂的简单生产过程。

1.1 酶制剂的基本知识

1.1.1 酶的定义及分类

1.1.1.1 酶的定义和特性

酶是由活细胞产生的、催化特定生物化学反应的一种生物催化剂。酶制剂是指酶经过提纯、加工后的具有催化功能的生物制品。

酶的特点为：可使化学反应在温和的条件下进行；可使自然化学反应进行得更快；可进行合成反应，也可进行分解反应。

作为生物催化剂，酶可使化学反应加快，但并未改变化学反应本身；酶加快化学反应是因为降低了反应的活化能。不同的酶能进行不同的催化作用。酶的催化具有特异性，不同的酶催化不同的反应。

1.1.1.2 酶的分类

迄今为止，科学家们已发现有上万种酶，因此有必要对酶分类。国际通用分类方法是按照酶发挥催化作用时，电子、原子或功能团的转移类型来进行的。1961 年国际酶学委员会将酶分为六大类，包括氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂解酶类、异构酶类以及连接酶类（表 1-1）。关于说明作用的键及位置细节的分类，这里不赘述，很多关于酶制剂的书籍皆有介绍（张树政，1984），读者感兴趣可查阅相关资料或文献。

在工业上，应用最广泛的是水解酶类。如生产淀粉糖和淀粉质酒精的淀粉酶、糖化酶、普鲁蓝酶、纤维素酶/半纤维素酶（木聚糖酶）以及葡聚糖酶等；异构化酶在果糖生产上的应用也非常广泛。

表 1-1 酶的分类、反应和应用

类 别	典型反应示意	工业用酶
EC 1. 氧化还原酶 (oxidoreductase)	$AH + B \longrightarrow A + BH$ (还原) $A + O \longrightarrow AO$ (氧化)	过氧化酶(catalase)
		葡萄糖氧化酶(glucose oxidase)
		漆酶(laccase)
EC 2. 转移酶类 (transferase)	$AB + C \longrightarrow A + BC$	果糖基转移酶(fructosyl transferase)
		葡萄糖基转移酶(glucosyl transferase; transglucosidase)
EC 3. 水解酶 (hydrolase)	$AB + H_2O \longrightarrow AOH + BH$	淀粉酶(amylase)
		纤维素酶(cellulase)
		脂肪酶(lipase)
		果胶酶(pectinase)
		蛋白酶(protease)
		普鲁蓝酶(pullulanase)
EC 4. 裂解酶(lyase)	$RCOCO\text{OH} \longrightarrow RCOH + CO_2$	果胶酸裂解酶(pectate lyase)
		α -乙酰脱羧酶(α -acetolactate decarboxylase)
EC 5. 异构化酶(isomerase)	$AB \longrightarrow BA$	葡萄糖异构化酶
EC 6. 连接酶(ligase)	$X + Y + ATP \longrightarrow XY + ADP + P_i$	未工业化

1.1.2 酶的构型及催化机理

1.1.2.1 酶的构型

酶分子在空间上有一定的结构和构型，只有保持一定的构型才能发挥其特定的功能，如图 1-1 所示（针对蛋白质性质的酶）。蛋白质的初级结构是一系列的氨基酸通过链式反应而排列为一定的顺序。肽键是蛋白质中氨基酸之间的主要连接方式，即由一个氨基酸的 α -氨基和另一个氨基酸的 α -羧基之间脱去 1 分子水而相互连接。肽键具有部分双键的性质，所以整个肽单位是一个刚性的平面结构。多肽链含有游离氨基的一端称为肽链的氨基端或 N 端，而另一端含有一个游离羧基的称为肽链的羧基端或 C 端。

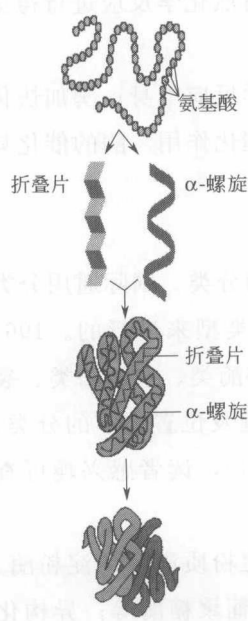


图 1-1 酶的构型示意

蛋白质的二级结构是指多肽链骨架盘绕折叠所形成的有规律的结构。最基本的二级结构类型有 α -螺旋结构和 β -折叠结构，此外还有 β -转角和自由回转。右手 α -螺旋结构是在纤维蛋白和球蛋白中发现的最常见的二级结构，每圈螺旋含有 3.6 个氨基酸残基，螺距为 0.54nm，螺旋中的每个肽键均参与氢键的形成以维持螺旋的稳定。 β -折叠结构也是一种常见的二级结构，在此结构中，多肽链以较伸展的曲折形式存在，肽链（或肽段）的排列可以有平行和反平行两种方式。

蛋白质的三级结构是整个多肽链的三维构象，它是在二级结构的基础上，多肽链进一步折叠卷曲形成复杂的球状分子结构。具有三级结构的蛋白质一般都是球蛋白，这类蛋白质的多肽链在三维空间沿多个方向进行盘绕折叠，形成十分紧密的近似球形的结构，分子内部的空间只能容纳少数水分子，几乎所有的极性 R 基都分布在分子外表面，形成亲水的分子外壳，而非极性的基团则被埋在分子内部，不与水接触。蛋白质分子中侧链 R 基团的相互作用对稳定球状蛋白质的三级结构起重要作用。

蛋白质的四级结构是指数条具有独立三级结构的多肽链通过非共价键相互连接而成的聚合体结构。在具有四级结构的蛋白质中，每一条具有三级结构的肽链称为亚基或亚单位，缺少一个亚基或亚基单独存在都不具有活性。四级结构涉及亚基在整个分子中的空间排布以及亚基之间的相互关系。

维持蛋白质空间结构的作用力主要是氢键、离子键、疏水作用力和范德华力等非共价键，又称次级键。此外，在某些蛋白质中还有二硫键，二硫键在维持蛋白质构象方面也起着重要作用。蛋白质的空间结构取决于它的一级结构，多肽主链上的氨基酸排列顺序包含了形成复杂的三维结构（即正确的空间结构）所需要的全部信息。

1.1.2.2 酶的作用机理

酶是如何工作的？特定的酶会结合特定的底物，好像图 1-2 所示的钥匙和锁。酶通过“抓住”或与底物结合来对其施压，使反应活化能降低，从而使反应更容易进行，过程中不需要高温、高压等苛刻条件来克服高的反应活化能。

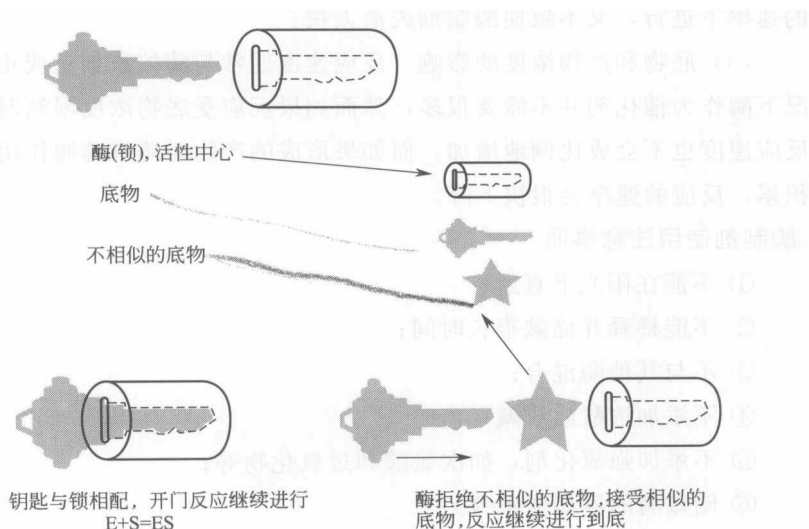


图 1-2 酶和底物作用的锁匙机理

1.1.2.3 影响酶作用的因素

总体来讲，影响酶制剂工作效率的因素有：时间，温度，pH，底物/产物的浓度，激活酶需要的一些金属离子等辅助因子，抑制剂，以及酶的浓度等。

(1) pH 上文提到的酶的构型,其随着 pH 的变化而变化,并可能最终导致酶失活,因此,酶的活力是 pH 的函数。那么, pH 是如何影响酶的活性的呢? 具体示意如图 1-3 所示, pH 对酶活力的影响如下所述。

因为 pH 的变化从而改变稳定构型的平衡力,进而改变氨基酸侧链的离子化,因此影响活性中心形成产品的能力。

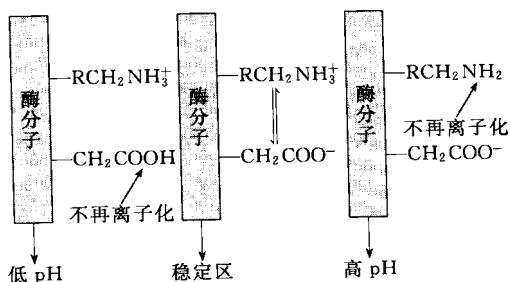


图 1-3 酶分子离子化的示意

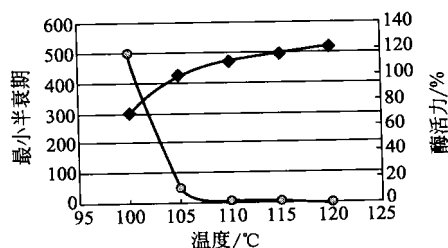


图 1-4 温度对酶活力和半衰期的影响

—○—半衰期; —◆—酶活力

(2) 温度 温度对酶活力和半衰期的影响见图 1-4。

酶作为催化剂,同其他催化剂一样,其本身在反应中不消耗,然而由于酶又是生物催化剂,容易失去活性,其应用的条件会影响到其催化的反应速率及其失活速率(如半衰期,即酶活力衰减为最初值一半的时间)。

酶在实际使用中,因为工业应用的条件通常比较苛刻,如高温、极端 pH 等,很容易失活,因此要考虑最优使用条件和失活条件之间的平衡,使反应能在可接受的速率下进行,又不致使酶制剂失活太快。

(3) 底物和产物浓度的影响 反应速度通常与酶的添加量成正比,且在通常情况下酶作为催化剂并不需要很多,然而如果反应受底物浓度限制时,即使多添加酶反应速度也不会成比例地增加。而如果形成的产物对酶有抑制作用,随反应产物的积累,反应的速率会很快下降。

1.1.2.4 酶制剂使用注意事项

- ① 不能在阳光下直射;
- ② 不能稀释并储藏很长时间;
- ③ 不与其他酶混合;
- ④ 不添加浓酸或浓碱;
- ⑤ 不添加强氧化剂,如次氯酸和过氧化物等;
- ⑥ 储藏酶的容器要密封。

1.1.3 工业酶的发展及市场

1.1.3.1 工业酶的发展和主要来源

到目前为止,在自然界中发现的酶共有几千种,申请专利的酶制剂有几百种,其中有较大经济价值的只有 60 多种。从世界范围而言,在酶制剂的总产量中,

55% 是水解酶，主要用于焙烤、食品、酿酒、淀粉加工、酒精等工业；35% 是蛋白酶，主要用于食品洗涤剂、动植物蛋白、制革、乳品等加工行业。

早在 20 世纪初，在德国就有工厂开始生产枯草杆菌淀粉酶来代替麦芽淀粉酶用于纺织行业；40 年代，随着抗生素行业的发展，深层培养技术被应用于淀粉酶的生产，酶制剂行业步入了工业化时代。

发酵法是工业酶的主要生产方法，虽然从动植物也可提取，但因为微生物的种类多、繁殖快以及容易培养和代谢能力强等特点，酒精行业生产中所使用的酶几乎全部都是用发酵法来生产的。常用的产酶微生物有以下几种。

- 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)，此菌应用很广，可用于多种酶的生产，如 α -淀粉酶、蛋白酶和葡聚糖酶等。

- 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)，可生产多种酶，但一般都属于胞内酶，需经过细胞破碎才能分离得到。在酒精行业基本没有应用。

- 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)，可生产很多酶，有胞内酶，也有胞外酶。在酒精行业上使用最多的是糖化酶，还有酸性蛋白酶和果胶酶等。

- 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)，主要用于生产糖化酶和蛋白酶等。

- 青霉 (*Penicillium* sp.)，主要用于生产葡聚糖氧化酶、果胶酶等。

- 木霉 (*Trichoderma* sp.)，此菌是生产纤维素/半纤维素酶的重要菌种。

- 根霉 (*Rhizopus* sp.)，也可用于很多酶的生产，包括酒精生产上常用的糖化酶、酸性蛋白酶和果胶酶等。

- 毛霉 (*Mucor* sp.)，主要用于生产蛋白酶、糖化酶等。

- 链霉菌 (*Streptomyces* sp.)，是生产葡萄糖异构化酶的主要菌种，也可以生产木聚糖酶等。

- 啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)，会产生很多酶，但基本上用于酒精生产的发酵，很少用于单酶提取。

- 假丝酵母 (*Candida* sp.)，生产优良的脂肪酶和其他特种酶。

- 嗜热地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 以及嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 则是酒精行业中非常重要的热稳定 α -淀粉酶的来源。

1.1.3.2 菌种的筛选和发展

(1) 菌种的筛选 若要高效、经济地生产酶制剂，菌种的选择和优化是非常重要的。能应用于工业生产的产酶菌株要符合如下几个条件才可用于大生产。

- 酶产量高；

- 容易培养和管理；

- 产酶的稳定性好，不易退化；

- 易于进行酶的分离，但由于分离的费用在生化/化工过程中总是占较大的成本，因此，胞外酶在工业上是非常重要的；

- 安全可靠。

菌种筛选方法如下。

① 自然分离筛选。自然分离筛选是传统的,但仍然使用的一种方法。该法简便易行,可达到纯化菌种、防止退化、稳定生产,以及提高生产水平的目的。但自然分离筛选的效率比较低。

② 分子筛选。绝大多数酶是氨基酸以一定顺序键合起来的聚合物。氨基酸的顺序可通过 N 端顺序来测定。因为基因码是通用的,因此有可能预测对于某个酶可能的核苷酸顺序。利用这样的信息可构建一个由 15~20 个核苷酸以正确的顺序组成的探针,因为 DNA 的双螺旋结构,它会结合到副链上。通过对有关组织的染色体 DNA 使用聚合酶链式反应 (PCR),使用其主链,同系的基因就可放大并转移到宿主组织中,产生同系酶。在实际应用中,新酶可能与最初的酶有着不同的性质,如改善的热稳定性和 pH 稳定性等。这样一来,有关组织的序列均可被筛选到。所有的依相似性筛选的分子方法都有一个很大的缺点,那就是依赖于已经存在的数据相比较。

③ 环境筛选。以往从环境中得到的样品通常需要培养,现代的技术进步使得直接从环境中得到的样品中提取 DNA 甚至 RNA 成为可能。虽然有很多技术可用于提取 DNA,但不是所有的细胞均可被分解,因此, DNA 不能被 100% 提取。还有一个问题就是组织中含量比较少的部分,它们的 DNA 也会比较少,除非特别处理。这些得到的 DNA 可按上述的分子方法来寻找已知基因。

(2) 酶性质的改进 来源于自然界或自上述各种方法得到的酶的性质往往不一定适合工业上的应用条件,因此需要进一步改进。改进的方法是可采用蛋白质工程 (protein engineering)。蛋白质工程应用组合的工具可通过在蛋白质氨基酸顺序上的任何一个氨基酸被其他 19 个氨基酸中的一个代替而改变蛋白质的性质。基因编码的改变也可通过引入非自然氨基酸而达到。这些变化可以是直接在某一位置或在整个主链的随机扩展。

蛋白质工程的建立是在基因工程的基础上,利用 DNA 重组技术,结合 X 射线晶体学、核磁共振 (NMR) 等技术的进步促进了对蛋白质 3D 结构的进一步了解。加上计算机的计算功能及图形化和辅助设计功能的提高等;结合诱变、错配 PCR 等技术和蛋白质化学等多学科的基础知识,通过对基因的人工定向改造等手段,达到对蛋白质进行修饰、改造、拼接以产生能满足人类需要的新型蛋白质的目的。蛋白质工程又称为第二代基因工程。蛋白质工程的基本途径是从预期功能出发,设计期望的结构,合成目的基因且有效地克隆表达或通过诱变、定向修饰和改造等一系列工序,合成新型优良蛋白质。蛋白质工程可分为两类,即合理设计 (rational design) 和定向进化 (direct evolution)。定向进化也称为分子进化 (molecular evolution)、分子培育 (molecular breeding) 或非合理设计 (irrational design) 等。

合理设计是 20 多年前,随着 DNA 重组和定点突变技术的发展而引入的,至今仍在应用。该方法的特点是需要了解蛋白质的详细结构、生物催化的结构原因以