

---

# 第四章 蛋白质工程及其在食品工业中的应用

## 第一节 蛋白质工程概述

蛋白质是对生命至关重要的一类生物大分子，各种生命功能、生命现象、生命活动都和蛋白质有关。在生命有机体催化、运动、结构、识别和调节等许多方面，起着关键的作用。

---

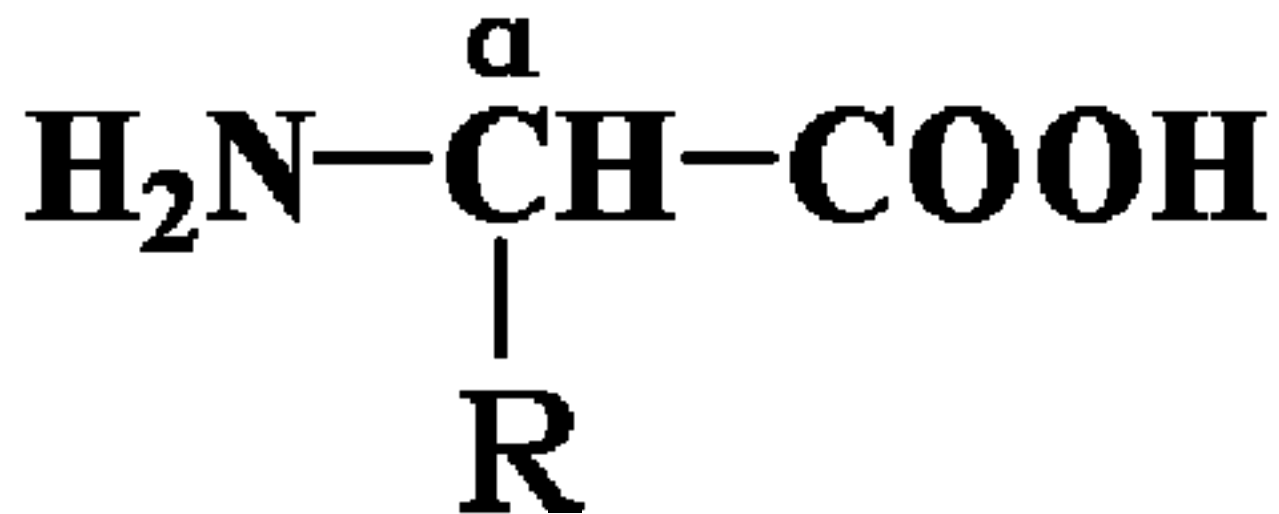
- 
- 酶.几乎全都是蛋白质。
  - 肌肉收缩、精子移动、细胞分裂过程中的染色体移动。
  - 高等生物的有序生长和分化过程。
  - 抗体蛋白能识别和结合特异性的外源物质，使人体具备抵抗各种细菌、真菌和病毒的能力。
  - 由神经细胞膜蛋白构成的离子通道，负责神经冲动的形成和传导。
  - 血红蛋白具有结合和释放氧的能力，是血液中氧、二氧化碳和氢离子的携带者。
  - 另外，人体的毛发和指甲属于角蛋白，而血栓是由血纤蛋白单体聚合而成的。
-

# 蛋白质的生物学功能 (总)

1. 催化功能: 酶
2. 调节功能: 激素
3. 结构功能: 皮、毛、骨、牙、细胞骨架
4. 运输功能: 血红蛋白
5. 免疫功能: 免疫球蛋白
6. 运动功能: 鞭毛、肌肉蛋白
7. 储藏功能: 酪蛋白
8. 生物膜功能:  
及神经传导等

蛋白质是生命的体现者，离开了蛋白质，生命将不复存在。可是，生物体内存在的天然蛋白质，有的往往不尽人意，需要进行改造。由于蛋白质是由许多氨基酸按一定顺序连接而成的，每一种蛋白质有自己独特的氨基酸顺序，所以改变其中关键的氨基酸就能改变蛋白质的性质。而氨基酸是由三联体密码决定的，只要改变构成遗传密码的一个或两个碱基就能达到改造蛋白质的目的。蛋白质工程的一个重要途径就是根据人们的需要，对负责编码某种蛋白质的基因重新进行设计，使合成的蛋白质更符合人类的需要。

# 氨基酸的结构特征



# 组成生物体蛋白质的20种氨基酸

氨基酸	氨基酸	氨基酸	氨基酸
丙氨酸	谷氨酰胺	亮氨酸	丝氨酸
精氨酸	谷氨酸	赖氨酸	苏氨酸
天冬酰胺	甘氨酸	甲硫氨酸	色氨酸
天冬氨酸	组氨酸	苯丙氨酸	酪氨酸
半胱氨酸	异亮氨酸	脯氨酸	缬氨酸

# 2. 组成生物体蛋白质的20种氨基酸2

氨基酸		英文	氨基酸		英文
赖 组 脯 苏 丝 色 天冬 精	<b>Lys</b> <b>His</b> <b>Pro</b> <b>Thr</b> <b>Ser</b> <b>Try</b> <b>Asp</b> <b>Arg</b>	<b>Lysine</b> <b>Histidine</b> <b>Proline</b> <b>Threonine</b> <b>Serine</b> <b>Tryptophan</b> <b>Aspartic acid</b> <b>Arginine</b>	谷 缬 半胱 丙 亮 酪 甲硫 (蛋)	<b>Glu</b> <b>Val</b> <b>Cys</b> <b>Ala</b> <b>Leu</b> <b>Tyr</b> <b>Met</b>	<b>Glutamic acid</b> <b>Valine</b> <b>Cysteine</b> <b>Alanine</b> <b>Leucine</b> <b>Tyrosine</b> <b>Methionine</b>
甘 苯丙	<b>Gly</b> <b>Phe</b>	<b>Glycine</b> <b>Phenylalanine</b>	谷酰 天冬酰 异亮	<b>Gln</b> <b>Asn</b> <b>Ile</b>	<b>Glutamine</b> <b>Asparagine</b> <b>Isoleucine</b>

## 肽 (肽键与肽2)

肽键就是由氨基酸的  
 $\alpha$ -羧基与相邻的氨基酸的  
 $\alpha$ -氨基脱水缩合而形成的  
化学键

---



# 肽 (肽键与肽3)

- **肽**: 氨基酸通过肽键连结起来的化合物
  - **二肽**: 两个氨基酸形成的肽
  - **三肽**: 三个氨基酸形成的肽
  - **多肽**: 许多氨基酸形成的肽
  - **蛋白质**: 大多为100个以上氨基酸组成的多肽
-

**氨基酸残基**: 多肽链中 不完全 的氨基酸。

氨基酸由于形成肽键而失去了一分子水，因此表现出其分子的不完整。

**氨基末端**: 多肽链中含有自由  $\alpha$ -氨基的一端。简称N-端

**羧基末端**: 多肽链中含有自由  $\alpha$ -羧基的一端。简称C-端

# ◆蛋白质工程的概念

1983年，美国生物学家额尔默首先提出了“蛋白质工程”的概念。蛋白质工程的实践依据DNA指导合成蛋白质，因此，人们可以根据需要对负责编码某种蛋白质的基因进行重新设计，使合成出来的蛋白质的结构变得符合人们的要求。

➤蛋白质工程就是以蛋白质的结构与功能为基础，利用基因工程的手段，按照人类自身的需要，定向地改造天然的蛋白质，甚至创造新的、自然界本不存在的、具有优良特性的蛋白质分子。

➤蛋白质工程是指通过生物技术手段对蛋白质的分子结构或者对编码蛋白质的基因进行改造，以便获得的更适合人类需要的蛋白质产品的技术。

➤蛋白质工程是指通过蛋白质化学、蛋白质晶体学和动力学的研究，获取有关蛋白质物理和化学等各方面的信息，在此基础上利用生物技术手段对蛋白质的DNA编码序列进行有目的的改造并分离、纯化蛋白质，从而获取自然界没有的、具有优良性质或适用于工业生产条件的全新蛋白质的过程。

# From Gene to Structure -- and Beyond

基因序列

蛋白质序列

蛋白质家族



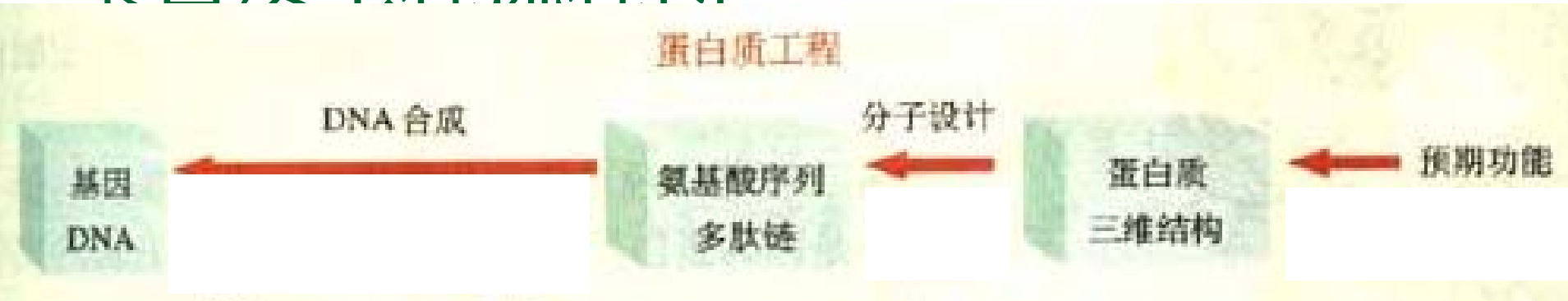
与疾病关系

折叠-进化

预测三级结构与功能

药物的靶分子

# 蛋白质工程流程图



1. 从预期的蛋白质功能出发
2. 设计预期的蛋白质结构
3. 推测应用的氨基酸序列
4. 找到相应的脱氧核苷酸序列

---

# 一、蛋白质的功能与结构

蛋白质分子的生物功能，与蛋白质分子的结构密不可分。决定蛋白质这种特殊生物功能的关键因素是它的分子构象。

---



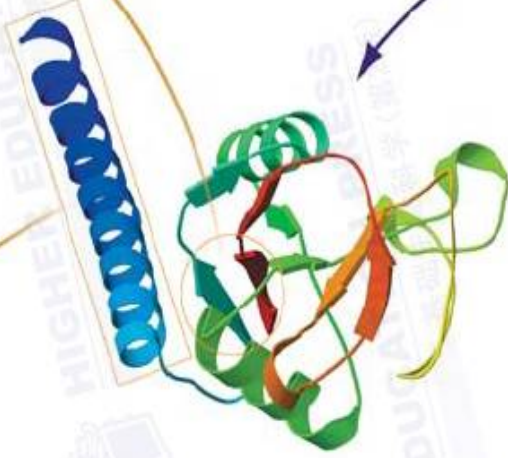
一级结构：氨基酸序列

... AIEVKLANMEAEINTLKSKELETKLHAFSM ... KFFVTN ... AVCEEP ...

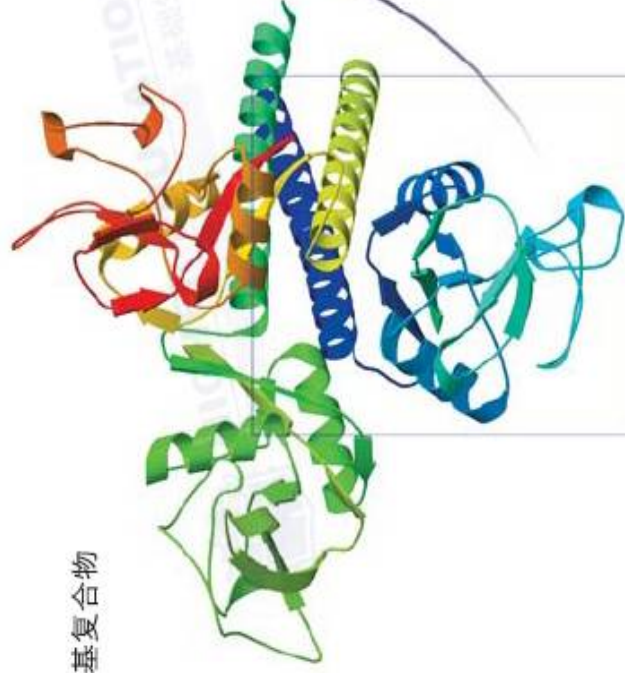
二级结构



三级结构：肽链的三维构象



四级结构：多亚基复合物





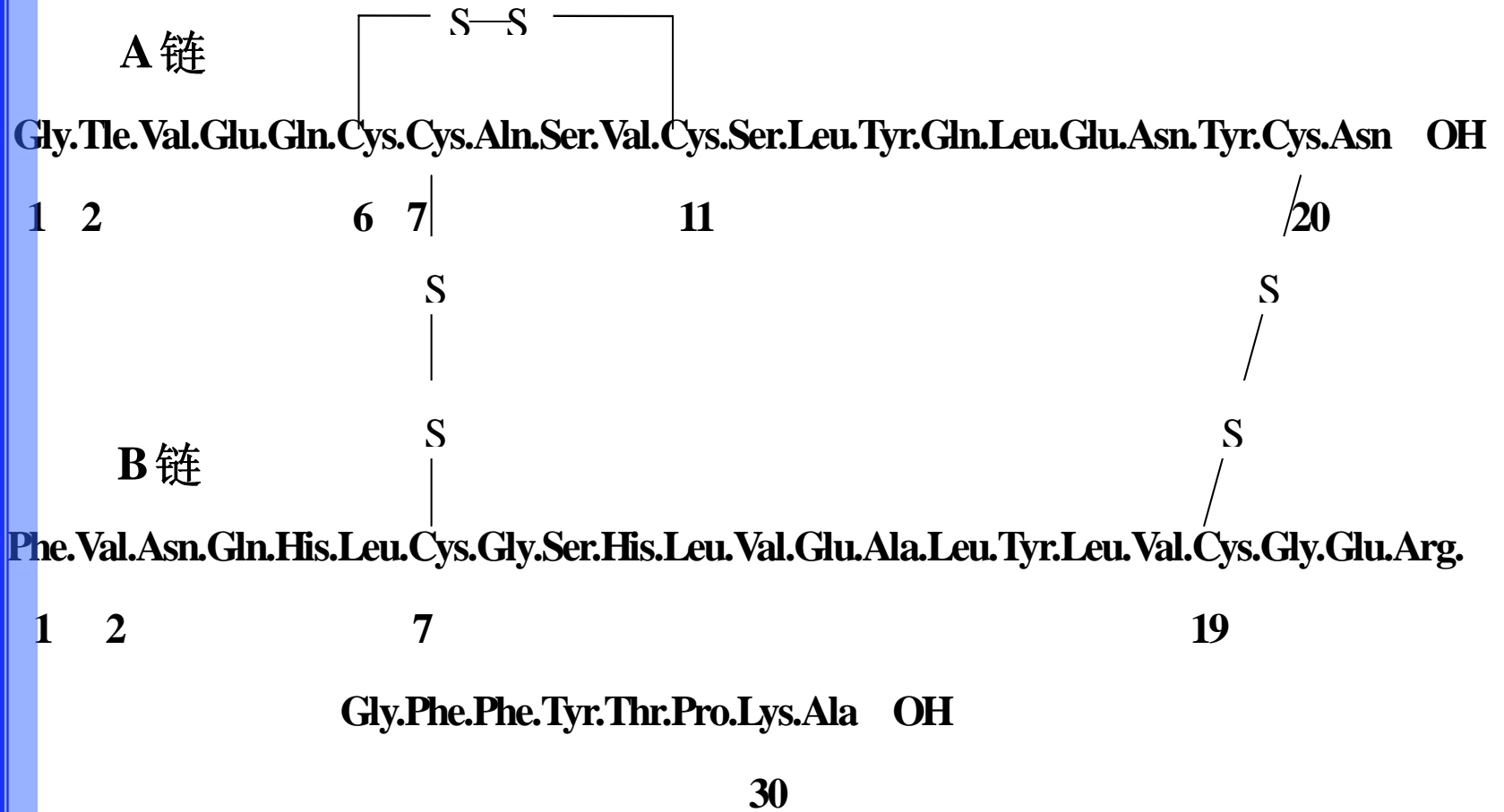
## ■ 蛋白质的一级结构

蛋白质的一级结构是指氨基酸按一定的顺序通过肽键相连而成的多肽链，也是蛋白质最基本的结构。

每一种蛋白质分子都有自己特有的氨基酸的组成和排列顺序即一级结构，由这种氨基酸排列顺序决定它的特定的空间结构，也就是蛋白质的一级结构决定了蛋白质的二级、三级等高级结构。

# 蛋白质分子的一级结构

## 牛胰岛素的化学结构



牛胰岛素的化学结构

# 维持蛋白质空间结构的化学键

(1) **氢键**: 氢原子与负电性强的原子(如氧、氮等)间形成。对蛋白质分子三维构象的维护很重要。

(2) **静电引力**: 正负带电基团之间的吸引力。对蛋白质分子三维构象的稳定贡献不是很大, 也称为离子键或盐键

(3) **范德华力**: 原子团相互接近时诱导所致。它变化多样, 对维持蛋白质活性中心的构象影响很大

(4) 疏水相互作用：是非极性基团为了避开水相而群集在一起的作用力。疏水作用是维持蛋白质高级结构的重要因素

(5) 二硫键：作用很强，对稳定蛋白质构象起重要作用

▶ 氢键、离子键、疏水作用和范德华力等次级键是非共价键

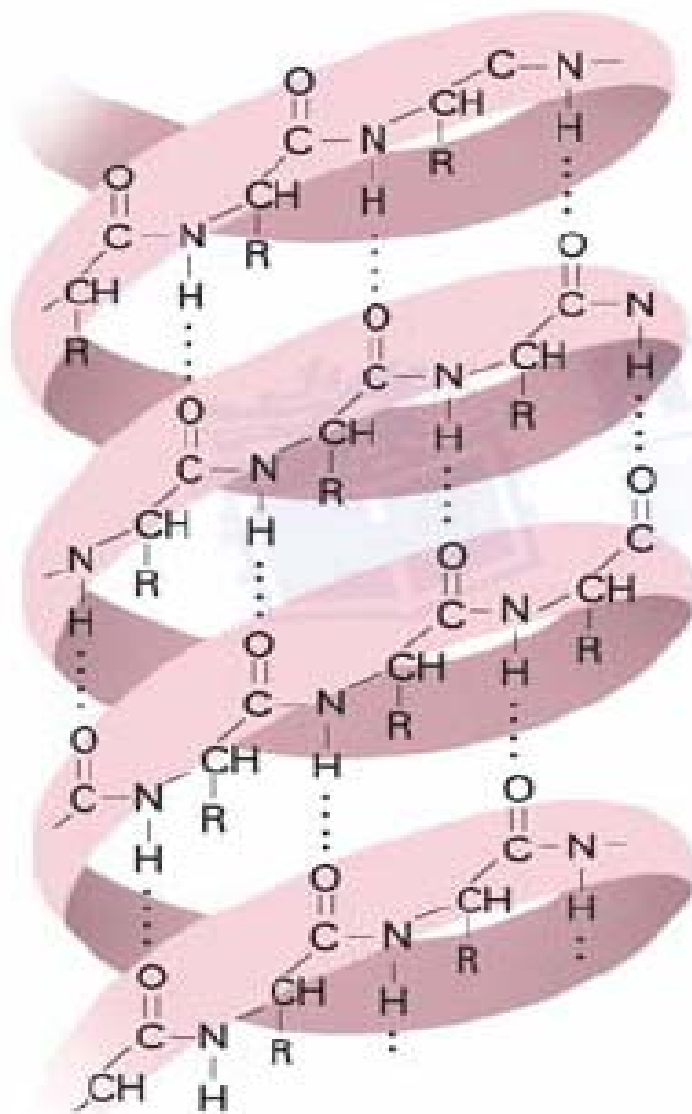
▶ 肽键、二硫键、酯键等被称之为共价键

## ■蛋白质二级结构

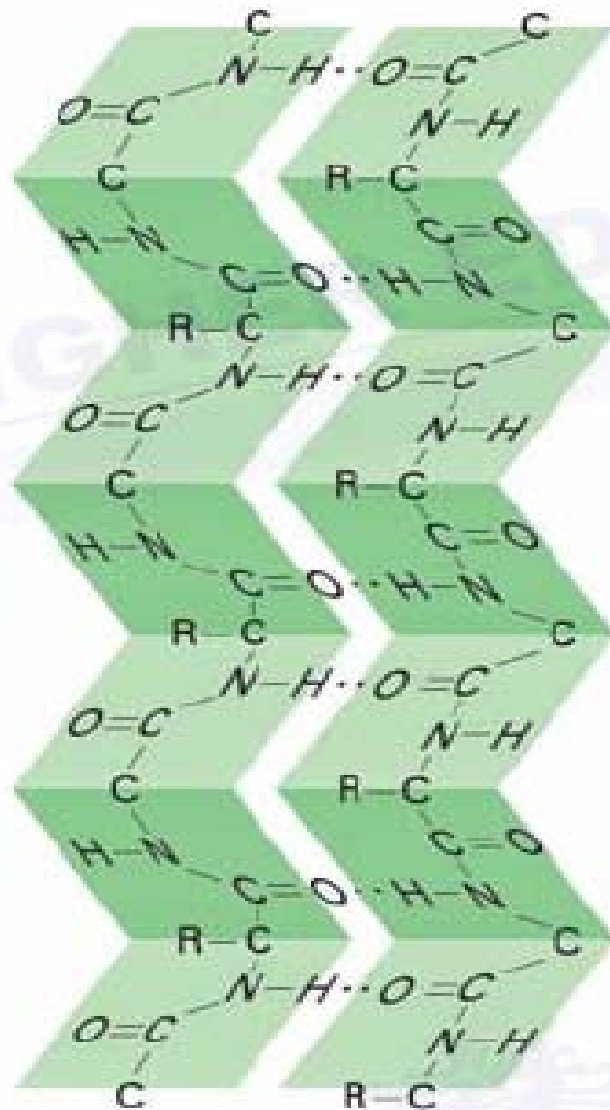
二级结构是指多肽链借助于氢键沿一维方向排列成具有周期性结构的构象，是多肽链局部的空间结构（构象）

主要形式：

$\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角、无规卷曲等

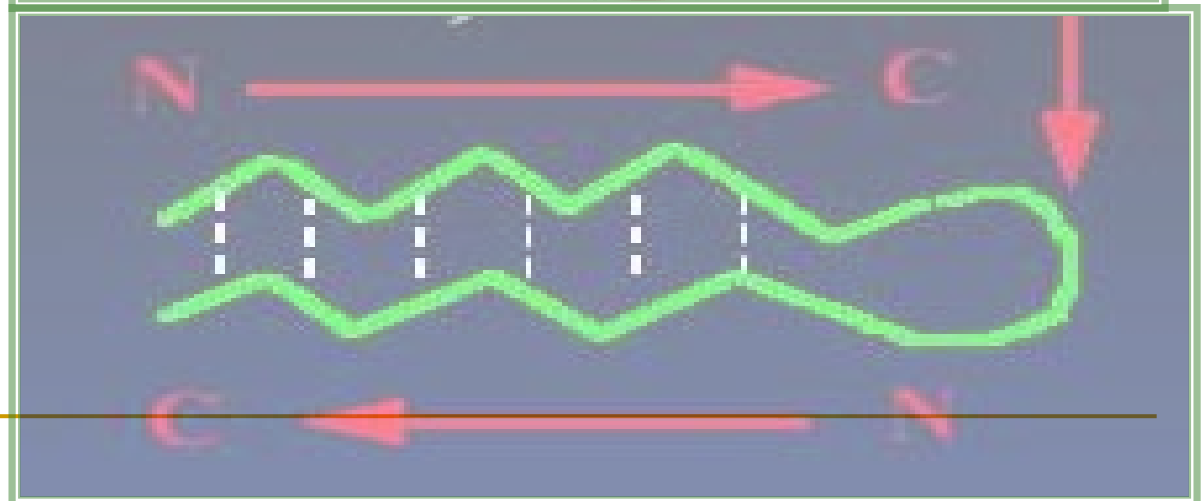
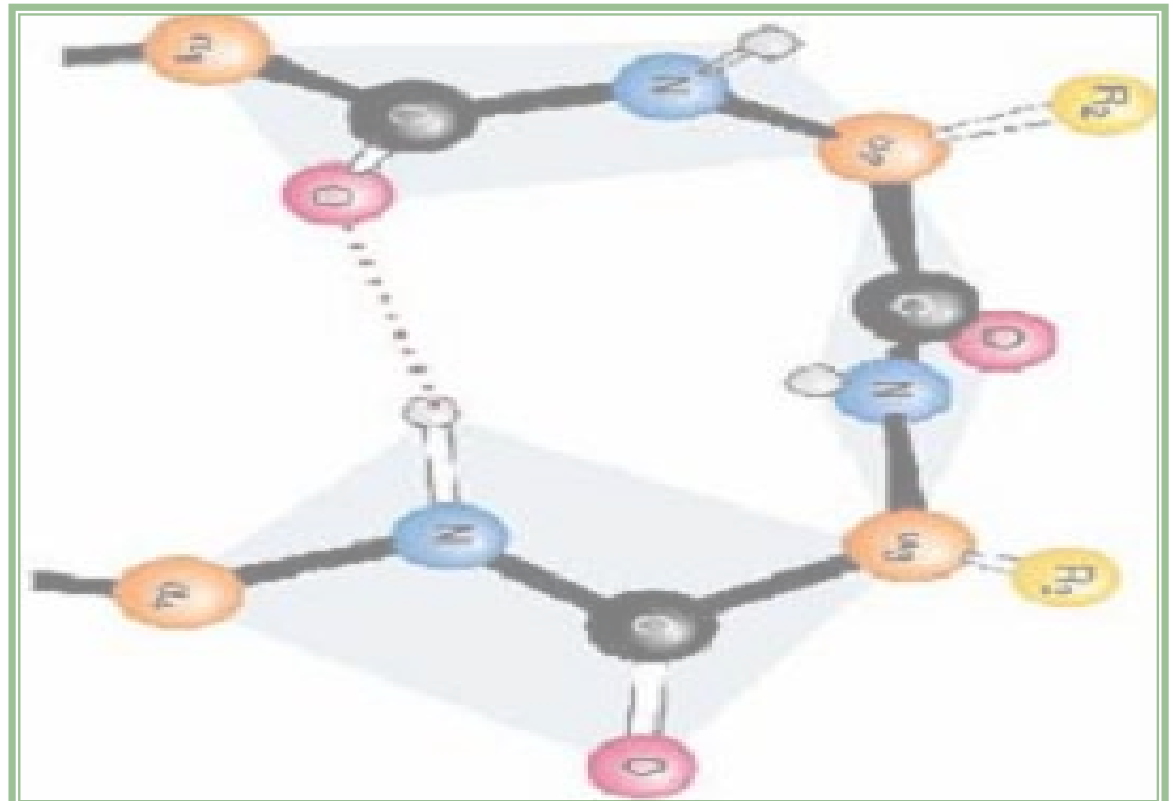


(a)  $\alpha$  螺旋



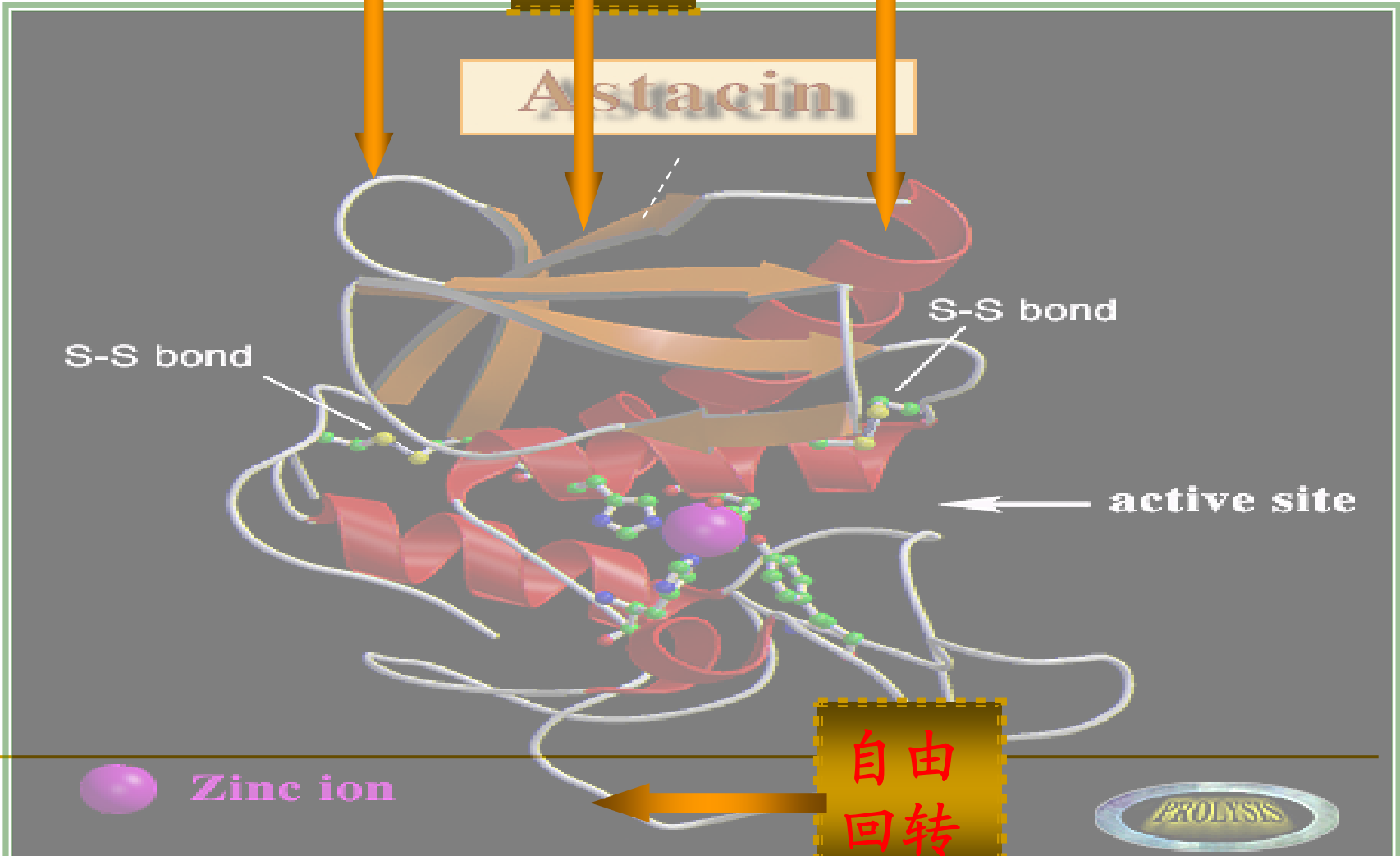
(b)  $\beta$  折叠

$\beta$ -转角

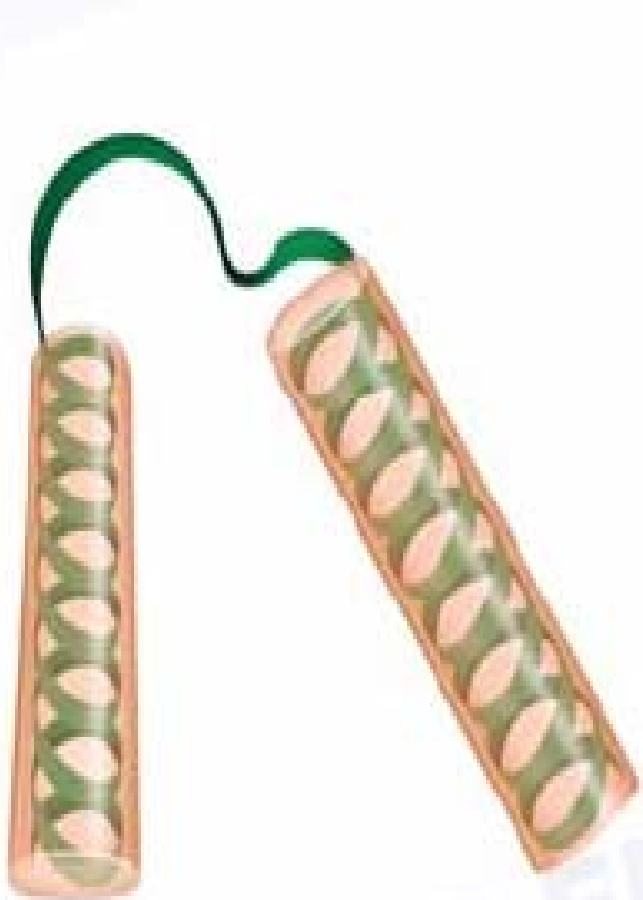


# 蛋白质分子的二级结构

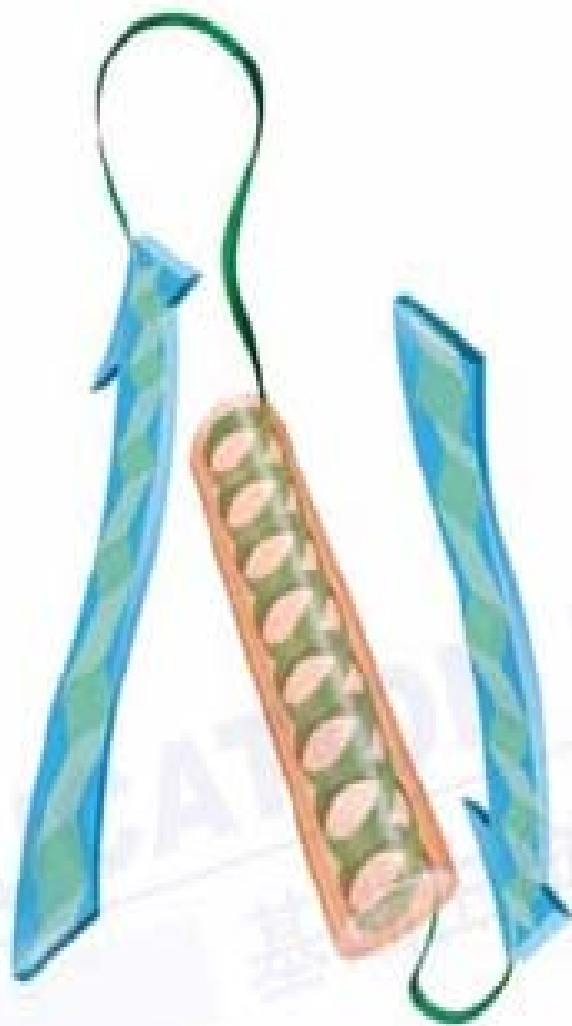
$\beta$  转角       $\beta$  折  
叠片       $\alpha$  螺旋







螺旋-环-螺旋结构



$\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ 结构



发夹结构

---

## ■三级结构

三级结构是指整条多肽链在二级结构的基础上进一步盘曲而成特定格式的三级结构。

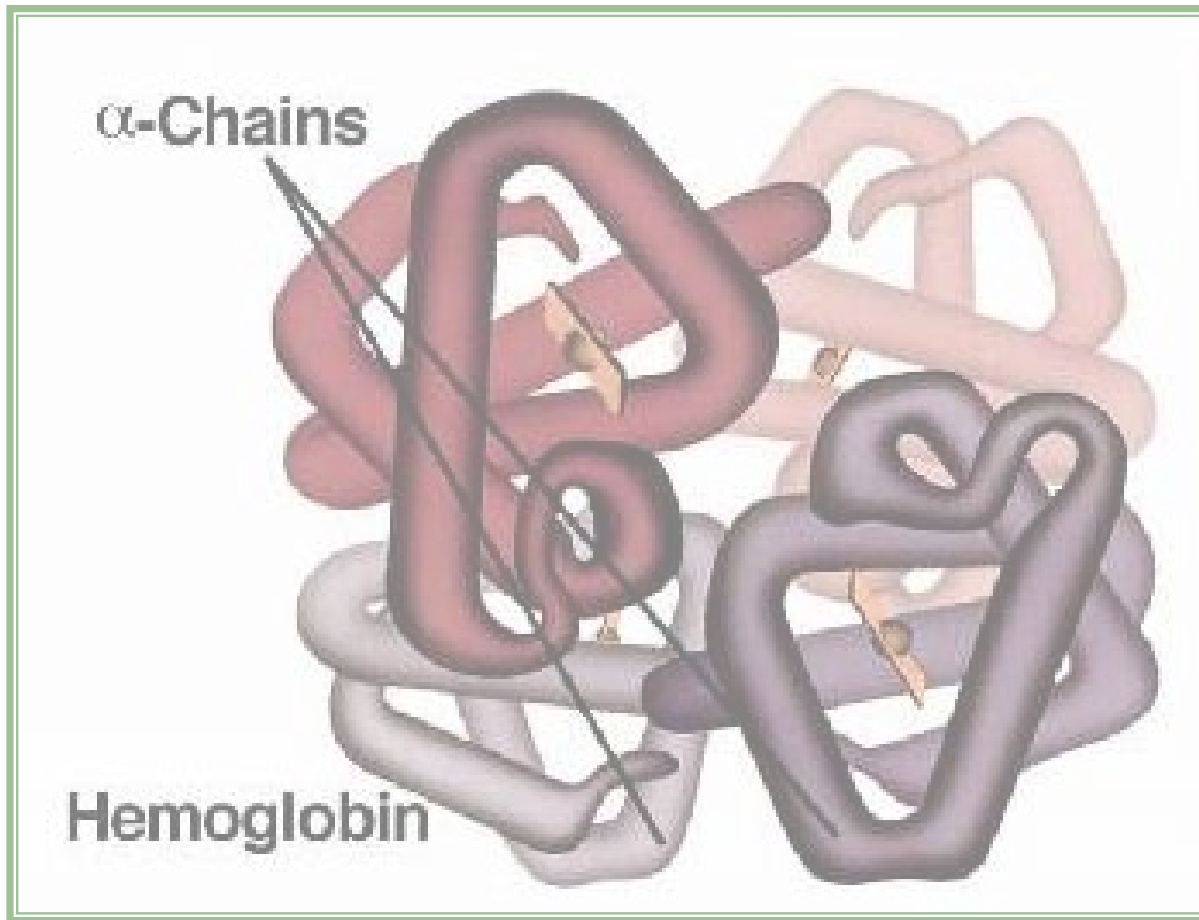
## ■四级结构

很多蛋白质分子是由两个或两个以上独立的、具有三级结构的多肽链组成的。

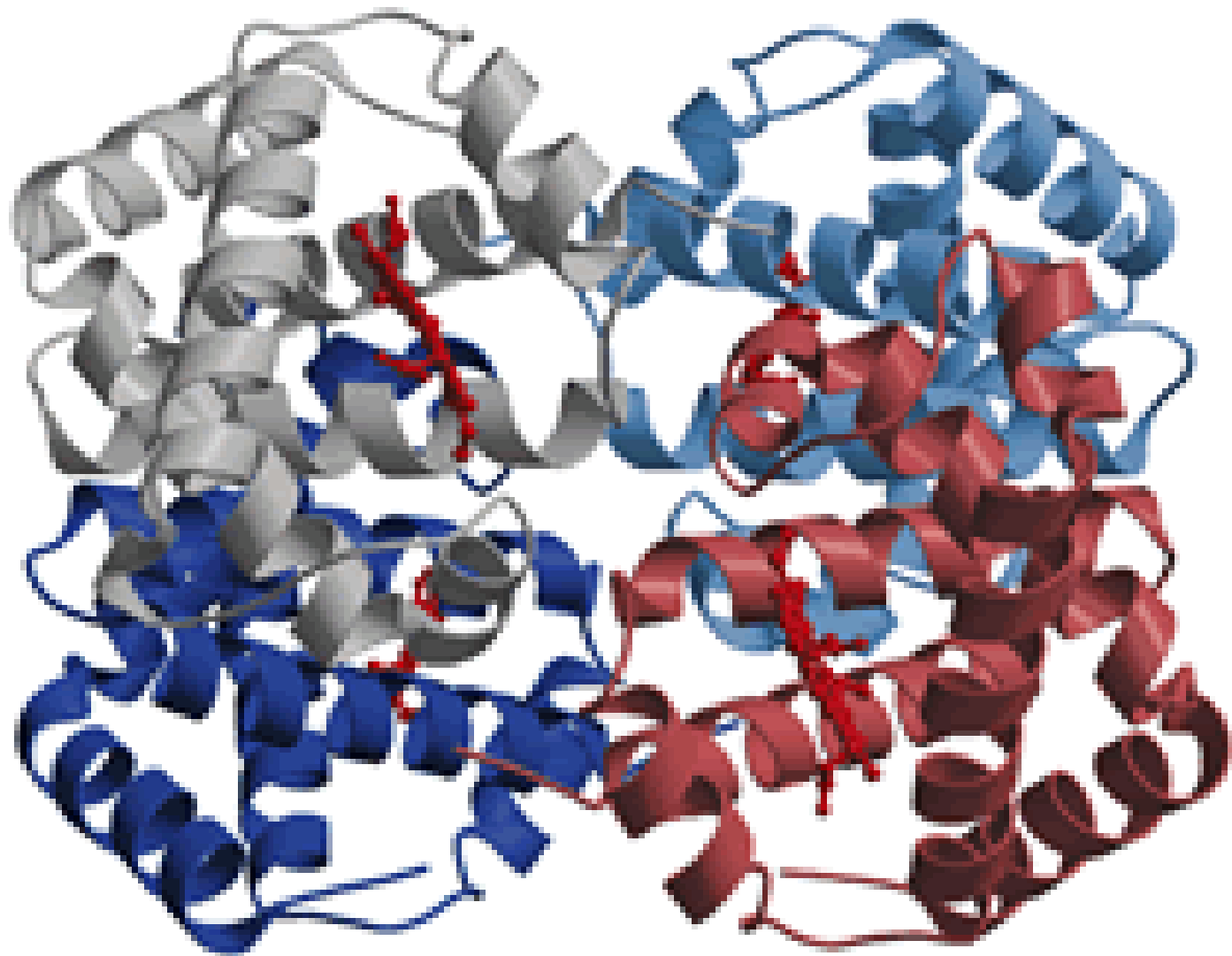
这些多肽链之间只是通过疏水作用等次级键结合成为有序排列的特定的空间结构，形成了四级结构。

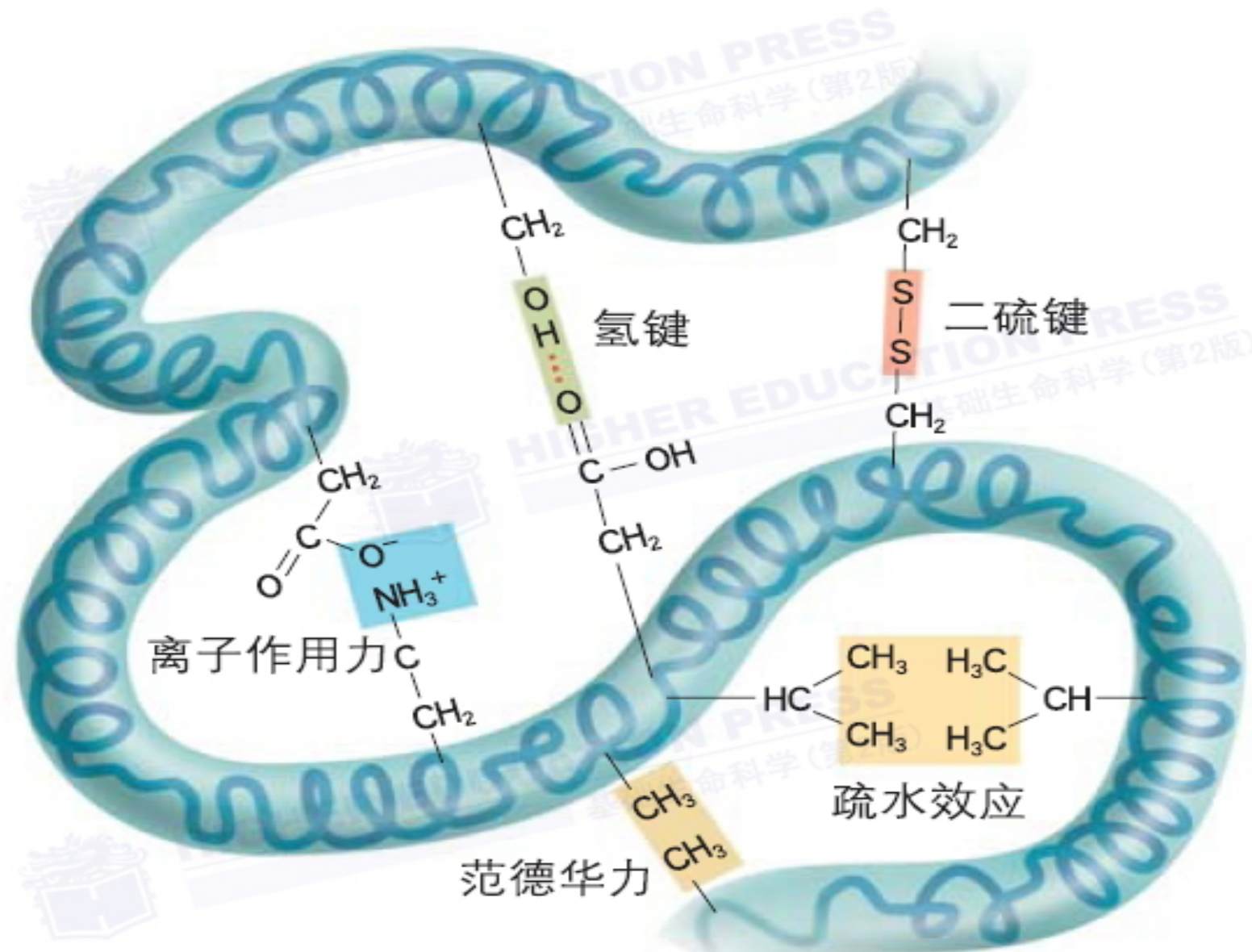
在四级结构的蛋白质分子中，每个具有三级结构的多肽链单位称为亚基，亚基多无生物学活性，具有完整四级结构的蛋白质分子才有生物学活性。

---



血红蛋白中四亚基两两相同，  
分别称为  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$





---

蛋白质工程主要包括4大类研究：

第一，利用已知的蛋白质一级结构的信息开发应用研究。

第二，定量确定蛋白质结构-功能关系。这是目前蛋白质工程研究的主体，它包括蛋白质三维结构模型的建立，酶催化的性质、蛋白质折叠和稳定性研究等。

第三，从混杂变异体库中筛选具有特定结构-功能关系的蛋白质。

第四，根据已知结构-功能关系的蛋白质，用人工方法合成它及其变异体。

---

## 第二节 蛋白质工程的基本步骤与改造策略

### 一、蛋白质工程的基本步骤

- (1) 分离纯化目的蛋白，使之结晶，进行分析，得到其空间结构的尽可能多的信息。
  - (2) 对目的蛋白的功能作详尽的研究，确定它的功能域。
  - (3) 通过对蛋白质的一级结构、空间结构和功能之间的相互关系分析，找出关键的基团和结构。
-

---

(4) 围绕这些关键的基团和结构提出对蛋白质进行改造的方案，并用基因工程的方法去实施。

(5) 对经过改造的蛋白质进行功能性测定。

---



---

## 二、蛋白质工程的改造策略

1、疏水氨基酸常常出现在蛋白质的活动中心区域； $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠区通常不会是酶的活性中心以及底物结合的中心，而是作为结构的支架；环区、转角区域和带电荷区域通常位于蛋白质的表面。

2、进行定点突变时，应注意保守氨基酸残基。如果要改变酶活性、底物结合活性等高度特异性的性质，则应尽量保留保守残基。

---

3、应注意保留潜在的N糖基化位点 (Asn-X-Ser / Thr-X-Pro) 中的Asn (天门冬酰胺)、Ser (丝氨酸) 或Thr (苏氨酸)。

4、对于含有内含子的序列，可以删除某一外显子或外显子组合，因为单个外显子通常编码独立折叠的结构域，删去该结构域后可能不会影响蛋白其余部分的正确折叠。

5、构建两个同源蛋白的嵌合体时，应尽量使其接合部位处在具有相同或相近功能的氨基酸序列中；而当两个非同源蛋白组成嵌合体时，则应使接合部分尽量位于所预测结构的边缘。

---

6、如果对目的蛋白的三维结构一无所知，那么可以在目的序列中随机插入六聚体接头以鉴定功能性结构域。插入六聚体接头后，在原蛋白质序列中添加两个氨基酸，比插入更多的氨基酸对蛋白质整体功能的破坏要轻。

7、进行缺失突变时，应避免直接利用天然存在的限制性酶切位点进行删除。

---

## 第三节、蛋白质改造方法与基本原理

在基因水平上对蛋白质进行改造，按改造的规模和程度可以分为：

- **初级改造**：个别氨基酸的改变和一整段氨基酸序列的删除、置换或插入
- **高级改造**：蛋白质分子的剪裁，如结构域的拼接
- **从头设计合成新型蛋白质**

---

# 一、初级改造

- 通过基因突变方法，以达到改变氨基酸进而改造蛋白质的目的。
  - 目前，主要采用的基因突变方法：
    - 基因定位突变
    - 盒式突变。
-

## ➤ 基因定位突变

根据三联体密码，编码DNA（目的基因）的确定位点，改变其组成核苷酸的顺序或种类，使基因发生定向变异，使其控制合成的氨基酸种类、顺序发生改变，合成出具有预期氨基酸序列的修饰蛋白质。

这种通过造成一个或几个碱基定点突变，以达到修饰蛋白质分子结构目的的技术，称为基因定点突变技术。

## ➤ 基因定位突变的基本过程:

首先使目的基因由环状载体折成单链，再对指定的位点用寡聚核苷酸诱导或置入合成的寡聚核苷酸产生定位突变基因，最后将突变基因导入适宜的表达系统(如大肠杆菌等)即可产生突变体蛋白质。这是目前定向改造蛋白质的基本手段。

## (一) M13-DNA寡聚核苷酸介导诱变技术

**特点：**能够准确按照人们的意图进行DNA突变，即想改变哪一个碱基就只改变哪一个，其他的不变

**基本过程：**将待研究的基因插入载体M13，制得单链模板，人工合成一段寡核苷酸（其中含一个或几个非配对碱基）作为引物，合成相应的互补链，用T4连接酶连接成闭环双链分子。经转染大肠杆菌，双链分子在胞内分别复制，因此就得到两种类型的噬菌斑，含错配碱基的就为突变型。再转入合适的表达系统合成突变型蛋白质。



## (二) 寡核苷酸介导的PCR诱变技术

**特点：**利用PCR技术定点诱变，可使突变体大量扩增，提高诱变率

以研究基因为模板，用人工合成的寡核苷酸（含有一个或几个非互补的碱基）为引物，直接进行基因扩增反应，就会产生突变型基因。分离出突变型基因后，在合适的表达系统中合成突变型蛋白质。这种方法直接、快速和高效。

## 过程:

- 将目的基因克隆到质粒载体上，质粒分置于两管中，每管各加入两个特定的PCR引物，一个引物与基因内部或其附近的一段序列完全互补，另一引物和另一段序列互补，但有一个核苷酸发生了突变；
- 两管中，不完全配对的引物与两条相反的链结合，即两个突变引物是互补的。由于两个反应中引物的位置不同，所以PCR扩增后，产物有不同的末端。
- 将两管PCR产物混合、变性、复性，则每条链会与另一管中的互补链退火，形成有两个切口的环状DNA，转入大肠杆菌后，这两个切口均可被修复。若同一管子中的两条DNA链结合，会形成线性DNA分子，它不能在大肠杆菌中稳定存在，只有环状DNA才能在大肠杆菌中稳定存在，而绝大多数的环状分子都含有突变基因。

### (三) 随机诱变技术

●常用方法：将基因克隆到质粒上，旁边有两个紧密相连的限制性内切酶位点，双酶解后产生一个3' 凹陷的末端和一个5' 凹陷的末端，与克隆基因想邻的末端是3' 凹陷和5' 凹陷。

### (四) 盒式突变技术

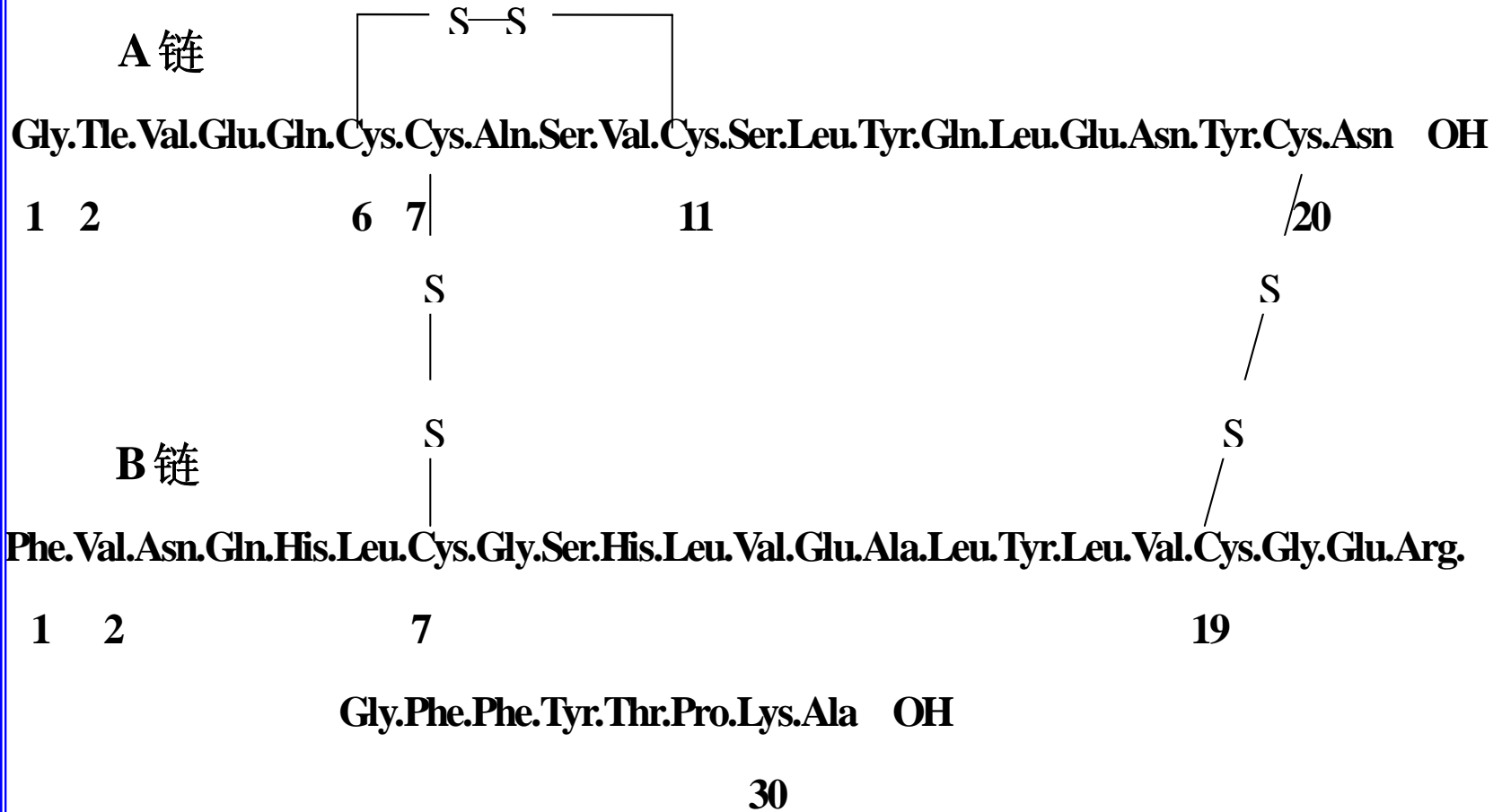
●1985年Wells提出的一种基因修饰技术，可经过一次修饰，在一个位点上产生20种不同氨基酸的突变体，从而可以对蛋白质分子中某些氨基酸进行“饱和性”分析。

---

利用定位突变在拟改造的氨基酸密码两侧造成两个原载体和基因上没有的内切酶切点，用该内切酶消化基因，再用合成的发生不同变化的双链DNA片段替代被消化的部分。这样一次处理就可以得到多种突变型基因。

---

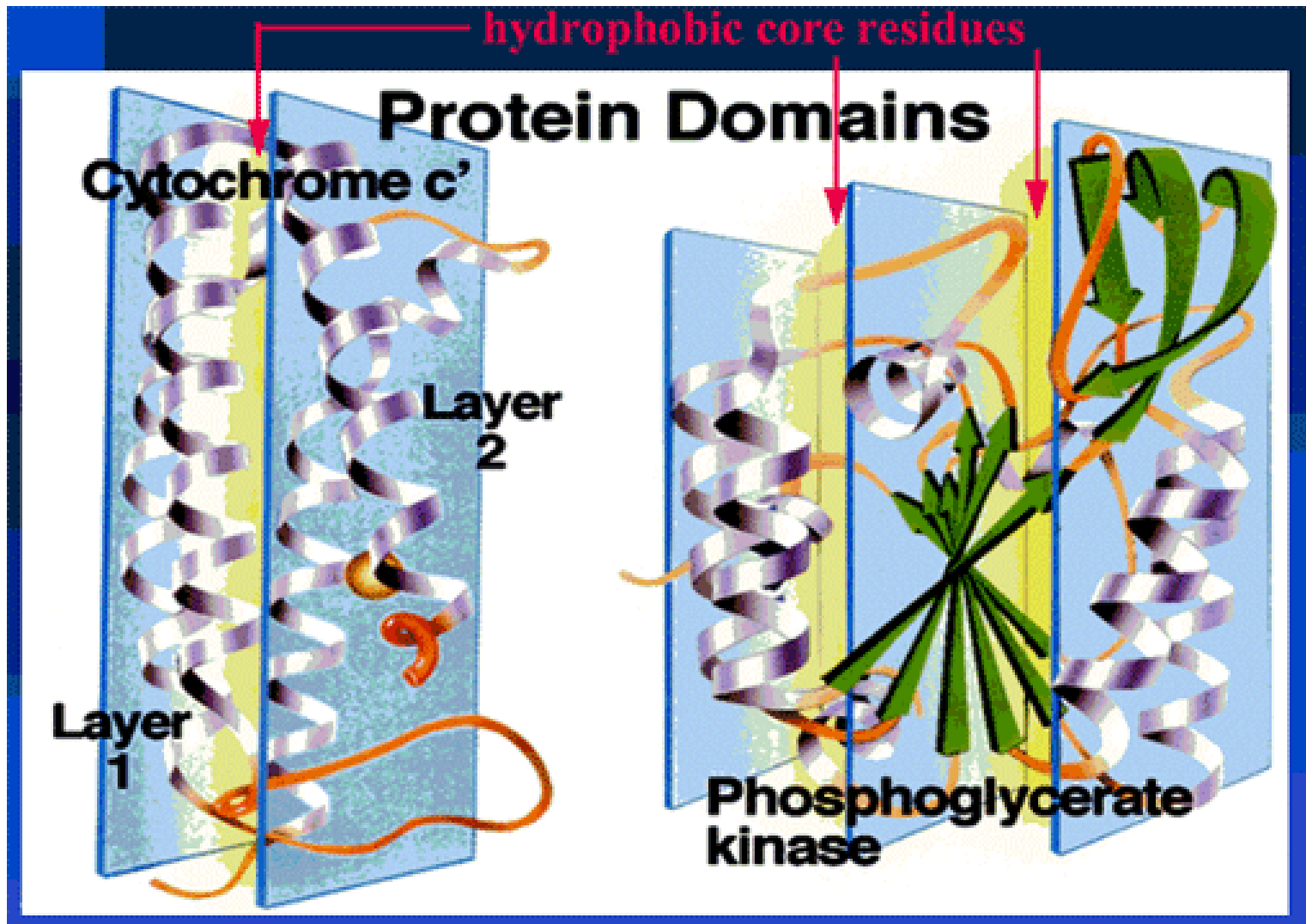
# 蛋白质初级结构改造的例子



牛胰岛素的化学结构

## 二、蛋白质分子的高级改造（结构域的拼接）

- 研究证明，在二级结构和三级结构之间还有一个结构层次，即结构域
- 结构域由  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠等二级结构单位按一定的拓扑学规则构成的三维结构实体。
- 构域是蛋白质分子中一种基本的结构单位，结构域拼接是通过基因操作把位于两种不同蛋白质上的几个结构域连接在一起，形成融合蛋白，它兼有原来两种蛋白的性质。



### 三、全新蛋白质的设计与构建

- 上述两种蛋白质改造方法，通常是从一个已知顺序、结构和功能的蛋白质出发，根据一定的目标和设计方案，使用多肽合成或者基因工程的方法，改变它的结构，以期达到改变其性质的目的。
- 如果要从头设计和构建一个自然界不存在的蛋白质，则需要借助多功能模板和蛋白质二级结构元件组装成某种具有特定功能的人工蛋白质分子。



---

## (一) 从头设计一个蛋白质的基本步骤

---

---

# 蛋白质分子设计

- 蛋白质分子设计是一门新兴的研究领域，其本身在不断地发展，其内容也在不断地更新。
  - 蛋白质分子设计方面的主要内容与研究进展，以及应用分子设计取得的成功实例。
-

---

# 蛋白质分子的特殊性

- 蛋白质分子功能的重要性
  - 蛋白质分子应用的局限性
  - 蛋白质分子结构的脆弱性
-

---

# 蛋白质工程与蛋白质设计

- 蛋白质设计及结构与功能关系研究的必要性
  - 蛋白质设计是多学科的交叉领域
  - 蛋白质设计在许多方面取得的显著进展
-

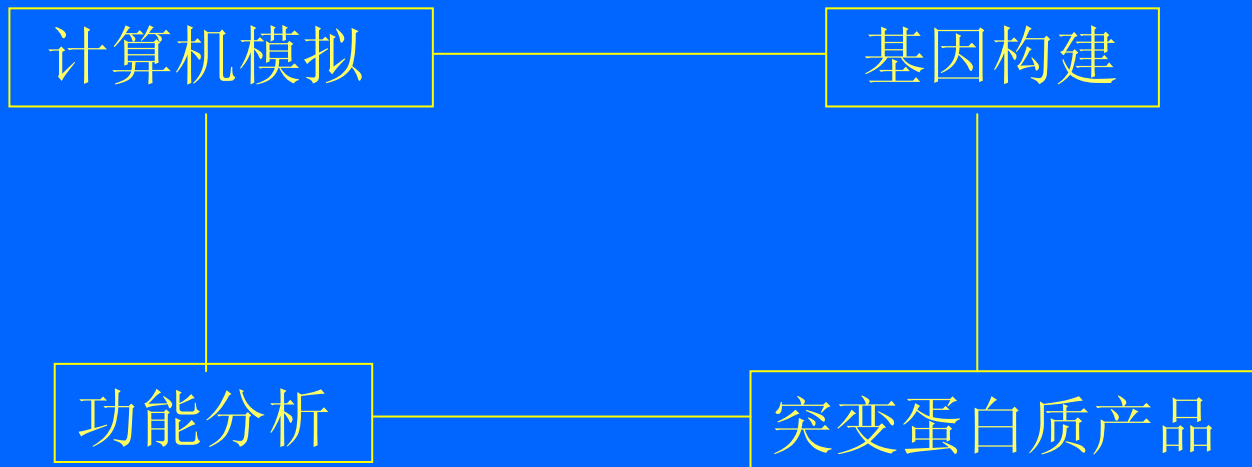
---

# 基于天然蛋白质结构的分子设计

## 一、概述

蛋白质结构与功能的关系的认识对蛋白质设计是至关重要的，蛋白质的结构涉及一级结构(序列)及三维结构。即使蛋白质的三维结构是已知的，选择一个合适的突变体仍是困难的，这说明蛋白质设计任务的艰巨性，它涉及多种学科的配合，如计算机模拟专家、X射线晶体学家、蛋白质化学家、生物技术专家等的合作与配合。

---



## 蛋白质设计循环

## 蛋白质分子设计大致涉及的几个重要方面

- 在蛋白质设计开始之前，要对所要求的活性进行筛选。由于真菌与细胞相对容易处理，因此它们是一个生物活性物质源。由于基因工程的发展，真核基因表达技术的发展使动物蛋白质与植物蛋白质的数目迅速增长，又增加了新的生物活性物质源。

# 蛋白质分子设计大致涉及的几个重要方面

- 筛选以及纯化蛋白质需要进行细致的表征，测定它们的序列、三维结构、稳定性、催化活性等。
- 专一性突变产物是蛋白质设计成败的关键。一些新技术，如PCR及自动化技术的发展使各种类型的基因工程变得快速、容易。
- 计算机模拟技术在蛋白质设计循环中占有重要位置。建立蛋白质三维结构模型，确立突变位点或区域以及预测突变后的蛋白质的结构与功能对蛋白质工程是至关重要的。
- 在明确突变位点或蛋白质序列应改变的区域后，可以进行定位突变，但要得到具有预期结构与功能的蛋白质是不容易的，可能需要经过几轮的循环。



# 蛋白质三维结构知识的必要性

蛋白质三维结构知识对于蛋白质工程是绝对必要的。目前**PDB(Protein Data Bank)**已收集数以万计个蛋白质晶体结构，但是通常蛋白质序列的数目比蛋白质三维结构的数目大**100**倍。当我们开始对某一天然蛋白质进行蛋白质分子设计时，首先要查找**PDB**了解这个蛋白质的三维结构是否已被收录。如果**PDB**中没有收录又未见文献报道，我们需要通过蛋白质**X**射线晶体学及**NMR**方法测定蛋白质的三维结构，或者通过结构预测的方法构建该蛋白质三维结构模型。

# 设计目标及解决办法

- 蛋白质结构与功能的关系对于蛋白质工程及蛋白质分子设计都是至关重要的。如果我们想改变蛋白质的性质，必须改变蛋白质的序列。
- **Hartley**等于**1986**年完成了一个我们所要的**有关蛋白质重要性质设计目标及解决办法表**，该表至今仍有参考价值。

## 蛋白质设计的目标及解决办法

设计目标	解决办法
热稳定性	引入二硫桥 增加内氢键数目 改善内疏水堆积 增加表面盐桥
对氧化的稳定性	把Cys转换为Ala或Ser 把Met转换为Gln、Val、Ile或Leu 把Trp转换为Phe或Tyr
对重金属的稳定性	把Cys转换为Ala或Ser 把Met转换为Gln、Val、Ile或Leu 替代表面羧基
pH稳定性	替换表面荷电基团 His、Cys以及Tyr的置换 内离子对的置换
提高酶学性质	专一性的改变 增加逆转数(turnover number) 改变酸碱度

## 二、蛋白质设计原理

- ①内核假设。所谓内核是指蛋白质在进化中保守的内部区域。在大多数情况，内核由氢键连接的二级结构单元组成。
- ②所有蛋白质内部都是密堆积(很少有空穴大到可以结合一个水分子或惰性气体)，并且没有重叠。
- ③所有内部的氢键都是最大满足的(主链及侧链)。

- 
- ④ 疏水及亲水基团需要合理地分布在溶剂可及表面及不可及表面。
  - ⑤ 在金属蛋白中，配位残基的替换要满足金属配位几何。
  - ⑥ 对于金属蛋白，围绕金属中心的第二壳层中的相互作用是重要的。
  - ⑦ 最优的氨基酸侧链几何排列。
  - ⑧ 结构及功能的专一性。形成独特的结构，独特的分子间相互作用是生物相互作用及反应的标志。实践表明这是蛋白质设计最困难的问题。
-

## 三、蛋白质设计中的结构-功能关系研究

- 蛋白质结构-功能关系的重要性
- 定位突变在蛋白质结构与功能关系研究中的作用
- 构象的探测

# 定位突变种类

- 插入一个或多个氨基酸残基；
- 删除一个或多个氨基酸残基；
- 替换或取代一个或多个氨基酸残基。
- 最大量的定位突变是在体外利用重组DNA技术或PCR方法。
- 突变的加和性原则

# 突变蛋白质结构的评估

- 溶解性
- 热力学分析
- X射线晶体学及NMR谱
- 圆二色散方法
- 单克隆抗体探测构象变化



# 蛋白质中功能残基的鉴定

1. 根据已知结构信息确定功能残基
2. 突变实验方法鉴定功能残基
3. 利用蛋白质同源性鉴定功能残基

# 结构与功能的容忍度

- 蛋白质结构及功能对残基的替换有一定的容忍度，即结构与功能关系有一定的稳健度。
- **Fersht**等替换了**Barnase**的所有内核残基。结果表明**23%**的突变体保留了酶的活性。
- **Mathews**及其合作者在溶菌酶内核中替换多至**10**个残基。实验证明多重取代的蛋白仍具有活性以及协同折叠。
- 这些结果说明不同的氨基序列具有相近的设计的结构。

## 第二部分 全新蛋白质设计

### ■ 特征：

全新蛋白质设计是另一类蛋白质工程，合成具有特异结构与功能的新蛋白质。根据所希望的结构及功能设计蛋白质或多肽的氨基酸序列。

# 蛋白质的全新设计内容

- 蛋白质结构的从头设计
- 蛋白质功能的从头设计
- 取得的进展：血红素结合蛋白、氧化还原活性蛋白质、**DNA**结合蛋白及基于蛋白质的高分子材料。

# 一、蛋白质结构的从头设计

1. 二级结构模块单元的自组装
2. 配体诱导组装
3. 通过共价交叉连接实现肽的自组装
4. 在合成模板上肽的组装
5. 线性多肽折叠为球状结构
6. 基于组合库的全新蛋白质设计

## 二、蛋白质功能的全新设计

- 蛋白质设计的目标是产生既能折叠为预想的结构又具有有趣和有用的功能。功能设计主要涉及键合及催化。
- 为达到这些目的可以采用两条不同的途径：反向实现蛋白质与工程底物的契合，改变功能；从头设计功能蛋白质。

# 蛋白质的功能设计

1. 通过反向拟合天然蛋白质设计新的功能
2. 键合及催化的从头设计
3. 在全新蛋白质中引入结合位点
4. 催化活性蛋白质的设计
5. 膜蛋白及离子通道的设计
6. 新材料的设计

## 第四节 蛋白质工程在食品中的应用

蛋白质工程自问世以来，短短十几年的时间，已取得了引人瞩目的进展，在医学和工业用酶方面也获得了良好的应用前景。

➤提高蛋白的稳定性包括以下几个方面：

- ①延长酶的半衰期；
- ②提高酶的热稳定性；
- ③延长药用蛋白的保存期；
- ④抵御由于重要氨基酸氧化引起的活性丧失。



## 一、消除酶的被抑制特性

➤1985年，美国的埃斯特尔借助寡核苷酸介导的定位突变技术，用19种其他氨基酸分别替代枯草芽孢杆菌蛋白酶分子第222位残基上易氧化的Met，获得了一系列活性差异很大的突变酶。发现除了用Cys代替Met的突变体以外，其他突变体的酶活性都降低了。

## 二、引入二硫键，改善蛋白质的热稳定性

- 溶菌酶分子：由一条肽链构成，并在空间上折叠形成二个相对独立的结构域，酶活性中心位于二个结构域之间。该酶分子在第97位和54位残基上是两个未形成二硫键的半胱氨酸
- 由于二硫键是一种稳定蛋白质分子空间结构的重要共价化学键，有如建筑所用的钢筋一样，因而能将分子中的不同部位牢固地联结在一起。因此，提高酶热稳定性最常用的办法是在分子中增加一对或数对二硫键。

### 三、转化氨基酸残基，改善蛋白质热稳定性

- 在高温下Asn和Gln容易脱氨形成Asp和Glu，而导致蛋白质分子构象的改变，使蛋白质失去活性。
- 对酿酒酵母的磷酸丙糖异构酶进行诱变改造。这种酶有两个相同的亚基，每个亚基含有2个Asn，由于它们都位于亚基之间的界面上，可能对酶的热稳定性起决定性作用。
- 通过寡核苷酸介导的定向诱变技术，将第14位和第78位上的2个Asn分别转变成Thr(苏氨酸)和Ile(异亮氨酸)残基，大幅度提高突变酶的热稳定性。

## 四、改变酶的最适pH值条件

- 葡萄糖异构酶最适pH为碱性，在80℃稳定，而在碱性条件下，80℃时使高果糖浆焦化产生有害物质，反应只能在60℃进行。
- 采用盒式突变技术将葡萄糖异构酶分子中酸性氨基酸 (Glu或Asp) 集中的区域置换为碱性氨基酸 (Arg或Lys)，可使葡萄糖异构酶的最适pH值变为酸性，即可在高温下进行反应

## 五、提高酶的催化活性

- 酶的催化活性由酶分子上的必需基团决定
- 如对酪氨酸-tRNA合成酶进行定点突变
- 在天然状态下，酪氨酸-tRNA合成酶分子内第51位苏氨酸残基的羟基能与底物酪氨酰腺嘌呤核苷酸戊糖环上的氧原子形成氢键，这个氢键的存在影响酶分子与另一底物ATP的亲合力。因此，利用定向诱变技术将酶分子第51位苏氨酸残基改变为脯氨酸残基，酶(Pro-51)与ATP的亲合力被增加了近100倍，而且最大反应速度亦大幅度提高。

## 六、修饰酶的催化特异性

➤ 利用定点突变技术葡萄糖淀粉酶的催化特性。如将活性中心的Glu、Asp被Gln、Asn取代时，突变体酶分解 $\alpha$ -1, 4糖苷键和 $\alpha$ -1, 6糖苷键的活性比例发生明显改变

## 七、修饰Nisin的生物防腐效应

➤ Nisin是乳酸球菌分泌的有较强抗菌作用的小分子肽，可用于罐头食品、乳制品、肉制品的保藏

➤ Nisin由34个氨基酸残基构成

---

➤ Nisin分子结构中包含5种稀有氨基酸，即ABA、DHA、DHB、ALA-S-ALA和ALA-S-ABA，它们通过硫醚键形成五个内环。

➤ 改变Nisin氨基酸的序列，可增强其稳定性、溶解度和扩大抑菌谱等，扩大Nisin的应用范围。

---

## 思考题

- 1、什么是蛋白质工程？蛋白质工程基本步骤有哪些？
- 2、改造蛋白质的方法有哪些？
- 3、简述蛋白质工程技术在食品工业中的应用。