

FAJIAO YU
MEIGONGCHENG

发酵与酶工程

李珊珊 莫继先 主编
张珍珠 副主编



化学工业出版社

发酵与酶工程



www.cip.com.cn
读科技图书 上化工社网

销售分类建议：本科教材，微生物学类

ISBN 978-7-122-35195-1



9 787122 351951 >

定价：49.80 元

发酵与酶工程

李珊珊 莫继先 主编

张珍珠 副主编



化学工业出版社

·北京·

本教材是以微生物工程、酶化学、蛋白质分离纯化技术等内容为一体的综合应用型教材。全书共分九章，主要内容包括微生物与酶、微生物酶的筛选、微生物发酵技术及优化、提高酶产量的方法、酶发酵动力学、酶分离纯化的原理和方法、酶的固定化、酶的剂型和保存、微生物发酵产酶技术应用。全书通过从自然界中分离纯化产酶菌，经生物学鉴定、优化菌株生长条件及产酶的最佳发酵条件，分离纯化出该酶，到该酶的固定化和保存，按部就班地讲解了发酵产酶技术的实际应用过程。

本教材符合综合实践类教学方法的授课要求，旨在培养应用复合型人才，适合理、工、农、林、医各类综合院校和师范院校生命科学、生物技术、生物工程、食品工程、环境工程等相关专业本科生学习使用。

轻工酶工程

图书在版编目 (CIP) 数据

发酵与酶工程/李珊珊, 莫继先主编. —北京:
化学工业出版社, 2019. 10

ISBN 978-7-122-35195-1

I. ①发… II. ①李… ②莫… III. ①酶工程-高等
学校-教材 IV. ①Q814

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2019) 第 205397 号

责任编辑: 马波 徐一丹

装帧设计: 关飞

责任校对: 刘曦阳

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: 三河市航远印刷有限公司

装订: 三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张 16½ 字数 400 千字 2020 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 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: 49.80 元

版权所有 违者必究

前言

生物技术是当今发展最快、应用最广、竞争最为激烈，也是最有希望取得突破性进展的学科之一。发酵工程和酶工程是生物技术四个重要组成中的两个。发酵工程(fermentation engineering)，也称为微生物工程，是利用微生物的某些特定功能，通过现代工程技术手段，来实现有用物质工业化生产的一种新技术。酶工程(enzyme engineering)是指工业上利用酶的催化功能，在一定条件下催化化学反应，生产人类需要产品的一门应用技术。酶工程用到的酶大多数是发酵工程的产物，由此可见，酶工程的前提是发酵工程。

目前生物技术类人才培养方案中越来越注重综合应用型人才的培养，为此很多学校开设了大实验类课程。不同于传统实践课程，大实验所讲授的内容知识点繁多、交叉学科广。编者所在学校正是有这样的课程，而一直苦于没有相应的教材可以选用，因此编写了本教材。本教材将发酵工程和酶工程进行了有机结合，改变了现有专业教材将各类知识点分开的现状，形成了一本以微生物学、生物化学、发酵的理论知识为基础，以酶化学、蛋白质分离纯化等综合应用型技术为指导的综合性本科教材。

本教材根据教学改革的变化和知识点的深入进一步调整知识结构和体系，充实内容，更好地适应综合实践类教学方法的授课要求，满足相关专业应用型人才的要求，适合理、工、农、林、医各类综合院校和师范院校生命科学、生物技术、生物工程、食品工程、环境工程等相关专业本科生学习使用。

本书共九章，其中王志刚编写了第一、二章的内容，莫继先编写了第三、六章的内容，李珊珊编写了第四、五、七章的内容，张珍珠编写了第八、九章的内容。

本书受到国家自然科学基金(31870493、31670375)、黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2017154)、黑龙江省省属高等学校基本科研业务项目(植物性食品加工技术特色学科专项)(YSTS XK201885、YSTS XK201890)、黑龙江省教育厅基本科研业务项目(135109316、135109255)、黑龙江省教育厅高等学校教学改革项目(SJGY20180558、SJGY20190729)的资助。

由于本书撰写难度较大，书中难免存在不妥之处，敬请批评指正。

编者

2019年3月

目录

第一章 微生物与酶

1

1.1 微生物酶的发现与发展	2
1.1.1 酶的发现、发展和特点	2
1.1.2 微生物酶的特点	2
1.2 微生物酶的生产	3
1.2.1 酶的生产菌的筛选	3
1.2.2 常用的产酶微生物	4
1.2.3 极端环境微生物和可培养微生物的新酶种	5
1.2.4 微生物酶的多样性	6
1.3 新酶开发、筛选的机遇与挑战	6
1.3.1 新酶开发、筛选的机遇	6
1.3.2 新酶开发、筛选的挑战	7
思考题	8
推荐读物	8
参考文献	8

第二章 微生物酶的筛选

9

2.1 微生物酶筛选的一般流程	10
2.2 微生物酶的来源	10
2.2.1 产酶微生物筛选的原则	10
2.2.2 从市场供应的酶库中筛选	11
2.2.3 从已知菌株中筛选生物催化剂	11
2.2.4 从自然界筛选产酶菌株	13
2.2.5 从基因克隆库中筛选	15
2.2.6 综合利用酶资源	16

2.3	菌种筛选的策略	17
2.3.1	传统的菌种分离筛选策略	17
2.3.2	未培养微生物筛选策略	18
2.4	酶的筛选	19
2.4.1	几个策略问题	19
2.4.2	不同的筛选方法	20
2.4.3	发现酶的其他途径	21
	思考题	22
	推荐读物	22
	参考文献	22

第三章 微生物发酵技术及优化

23

3.1	发酵培养基的选择	24
3.1.1	发酵培养基的成分	24
3.1.2	发酵培养基的类型	30
3.2	发酵原料的预处理	31
3.3	温度的控制	31
3.3.1	发酵热	31
3.3.2	发酵热的测定及计算	32
3.3.3	温度对微生物生长的影响	33
3.3.4	温度对发酵的影响	34
3.3.5	最适温度的控制	34
3.4	pH 的控制	35
3.4.1	发酵过程 pH 变化的原因	35
3.4.2	pH 对微生物生长的影响	36
3.4.3	pH 对发酵的影响	36
3.4.4	pH 的控制	36
3.5	溶氧的控制	37
3.5.1	临界氧	38
3.5.2	溶氧作为发酵异常的指示	39
3.5.3	溶氧参数在过程控制方面的应用	39
3.5.4	溶氧的控制	40
3.6	微生物发酵培养基的设计与优化	41
3.6.1	发酵培养基的设计原则	41
3.6.2	发酵培养基的优化方法	43
	思考题	65
	推荐读物	65
	参考文献	65

4.1 酶生物合成的基本理论	68
4.1.1 RNA 的生物合成—转录	68
4.1.2 酶的生物合成—翻译	73
4.2 酶合成及活性的调节	77
4.2.1 酶生物合成的调节	77
4.2.2 酶活性调节	80
4.2.3 分支生物合成途径中酶的调节	82
4.3 通过条件控制提高酶产量	84
4.3.1 优化发酵条件	84
4.3.2 添加诱导物	84
4.3.3 降低阻遏物浓度	86
4.3.4 添加表面活性剂	86
4.3.5 添加产酶促进剂	87
4.4 通过遗传控制提高酶产量	87
4.4.1 自然选育	88
4.4.2 诱变育种	88
4.4.3 杂交育种	89
4.4.4 原生质体融合技术	90
4.4.5 代谢工程育种	91
4.4.6 基因工程育种	93
思考题	93
推荐读物	94
参考文献	94

5.1 酶生物合成的模式	96
5.1.1 细胞生长规律	96
5.1.2 同步合成型	96
5.1.3 延续合成型	97
5.1.4 中期合成型	98
5.1.5 滞后合成型	98
5.1.6 合成模式的选择	98
5.2 分批培养动力学	99
5.2.1 酶生产过程中的细胞生长动力学	99
5.2.2 产酶动力学	101
5.2.3 基质消耗动力学	103

5.3 连续培养动力学	104
5.3.1 单级恒化器连续培养的动力学	104
5.3.2 带有细胞再循环的单级恒化器	107
5.3.3 多级连续培养	108
思考题	109
推荐读物	109
参考文献	109

第六章 酶分离纯化的原理和方法

111

6.1 酶的分离纯化策略	112
6.1.1 酶基本生物学特性	112
6.1.2 酶分离纯化的一般流程	114
6.2 酶液的制备和初分离	115
6.2.1 发酵液的预处理	115
6.2.2 细胞破碎	120
6.2.3 发酵液的固液分离	122
6.2.4 浓缩	128
6.2.5 干燥	133
6.3 酶的纯化方法	134
6.3.1 层析分离技术的一般原理	134
6.3.2 凝胶过滤层析	135
6.3.3 离子交换层析	139
6.3.4 亲和层析	141
6.3.5 疏水作用层析	144
思考题	146
推荐读物	146
参考文献	146

第七章 酶的固定化

147

7.1 酶的固定化简介	148
7.2 酶的固定化方法	149
7.2.1 吸附法	149
7.2.2 共价结合法	151
7.2.3 交联法	154
7.2.4 包埋法	154
7.2.5 非传统的固定化方法	156

7.3	固定化酶的特性	158
7.3.1	固定化酶活力的变化	158
7.3.2	固定化对酶稳定性的影响	158
7.3.3	固定化酶的最适温度的变化	159
7.3.4	固定化酶的最适 pH 的变化	159
7.3.5	底物特异性	160
7.3.6	固定化酶的米氏常数 (K_m) 变化	160
7.4	影响固定化酶性能的因素	160
7.5	固定化微生物细胞的方法	160
7.5.1	固定化细胞的分类	161
7.5.2	固定化微生物细胞的特点	161
7.5.3	固定化微生物细胞的制备	162
7.5.4	固定化微生物细胞发酵产酶的工艺条件及其控制	162
7.6	固定化酶及固定化微生物细胞的应用	163
7.6.1	固定化酶及固定化微生物细胞有利于基础研究	163
7.6.2	利用固定化酶和固定化微生物细胞生产各种产物	163
7.6.3	药物控释载体	164
7.7	固定化细胞生长和产酶动力学	165
7.7.1	固定化细胞生长动力学	165
7.7.2	固定化细胞产酶动力学	165
7.7.3	固定化细胞连续产酶动力学	166
	思考题	166
	推荐读物	167
	参考文献	167

第八章 酶的剂型和保存

169

8.1	酶制剂概况	170
8.1.1	世界酶制剂发展概况	170
8.1.2	我国酶制剂工业发展概况	171
8.2	酶制剂主要剂型及优缺点	173
8.2.1	按形态分类	173
8.2.2	按酶制剂在应用领域上的分类	174
8.2.3	按酶的组成成分分类	178
8.2.4	按酶的来源不同分类	179
8.2.5	按酶的包装形式分类	180
8.3	酶制剂的保存	181
8.3.1	影响酶制剂稳定性的因素	181
8.3.2	酶的稳定方法	183

8.3.3 酶的保存	184
思考题	185
推荐读物	185
参考文献	185

第九章 微生物发酵产酶技术应用

187

技能实训 1 α -淀粉酶发酵生产大实验	188
实验 1-1 枯草芽孢杆菌淀粉酶产生菌的分离和纯化	188
实验 1-2 枯草芽孢杆菌淀粉酶产生菌的发酵条件研究	194
实验 1-3 淀粉酶基因工程菌的构建	198
实验 1-4 α -淀粉酶的酶活性质研究	204
实验 1-5 发酵浸提液的固液分离及有效成分的初步提取	208
实验 1-6 淀粉酶的层析分离和纯化	211
实验 1-7 α -淀粉酶的固定化及检测	216
技能实训 2 蛋白酶发酵生产大实验	218
实验 2-1 枯草芽孢杆菌蛋白酶产生菌的分离和纯化	218
实验 2-2 枯草芽孢杆菌蛋白酶产生菌的发酵条件研究	220
实验 2-3 蛋白酶基因工程菌的克隆与表达	223
实验 2-4 蛋白酶的酶活性质研究	225
实验 2-5 发酵浸提液的固液分离及有效成分的初步提取	225
实验 2-6 蛋白酶的层析分离和纯化	225
实验 2-7 蛋白酶的固定化及检测	225
技能实训 3 脂肪酶发酵生产大实验	228
实验 3-1 脂肪酶产生菌的分离和纯化	228
实验 3-2 脂肪酶产生菌的发酵条件研究	230
实验 3-3 脂肪酶基因工程菌的克隆与表达	234
实验 3-4 脂肪酶的酶活性质研究	239
实验 3-5 发酵浸提液的固液分离及有效成分的初步提取	239
实验 3-6 脂肪酶的层析分离和纯化	239
实验 3-7 脂肪酶的固定化及检测	241
推荐读物	242
参考文献	242

附录

245

附录一 硫酸铵饱和度常用表	246
附录二 限制性内切酶及相应的引物	248

第一章

微生物与酶

酶具有高效性、专一性、反应条件较温和容易控制等催化特点，在精细化工、医药、造纸业、化妆业、皮革加工、生物柴油、生物降解、油脂加工、食品加工等诸多领域有着广泛的应用。起初，酶都从动物内脏、植物组织中提取而来，如麦芽淀粉酶、大豆 β -淀粉酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、辣根过氧化氢酶等。与动植物相比，微生物生长速度快，种类多（约50万~600万种），从微生物中几乎能够获得所有的动物、植物酶，且微生物易变异，改良菌种可以进一步提高酶的产量和品质。因而，微生物产酶成为人们的最佳选择。微生物发酵产酶具有工艺简单、微生物易培养、遗传操作简单、可利用基因工程和蛋白质工程实现微生物重组酶的高水平表达及筛选新特性或高活力酶等优点，因此绝大多数工业酶都来源于微生物发酵。本章主要围绕微生物和酶的关系，概括性地介绍微生物酶的发现、发展，以及微生物酶生产方面的内容。

1.1 微生物酶的发现与发展

1.1.1 酶的发现、发展和特点

酶 (enzyme) 是生物催化剂, 是一类具有催化功能的蛋白质 (除少部分为核酶外)。所有生物的生长发育、呼吸、营养吸收和繁殖等新陈代谢所进行的生物化学变化, 几乎都是在酶的催化下发生的。人类在日常生产和生活中对酶の利用可以追溯到几千年前, 但真正开始认识酶的性质和功能只有几百年的历史。

1680年, 荷兰的列文虎克用显微镜观察发现了酵母细胞, 酵母能使果汁和谷类加速转化成酒。1752年, 法国物理学家列奥米尔发现, 让鹰吞下几个装有肉的小金属管, 当鹰吐出这些管子的时候, 管内的肉已部分分解了, 管中有了一种淡黄色的液体。1777年, 苏格兰医生史蒂文斯从胃里获得一种液体 (胃液), 证明食物的分解过程可以在体外进行。1834年, 德国生理学家施旺得到了“胃蛋白酶”。同时, 法国化学家帕扬和佩索菲发现了“淀粉酶制剂”。1878年, 德国生理学家库恩提出了“酶”的概念。1897年, 德国化学家毕希纳发现, 用砂粒研磨酵母细胞后, 提取出一种能够像酵母细胞一样完成发酵任务的液体, 证明了活体酶与非活体酶的功能是一样的。由于这项发现, 毕希纳获得了1907年诺贝尔化学奖, 也因此这方面的研究受到了广泛关注。

1.1.2 微生物酶的特点

有分析表明, 微生物占地球生物总量的60%, 海洋微生物的总重量估计达280亿吨, 微生物在自然界中的数量巨大。据《国际微生物学会联盟通讯》有关专家于1995年的报告指出, 全球约有50万~600万种微生物, 而至今已被研究和记载的还不到10%, 在人类生产和生活中开发应用的不会超过其存在量的1%, 利用前景广泛, 由此可见微生物研究工作大量而繁重。

由于农牧业受自然环境和气候的影响, 以动物、植物作为酶的来源有一定局限性。微生物生产的酶, 可满足任何规模的需求, 产率高、质量稳定。20世纪40年代, 微生物酶制剂工业迅速发展起来。而60~70年代发展起来的固定化酶和固定化细胞技术, 使酶可反复使用和连续反应, 其应用的范围也逐渐扩大, 在工业应用的生物催化剂中占有越来越大的比重, 尤其是近几十年来, 微生物酶已经发展成为大规模的工业生产, 现在酶制剂的生产是以深层发酵为主, 以半固体发酵为辅, 菌株产酶的能力大幅提高。成了各种酶制剂的主要来源。

(1) 微生物种类繁多, 酶的品种齐全

微生物 (microorganism) 在地球上已存活38亿年, 漫长的历史进化使其具备了近乎无限的代谢能力。微生物在自然界中分布极为广泛, 任何有其他生物生存的环境中, 都能找到

微生物，而在其他生物不可能生存的极端环境中也有微生物存在。并且在长期的进化过程中，生存环境不同的微生物往往具有截然不同的代谢类型，环境的选择性压力使得它们几乎可以利用所有已知的底物，这就为微生物酶的品种多样性提供了物质基础。此外，微生物具有很强的适应性和受外界作用而发生变异的能力，通过适应、诱导或诱变育种以及基因工程等手段还可以培育出新的产酶菌种。

随着研究的深入，酶的种类在不断增加，迄今为止，还不知道自然界有多少种酶；同样也不清楚，每个细胞内究竟有多少种酶。有人估计，一个大肠杆菌细胞中至少有 3000 种蛋白质，而一个真核细胞中至少有 50000 种蛋白质，这些蛋白质中的大多数是酶。

(2) 微生物生长繁殖快、生活周期短、产量高

微生物以生长繁殖快而著称于生物界，一般微生物的生长速度要比农作物快 500 倍，比家畜快 1000 倍，其中细菌的生长速度最快。许多细菌在合适条件下 20min 左右就可繁殖一代，体重增加 1 倍；酵母细胞 1~2h 就可产生一个世代。微生物快速增殖的特点，为大量制备酶制剂提供了重要前提，也使得微生物酶的规模化工业生产成为可能。

(3) 工业化生产经济效益高

微生物的培养方法简单易行，生产规模不限，生产条件易控制，采用工业化生产不受地理环境和气候条件的限制，所用原料多数为廉价的农副产品，来源丰富，成本低廉，机械化生产，劳动生产效率高，经济收益大。例如，生产 1 kg 结晶蛋白酶，需要 1 万头牛的胰脏，而用微生物发酵生产则只需要数百千克的淀粉、麸皮和黄豆粉之类的农副产品，几天时间便可生产出来。

(4) 便于提高酶制品获得率

微生物具有较强的适应性和应变能力，可以通过适应、诱变等方法培育出高产量菌株。另外，结合基因工程、细胞融合等现代化的生物技术手段，可以根据人类的需要使微生物产生出目的酶。

正是由于微生物具有这些优点，使它具有其他来源的酶类所不可比拟的巨大优势，因而才使微生物酶的研究和生产得以飞速的发展。

1.2 微生物酶的生产

1.2.1 酶的生产菌的筛选

(1) 菌种来源

任何微生物发酵产酶生产都必须进行菌种选育。这是酶生产过程的关键一步，影响到微生物发酵生产的成本和产品的品质。建立一种行之有效的合理的筛选方法是获得一种新酶制剂的基本前提。一般来说，筛选策略主要包括：设计筛选过程并确定所需酶活性的类型；决定从哪一类型的微生物中进行筛选；设计一种合适的、方便的和敏感的检测方法，能够筛选

到尽可能多的微生物。

对酶的生产菌有以下几点要求。

① 酶的产量高。优良的产酶菌种首先要具有高产的特性，才有开发应用价值。高产细胞可以通过筛选、诱变、或采用基因工程、细胞工程等技术而获得。

② 容易培养。要求产酶细胞容易生长繁殖，并且适应性较强，易于控制。

③ 产酶稳定。能够稳定地用于生产，不易退化，容易复壮。

④ 利于酶的分离纯化。产酶菌株本身及其他杂质易于和酶分离。

⑤ 安全性高。菌株及其代谢物安全无毒，不会影响生产人员和环境，也不会对酶的应用产生不良影响。

自然界是产酶菌种的主要来源，土壤、深海、南北极、温泉、火山、森林、边远地区都是菌种采集地。生产菌可从菌种保藏机构和有关研究部门获得，但主要由自然界采集、分离、筛选和遗传育种而获得。

(2) 产酶菌种分离纯化

生产菌在自然条件下常与各种菌混杂在一起，所以采样后要进行分离纯化才能获得产酶菌。细菌培养可用肉汁琼脂培养基 (pH 7.0)；霉菌可用察氏培养基 (pH 5.5)，为了防止霉菌菌落蔓延成一片，可在培养基中加 0.1% 的去氧胆酸钠或山梨糖；放线菌可用高氏培养基 (pH 6.8~7.0)。为了提高菌种分离效率，分离培养基中可添加一定量的药剂以抑制干扰微生物的生长。培养基中添加 30~50U/mL 制霉菌素、克念菌素、曲古霉素等多烯类抗生素和克霉唑等，可抑制霉菌生长，而不妨碍细菌繁殖；若向培养基中添加青霉素、链霉素 (30U/mL)、四环素或孟加拉红 (0.001%)，则可抵制细菌而不干扰霉菌的生长。此外，可以在培养基中添加各种物质，有针对性地筛选具有某种特性的微生物。例如用碱性或酸性培养基，可分离耐碱耐酸微生物；用添加高浓度无机盐培养基，可分离耐盐微生物；在高温下可筛选耐热微生物。

分离纯化一般采用平板划线法和直接稀释法，得到单一菌落的纯种。初筛是对所得纯种进行筛选，检测获得所需菌种，在测定方法上一般都着眼于酶对底物的特异性。如菌种分泌的是胞外酶，可采用平板透明圈法，即在分离培养基上添加有酶作用的底物，观察底物变化状况以定性确定菌种产酶能力，可用来大量地筛选菌种。而胞内酶只能将分离到的菌种逐个进行摇瓶实验，分别测定产酶情况。为了获得高产酶的菌株，初筛后，要进行复筛，选择相对准确的测定方法，用 3 个摇瓶重复，最后筛选出 1~2 株，进一步做培养基选择和发酵条件的实验。

(3) 菌种的改良

一般而言，自然界分离得到的野生型菌株产酶能力很低，很少适合于工业生产，目前工业上所用菌种几乎都是屡经选育的变异株。菌种改良是为了达到以下目的：① 提高产酶能力；② 减少或消灭共存的不需要的酶、色素或其他物质；③ 改变生产菌株的代谢，使目的酶成为组成型酶，以减少诱导剂用量；④ 消除分解代谢及终产物对产酶微生物的阻遏作用。

诱变育种、杂交育种、原生质体融合、代谢工程育种和基因工程育种等都是改良菌种的有力手段，尤其是利用基因工程技术，对基因表达和代谢途径进行研究，可以有目的地对从自然界中得到的菌株的产酶特性进行改造，得到能够满足工业生产要求的菌株。

1.2.2 常用的产酶微生物

微生物具有种类多、繁殖快、容易培养、代谢能力强等特点，有不少性能优良的产酶菌

株已在酶的发酵生产中广泛应用。常用的产酶微生物简介如下。

(1) 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)

枯草芽孢杆菌是应用最广泛的产酶微生物之一。枯草杆菌是芽孢杆菌属细菌，细胞成杆状，无荚膜，周生鞭毛，运动，革兰氏染色阳性，菌落粗糙，不透明，污白色或微带黄色。此菌用途很广，可用于生产 α -淀粉酶、蛋白酶、 β -葡聚糖水解酶、碱性磷酸酶等。

(2) 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

大肠杆菌细胞呈杆状，革兰氏染色阴性，无芽孢，菌落从白色到黄白色，光滑闪光，扩展。大肠杆菌可生产多种多样的酶，一般都属于胞内酶，需经过细胞破碎才能分离得到，例如，谷氨酸脱羧酶、天冬氨酸酶、苜蓿霉素酰化酶、 β -半乳糖苷酶、限制性核酸内切酶、DNA聚合酶、DNA连接酶、核酸外切酶等。

(3) 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)

黑曲霉是曲霉属黑曲霉群霉菌，菌丝体由具横隔的分枝菌丝构成，菌丛黑褐色，顶囊球形，小梗双层，分生孢子球形，平滑或粗糙。黑曲霉可用于生产多种酶，有胞外酶也有胞内酶，如糖化酶、 α -淀粉酶、酸性蛋白酶、果胶酶、过氧化氢酶、核糖核酸酶、脂肪酶、纤维素酶等。

(4) 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)

米曲霉是曲霉属黄曲霉丛霉菌，菌丛一般为黄绿色，后变为黄褐色，分生孢子头呈放射形，顶囊球形或瓶形，小梗一般为单层，分生孢子球形，平滑少数有刺，粗糙。米曲霉可用于生产糖化酶和蛋白酶，这在我国传统的酒曲和酱油中得到广泛应用。

(5) 啤酒酵母 (*Sacharomyces cerevisiae*)

啤酒酵母是在工业上广泛应用的酵母，细胞由圆形、卵形、椭圆形到腊肠形。在麦芽汁琼脂培养基上菌落为白色，有光泽，平滑，边缘整齐。其营养细胞可以直接变为子囊，每个子囊含有1~4个圆形光亮的子囊孢子。啤酒酵母常用于转化酶、丙酮酸脱羧酶、醇脱氢酶等的生产。

(6) 假丝酵母 (*Candida*)

假丝酵母的细胞呈圆形、卵形或长形。其无性繁殖方式为多边芽殖，形成假菌丝，可生成厚垣孢子、无节孢子、子囊孢子，不产生色素，在麦芽汁琼脂培养基上菌落呈乳白色或奶油色。假丝酵母是单细胞蛋白的主要生产菌，在酶工程方面可用于生产脂肪酶、尿酸酶、尿囊素酶、转化酶、醇脱氢酶。

酶的发酵生产是以获得大量所需的酶为目的，为此，除了选择性能优良的产酶细胞以外，还必须满足细胞生长、繁殖和发酵产酶的各种工艺条件，并要根据发酵过程的变化进行优化控制。

1.2.3 极端环境微生物和可培养微生物的新酶种

迄今为止，人们对极端环境微生物和不可培养微生物的研究还很不够。现在，越来越多的科研工作者开展从极端环境条件下生长的微生物内筛选新酶种的工作，其中主要研究嗜热微生物、嗜冷微生物、嗜盐微生物、嗜酸微生物、嗜碱微生物、嗜压微生物等。目前，人们已经发现能够在250~350℃条件下生长的嗜热微生物，能够在-10~0℃条件下生长的嗜冷微生物，能够在pH 2.5条件下生长的嗜酸微生物，能够在pH 11条件下生长的嗜碱微生物，能够在饱和食盐溶液中生长的嗜盐微生物，能够在 1.01×10^5 kPa条件下生长的嗜压微生物，以及在高温(105℃)和高压(4.053×10^7 Pa)条件下生长的嗜热嗜压微生物等。这就为新酶种和酶的新功能的开发提供了广阔的空间。

1.2.4 微生物酶的多样性

微生物酶活性多样性的一个很好例子就是催化羧基化合物的生物还原。羧基化合物是精细化工中生产光学活性醇类的底物，通过酶的催化作用可以使这一反应 100% 进行。理论上，任何一个羧基化合物都可以找到对应的酶进行催化，用前手性羧基化合物作为底物对 1000 多种微生物进行筛选，可以很容易地确定具有合成作用的手性醇的微生物酶。

酮泛酰基内酯在 pH 4~6 时能够被许多种微生物转化为泛酰基内酯，研究发现，所形成的 D-泛酰基内酯和 L-泛酰基内酯的比率与微生物的种属或者所用的底物没有关联。如毛霉几乎只能产生 L 型对映体，但是日本毛霉能产生一种消旋化合物；在 9 个红酵母菌株中，有 5 个产生的是消旋化合物，其余 4 株产生 D 型对映体。然而，当在 pH 7~8 进行相同的筛选时，酮泛酰基内酯就经过快速的和自发的水解产生酮泛解酸，而且可以观察到还原性活性的极其不同的分类：大多数的微生物表现出了只产生 D 型对映体的高还原性活性。许多土壤杆菌属和假单胞菌属的细菌是实现这种转化的可能的催化剂。很多微生物都具有还原乙基-2-酮泛酰基噻吩甲酯的能力，尤其是酵母。7 种假丝酵母属的菌株能够产生占绝对优势的 D 型对映体，而另外一些酵母，如酵母属、毕赤酵母属和红酵母的菌株产生 L 型对映体。

从上面的例子可以看出，微生物酶的筛选受筛选条件的影响，不同种属的微生物会产生不同的酶类，即使是同一属的不同菌株在同样的条件下，作用于同样的底物也能够产生丰富多样的酶类，得到不同的产物。这就构成了微生物酶的多样性。

随着基因工程技术的发展，很多酶类可以由微生物的 DNA 质粒文库中筛选出来，这是一种筛选有活力的新酶的有用技术。然而这种方法的缺点就是，在筛选过程中酶已完全远离了它最原始的功能。发现一种新酶，就意味着发现一种新的微生物功能，而基因文库的筛选会使微生物中许多原始的功能丢失。从这点上来说，传统的筛选方法，包括富集和分离方法，仍然是非常有效的手段，因为它们包含保留原始功能的活细胞。

不论是采用传统的方法，还是运用新的手段（如利用基因文库的方法），或者是将二者结合在一起，必将扩展微生物酶的种类和功能，不仅能够产生更多的在常规条件下作用的酶类，也能够构建出更多的基因工程菌，产生耐热性、耐碱性、耐酸性等极端环境有用酶。而且，随着生物技术的发展，也一定会出现更多能为人类所采用的新手段、新技术，从而产生越来越多的能够适于工业生产的新酶种，以前所未有的速度扩大微生物酶在人们生产、生活等各个领域中的应用范围。

1.3 新酶开发、筛选的机遇与挑战

1.3.1 新酶开发、筛选的机遇

21 世纪，面对能源危机和环境污染加剧的严重局面，人类面临着前所未有的生存与发