

细胞外酶

〔英〕 F. G. 普里斯特 著

科学出版社

细 胞 外 酶

〔英〕 F. G. 普里斯特 著

张宗玉 等 译

童坦君 等 校

科 学 出 版 社

1 9 8 8

内 容 简 介

本书原为英国VNR出版公司出版的“微生物学丛书”中的一册，着重论述微生物中的细胞外酶及其工业生产与应用。

本书从学术与应用两个角度对酶的分泌、细胞外酶合成的调控、商品酶、菌种的选择与改良、工业生产等方面进行了简明扼要的叙述。不仅阐明了蛋白质生物合成、分泌假说、转录与翻译的调控等基本概念，还对分泌假说的现状、基因工程在细胞外酶生产中的应用等理论和应用方面的新进展作了简明的阐述。

对蛋白质的分泌机理的详尽探讨与酶工程有关内容卓有见地的论述为本书的两大特色。

本书对于生物化学、微生物学、药学、生物工程学各专业的师生和研究人员，对从事酶制剂生产和应用的工程技术人员都有较大参考价值。

Fergus G. Priest
EXTRACELLULAR ENZYMES
Van Nostrand Reinhold (UK) Co., Ltd. 1984

细 胞 外 酶

〔英〕 F. G. 普里斯特 著

张宗玉 等 译

童坦君 等 校

责任编辑 吴铁双

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1988年1月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1988年1月第一次印刷 印张：4

印数：0001—3,200 字数：87,000

ISBN 7—03—000227—X/Q·41

定价：1.00元

译 者 的 话

酶工程是当前新兴工业之一，在生物化学与微生物学的工业应用方面有重要意义。《细胞外酶》一书是英国伯明翰大学柯尔(J. A. Cole)教授等人主编的微生物学丛书(Aspects of Microbiology)中阐述酶工程的分册。

本书对细胞外酶，无论在工业实践方面，还是在学术方面，都作了简明扼要的叙述，并在此基础上介绍了那些进行工业规模生产的酶的制备与应用，还概括地介绍了蛋白质分泌的分子生物学，蛋白质的合成，以及如何使商品酶得到增产等有关方面的新进展。

丛书的目的是使大学有关专业的高年级学生对于当前重要的研究方向、难点和有待解决的问题有所了解。并使对微生物学有关问题感兴趣的其他专业的研究人员得以了解这方面的新进展。这套丛书的主要目的是在入门性教科书和研究论文之间架起一座桥梁。

本书作者F. G. 普里斯特(Fergus G. Priest)是英国爱丁堡郝利奥特-瓦特(Heriot-Watt)大学微生物学教授，也是英国普通微生物学学会、应用细菌学学会、酿造研究所与美国微生物学学会的成员。他多年来致力于细胞外酶合成调节和革兰氏阳性菌的蛋白质分泌的研究，并进行有可能用于生物工程的酶新品种的开拓性研究。在革兰氏阳性芽孢杆菌的胞外酶的合成方面，他的研究卓有成就。

本书适用于微生物专业、生物化学专业、生物工程专业及其有关学科的大学生及研究生，对从事酶制剂生产和应用的工程技术人员也有较大参考价值。本书涉及的问题不

仅仅是细胞外酶，实际上也涉及各种肽类、蛋白质类物质的分泌与工业生产。尤其应该指出的是，书中在理论上解决了基因工程的产物分离和提纯的难题，有些设想很有参考价值。所以译者希望本书的出版对我国正在兴起的酶工程和生物工程也能起一定的促进作用。

本书由张宗玉、童坦君、龚秋明翻译，童坦君、徐家立校订。不妥之处请读者指正。

1986年北京

序

过去50、60年中，用微生物进行工业酶生产所取得的经验，包括微生物学、生物化学和化学工程学方面的，这些经验对生物工程学的发展正在显示相当大的重要性。重要的工业酶多半是细胞外酶。由于生物化学家和遗传学家的共同努力，有关蛋白质分泌的分子生物学的细节正在逐步弄清；原核生物和真核生物细胞的分泌过程基本相同，这一点也正在变得愈来愈清楚。对外源素的分泌这些研究展现了令人鼓舞的前景，意味着像胰岛素那样的蛋白质，可被含有克隆基因的微生物细胞所分泌。在商业上，这意味着简便和有效的产品回收和增产。再者，通过遗传操作手段，细胞外酶的产量已在稳步提高。尽管主要由于目前与细胞外酶生产有关的微生物还缺乏可供进一步开拓的遗传系统，其细胞外酶合成的调节作用未能因此而得到充分了解。但是已采用的上述遗传学手段，对从事种种微生物产品生产的有关工作者来说，应该是有意义和有价值的。

将实验室操作步骤扩大到中间试验厂规模，再转入工业化规模的实践，在很多微生物工艺过程中正在引起相当多的问题。以工业规模产生细菌酶和真菌酶所取得的丰富经验，对投身于以微生物学为基础的那些工业的人们，应该说也是无价之宝。

最后，酶工业本身也值得注意。从本世纪初酶工业兴起以来，它已扩展到食品加工工艺、废弃物利用与制药技术。对酶工业两次较大的推动，来自本世纪60年代在家用洗涤剂

中加入从芽孢杆菌菌株中提取的碱性蛋白酶，以及60年代后期发展起来的在固体支持物上将酶固定化的技术。固定化的葡萄糖异构酶用于把葡萄糖（从酶促水解淀粉而来）转变为味道更甜的果糖。在很多食品与饮料中将这类高果糖玉米糖浆代替蔗糖，曾促使酶工业获得了数以百万美元计的市场，进而保证了在发现新酶和创建新工艺的同时，使这一市场进一步扩大。

本书将从商品化和学术两个角度论述细胞外酶的合成，介绍以工业规模生产的那些酶。扼要地叙述其应用，以及这些工业酶是如何生产的。同时也详细地介绍蛋白质分泌的分子生物学、蛋白质合成的调节以及增加酶产量的通用途径。因此本书对那些需要工业微生物这一分支简要知识的微生物学、生物化学和有关学科的大学生和研究生都会有所助益。本书将为从事以微生物学为基础的那些工业的工作者提供细胞外酶合成的分子生物学的最新的、明确的知识。为此，笔者力求在理论微生物学和工业微生物学的鸿沟上驾起一座桥梁，目前工业微生物学已成为生物工程学的一部分。

F. G. 普里斯特

于爱丁堡

目 录

译者的话

序

第一章 绪论	(1)
1.1 细胞壁的结构与酶的定位	(2)
1.2 商品酶	(4)
第二章 酶的分泌	(7)
2.1 信号假说	(7)
2.2 遗传研究	(16)
2.3 真核细胞的分泌	(20)
2.4 真菌细胞的分泌途径	(21)
2.5 提要	(22)
第三章 细胞外酶合成的调节	(24)
3.1 细胞外酶的环境控制	(24)
3.2 蛋白质合成	(29)
3.3 转录调节	(32)
3.4 翻译的调节	(42)
3.5 细胞外酶的功能	(44)
3.6 提要	(46)
第四章 商品酶	(48)
4.1 淀粉水解酶	(48)
4.2 蛋白酶	(58)
4.3 其他酶	(65)
4.4 固定化酶	(72)
4.5 提要	(76)
第五章 菌株的选择和改良	(78)

5.1 菌株的分离	(78)
5.2 提高酶产量	(83)
5.3 基因转移	(87)
5.4 基因克隆	(91)
5.5 提要	(94)
第六章 商品生产	(96)
6.1 工艺过程扩大	(97)
6.2 发酵培养基	(98)
6.3 种子的制备	(101)
6.4 发酵过程的条件	(101)
6.5 酶的提取和纯化	(105)
6.6 酶的管理和法规	(109)
6.7 提要	(110)
总结	(112)
词汇	(114)
参考文献	(117)

第一章 绪 论

环境中很多有机物的再循环要依靠微生物。动、植物死亡后受到小动物和微生物的侵袭，释出其组成分子。这些组成分子被腐生菌利用以提供能量，并构成新的细胞组分。低分子量的水溶性的物质易于同化，但是原有机体的大部分组分是大分子物质。在植物中以纤维素、半纤维素、木质素、果胶和淀粉为主；动物中以蛋白质、糖蛋白、糖原和几丁质为主。有些微生物含有肽聚糖(peptidoglycan)之类的细胞壁特有的聚合物，此外所有生物体都含有核酸。上述大分子是异养微生物的主要食物来源，但是它们的分子甚大，不易被利用。微生物主要采用两种对策使它们能够代谢这些化合物。一是通过质膜的内陷而摄入这些大分子化合物，这时在胞质中形成液泡，然后将酶分泌到这些液泡中，使聚合的底物降解而代谢之。用这种方法摄取水和水溶液称为胞饮，而用此法将颗粒物质摄入则称为吞噬。因为原核生物的膜不能实现这些过程，胞饮和吞噬作用只限于缺乏细胞壁的那些真核生物微生物，它们主要是原生动物。而那些具有细胞壁的真核生物和原核生物则采用另一种对策以同化大分子营养物质。此时，细胞或菌落释出酶，将环境中的聚合物降解，然后将低分子量的分解产物同化。总的说来，在习居于土壤中和腐败的动植物中的微生物中，细胞外酶（胞外酶）很常见。在细菌中，芽孢杆菌属、梭菌属、噬细胞菌属（*Cytophaga*）的细菌和很多放线菌，特别是一些链霉菌，它们产生的胞外酶尤其多。再者，革兰氏阴性细菌如弧菌、产气单

胞菌和假单胞菌在腐烂的海藻和其他海洋生物中很常见。它们分泌琼脂水解酶 (agarases) 及类似的酶。丝状的霉菌和酵母也分泌各种胞外酶。

大多数胞外酶显然是降解多糖、蛋白质和核酸的解聚酶 (depolymerases)。它们中多数是水解酶, 虽则也有例外, 例如如果胶裂合酶 (pectin lyases) 实质上是转消酶 (transeliminases) (见第四章)。某些胞外酶的作用底物是低分子量物质, 突出的例子是青霉素酶 (β -内酰胺酶)。该酶水解青霉素的 β -内酰胺环, 从而使此种抗生素失效。因为青霉素抑制细胞壁的生成, 所以在它与细胞表面结合之前就将它灭活。这对细菌来说至关重要。

“胞外”一词, 过去常常引起混乱, 现在涉及了酶, 为此下一个定义将有必要。现在普遍同意胞外酶是指可以穿过质膜的任何酶。严格来说, 在原虫的吞噬泡中的消化酶, 或被细菌释放到环境中的酶, 它们都穿过了质膜, 因而都是胞外酶。所以胞外酶的最终定位取决于其细胞的结构。

1.1 细胞壁的结构与酶的定位

按照革兰氏染色反应的不同, 传统上将细菌分成两类。这种染色反应的不同, 反映了细胞壁化学组成与结构上的不同 (Rogers, 1983)。革兰氏阳性细菌的细胞壁较为简单, 由与磷壁酸质 (teichoic acid) 共价结合的肽聚糖的厚壳 (约20纳米厚) 构成。此网状分子与质膜相结合, 使细菌具有结构强度。胞外酶穿过细胞膜后, 可能暂时为细胞壁所限制, 但最后还是扩散到了环境中。然而某些酶仍与膜的外表面相连。因为这些酶分子已经穿过了细胞膜, 所以应该看作是胞外酶。然而利用酶法在等渗溶液中将细菌的细胞

壁除去，形成原生质体 (protoplast) 时，上述胞外酶可以部分地或完全地从膜释放出来。在一定生长条件下，这些酶可以自然地由细胞中释出。地衣芽孢杆菌 (*Bacillus lichiformis*) 的碱性磷酸酶和 α -葡萄糖苷酶就是两个例子。在革兰氏阳性细菌中，酶的第三个存在部位是连靠在膜的內侧面。严格说来，这种酶并非在胞外，因为它还没有穿过细胞膜。

革兰氏阴性细菌的被膜是一种相当复杂的结构，由两层膜组成 (Roger, 1983)。质膜与一薄层肽聚糖相结合，其外包围着一层外膜。在质膜与外膜这两层疏水屏障之间，又有一层称为周质 (periplasm) 的亲水间隙。周质约占细胞总重量的20—40%，含有包括特异氨基酸和糖结合的蛋白和水解酶在内的各种蛋白质。所以在革兰氏阴性菌中，酶的存在部位有几处：在胞质中，连在质膜的內面或外面；在周质中，固定在外膜的內面或外面，以及分泌到环境中。除了在胞质中或在质膜的內面的酶以外，所有的酶都穿过了质膜，而且可以用渗透压冲击 (shock) 法处理或用溶菌酶处理，将细菌转变为不耐渗透压的原生质球 (sphaeroplast) 而使酶释出，因此，这些酶都可以看成是胞外酶。很多传统的革兰氏阳性菌的胞外酶都可以在革兰氏阴性菌的周质酶中找到它们的对应物。总之，严格讲，胞外酶在革兰氏阴性菌中极少见，但又确实存在，特别是存在于假单胞菌、产气单胞菌和某些肠杆菌。事实上，霍乱弧菌的肠毒素也是分泌到周围介质中的。

真菌的细胞壁在结构上与革兰氏阳性菌的细胞壁相似，主要由1, 3 α -与1, 3 β -葡聚糖及几丁质和含量不等的纤维素及蛋白质所组成。然而这种细胞壁不是这些组成多聚物的均一混合物，而是有一定结构的复杂的集合物。关于真

菌如何分泌蛋白质目前所知尚少。一般认为，蛋白质分子一旦从胞质释出，是通过扩散越过细胞壁的。从酶的分泌角度考虑，真菌的细胞壁与革兰氏阳性菌的细胞壁相似。

1.2 商品酶

酶的开发不是新近的事，在制革、干酪制造、酿造啤酒用的麦芽制作和发酵面包中，酶已应用了很多世纪。这些工艺过程所用的酶是动、植物组织或整个微生物。从活细胞部分提纯的制剂来生产商品酶是较晚的事，可以追溯到上世纪末。1894年，生活在美国的日本科学家高峰氏（Jokichi Takamine），获得了与酶有关的第一项专利。其工艺过程是用润湿的稻米或麦麸来培养米曲霉（*Aspergillus oryzae*），然后用水或盐液来提取真菌分泌的淀粉酶。这种“高峰氏淀粉酶（takadiastase）”今天仍用作助消化药。20年后，细菌，特别是芽孢杆菌才应用于酶的生产，这些微生物仍是培育在盘中的半固体介质表面，呈薄膜（pellicle）状生长的。胞外酶的优点很明显，它比胞内酶易回收、易纯化，特别是不必将细胞破碎，也不用去除核酸。其次，容易获得高产量，因为胞外酶的生产不受可获得的生物量（biomass）的限制。本世纪40年代抗生素工业所发展的易被酶工业采用的深层通气发酵技术（submerged culture techniques），使微生物生长条件的控制得到了改善。这种改善使产量增加，大大推动了酶工业的发展。50年代酶工业随之有了缓慢而稳步的发展。其后10年，由于加酶洗衣粉（enzyme washing powders）的生产，酶工业有了很大的发展，这种洗衣粉含有从地衣芽孢杆菌提取而得的碱性蛋白酶。还发展了用微生物凝乳酶生产干酪，以及将淀粉酶促

转变为葡萄糖和果糖的混合物作为食品甜味剂等技术。这两项技术代表着近年来酶工业应用的两个新开发的领域。目前对可再生资源的有效利用的兴趣，以及要求工业生产在环境许可范围内进行所造成的压力，对酶的应用已经引起了更广泛的兴趣。根据不同方面的估计，这些因素综合起来，使1981年的工业酶有了一亿五千万至四亿美元的世界市场。预计1985年可升至六亿美元，其中蛋白酶与碳水化合物酶共占市场总值的90%，其余的包括技术性产品或药品。与数以千计的已知的酶相比，已开拓的商品酶只是极有限的一部分。不过应该强调，发现一种新酶并不难，但要找到一个有利可图的新酶市场却难得多。

本书介绍了工业酶（表1）。在过去30年中，工业酶的生产趋向于用微生物来源的，而不用动、植物来源的，甚至工业酶的新产品几乎都来自细菌和真菌。形成这一情况的原因是：（1）微生物生长很快，适于快速大量培养。（2）培养基成分价格便宜，常为可大量取得的农产品。（3）可选用作为工业生产的微生物品种很多，又可用遗传操作手段将其改良。来自动、植物的酶，由于来源的可变因素多，难以预测，便逐渐被相应的微生物酶所取代，但动、植物的酶在某些应用方面还保留着它们的市场。

本书将介绍以微生物进行工业化规模生产的各种酶以及它们的应用。胞外酶生产领域现正临近大变革时期，因为蛋白质分泌到膜外的机理了解得更清楚，遗传工程技术越来越精细复杂，实际上任何蛋白质都可以成为胞外蛋白的前景已出现。这样，原来作为从环境腐物中获取营养的手段的过程，将被开发为用微生物工程进行的大规模生产，而这种生产过程将使这些微生物分泌大量有价值的蛋白质。然后本书将介绍商品酶的现行生产方法及这些酶的应用。第五章将集中讨

表1 商品酶产品

	开始生产年代			1980年年产量	
	1900年前	1950年前	1980年前	吨/年	占总产量的%
动物 凝乳酶	×			2	0.15
胰蛋白酶		×		15	1
胃蛋白酶		×		5	0.4
植物 木瓜蛋白酶		×		100	8
微生物 真菌淀粉酶	×			10	0.8
细菌淀粉酶		×		300	23
葡糖淀粉酶			×	300	23
霉菌蛋白酶	×			10	0.8
芽孢杆菌蛋白酶		×		500	38
果胶酶		×		10	0.8
葡糖异构酶			×	50	4
真菌凝乳酶			×	10	0.8

论有应用潜力的酶，如何进行有关菌种的筛选，如何发展遗传工程，克隆出能分泌大量蛋白质的菌种。本书最后将介绍关于以工业规模进行生产和蛋白质提纯的某些工程方面的问题。

张宗玉译 童坦君 校

第二章 酶的分泌

2.1 信号假说

胞外酶的关键特征是被转运到膜外。所以中心问题是了解蛋白质如何输出，细胞如何鉴别胞质蛋白质与那些注定要结合到膜中的以及注定要穿过膜到其他部位的蛋白质？分泌蛋白的前体常常有一延伸出15到30个氨基酸的氨基末端。有人曾经推荐一种说法，认为这种“信号（signal）”肽或“领头（leader）”肽在核蛋白体上一旦出现，就会引导核蛋白体到膜上去。按原始模型，信号肽与其他膜蛋白合在一起，在膜中形成一个孔眼或隧道。此孔眼或隧道用附着上核蛋白体而加以稳定。蛋白质一旦合成，即以所谓“同翻译分泌（cotranslational secretion）的过程”，通过此孔眼而被输出。只要该蛋白质的部分或全部被输出，信号肽就被一种特异的蛋白酶（信号肽酶）除去。信号假说的主要内容示于图1。虽然近年来此说已有实质性的改进，但其基本内容始终是正确的。

从信号假说可以得出以下六项重要原理：（1）膜结合核蛋白体与胞质核蛋白体并无差异。（2）分泌蛋白常以较大的前体形式被合成。（3）虽然不是绝对的，分泌蛋白在翻译的同时即被输出（同翻译分泌）。（4）某些蛋白质可能含有停止分泌的顺序（stop-secretion sequence），这种顺序会妨碍分泌；使此蛋白质成为膜固有蛋白。（5）膜中需要有某种形式的输出装置。（6）蛋白质的输出过程在进化上是高度保守的，其保守的程度达到使原核细胞可以识

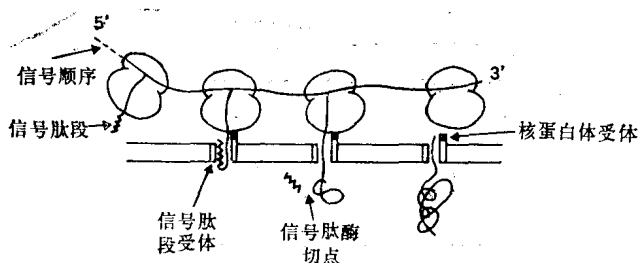


图1 蛋白质穿过膜输出的信号假学说图解 (Blobel等人, 1979)。信号顺序被翻译成信号肽, 信号肽段在膜上可识别一个或多个受体蛋白并与之结合而形成一个孔眼。同样, 核蛋白体也与其受体蛋白相结合。新生的多肽链即通过此孔眼转移, 信号顺序则被信号肽酶的蛋白质内切水解作用除去。在与翻译同时的转运完成时, 受体蛋白即可自由扩散入膜平面。

别真核细胞的信号肽, 真核细胞也可以识别原核细胞的信号肽段。本章将对蛋白质分泌的这些方面加以详细讨论。

2.1.1 输出蛋白的前体形式

按照信号假说对各种系统的新生的分泌蛋白进行鉴定, 分析其信号肽, 这是相当直截了当的。因为蛋白质的前体形式通常大于其相应的成熟蛋白质形式, 并可以通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 将其与成熟蛋白质分开。然而此种前体的生存期极短, 这使检出它们变得很复杂。在真核生物中, 可用无细胞翻译系统来加以克服, 这个系统在膜不含正在加工的酶的情况下, 加工制出前体蛋白。此类研究的第一个例子是用骨髓瘤细胞的 mRNA, 在体外网织红细胞溶胞系统中翻译出了免疫球蛋白 G (IgG) 轻链的前体形式。这一分子含有分子量为3000的额外肽段。然而, 将膜加入此翻译系统, 此前体形式就转变成成熟的IgG。Milstein及其同事在1972年完成的这一开创性工作, 很快在真核生物的其他系统中得到了推广。这是因为