

# 第六章 蛋白质工程

## 第一节 蛋白质工程基础

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。

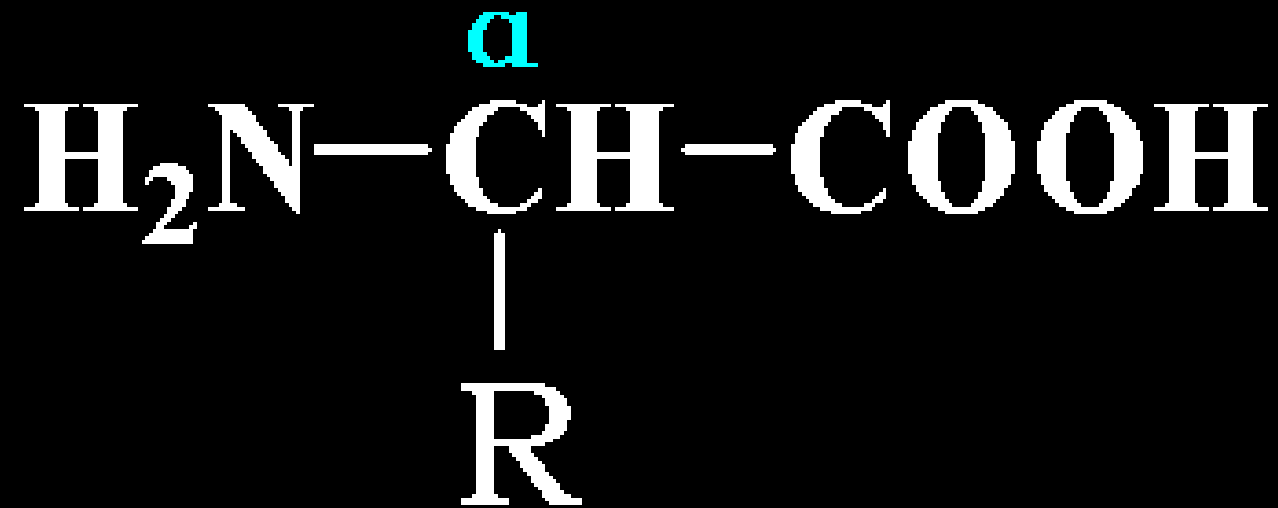
# 蛋白质的生物学功能 (总)

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
-

1 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。

2 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，使合成的蛋白质变得更符合人类的需要。

# 氨基酸的结构特征



**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

# 组成生物体蛋白质的20种氨基酸

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

## 肽 (肽键与肽)

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)

- **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
-

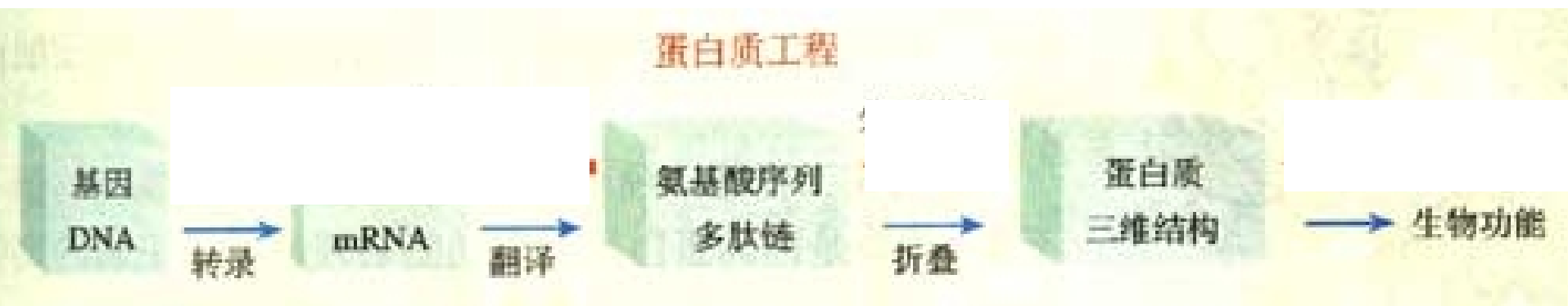


# ◆蛋白质工程的概念

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。

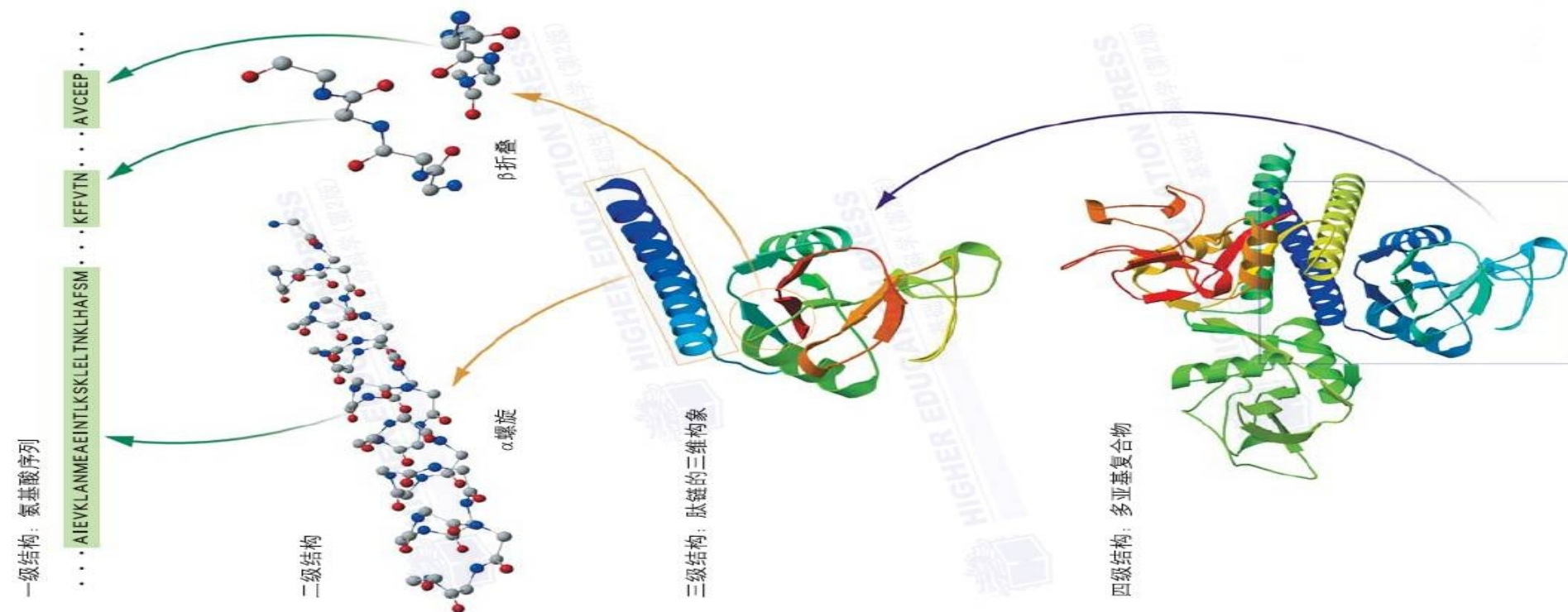
# 蛋白质工程流程图



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。



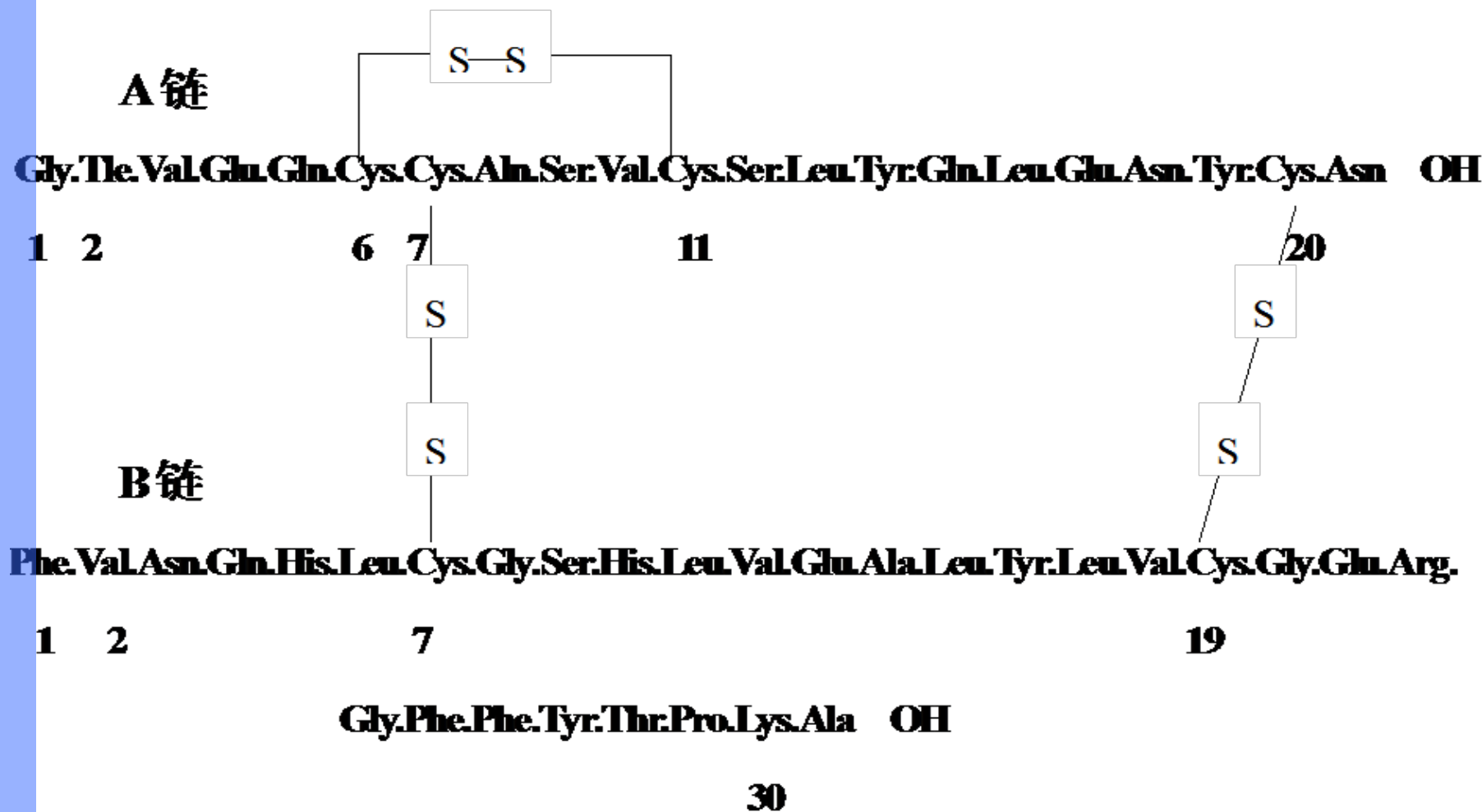
## ■蛋白质的一级结构

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

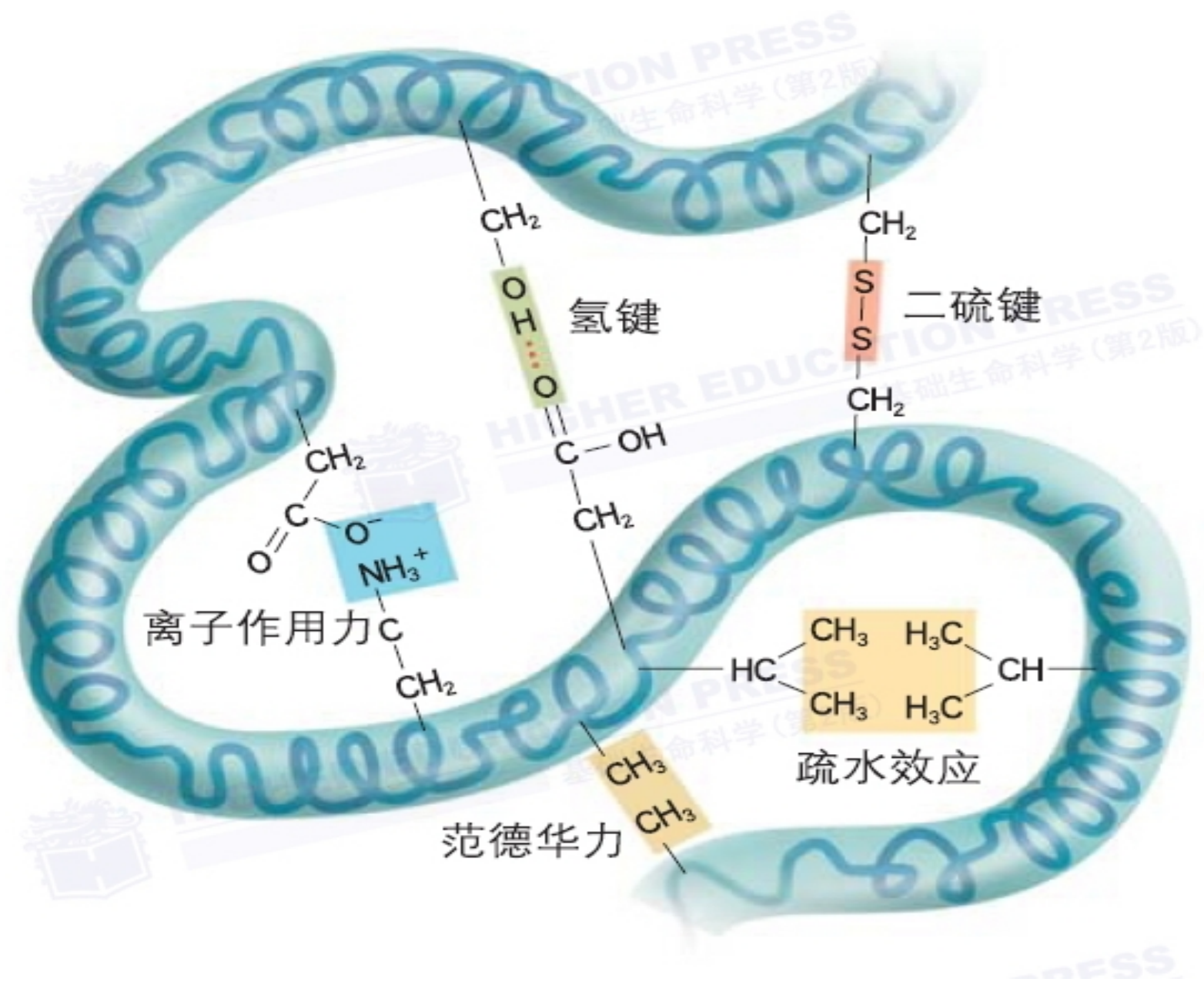
(3) **范德华力**: 原子团相互接近时诱导所致。它变化多样，对维持蛋白质活性中心的构象影响很大

(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



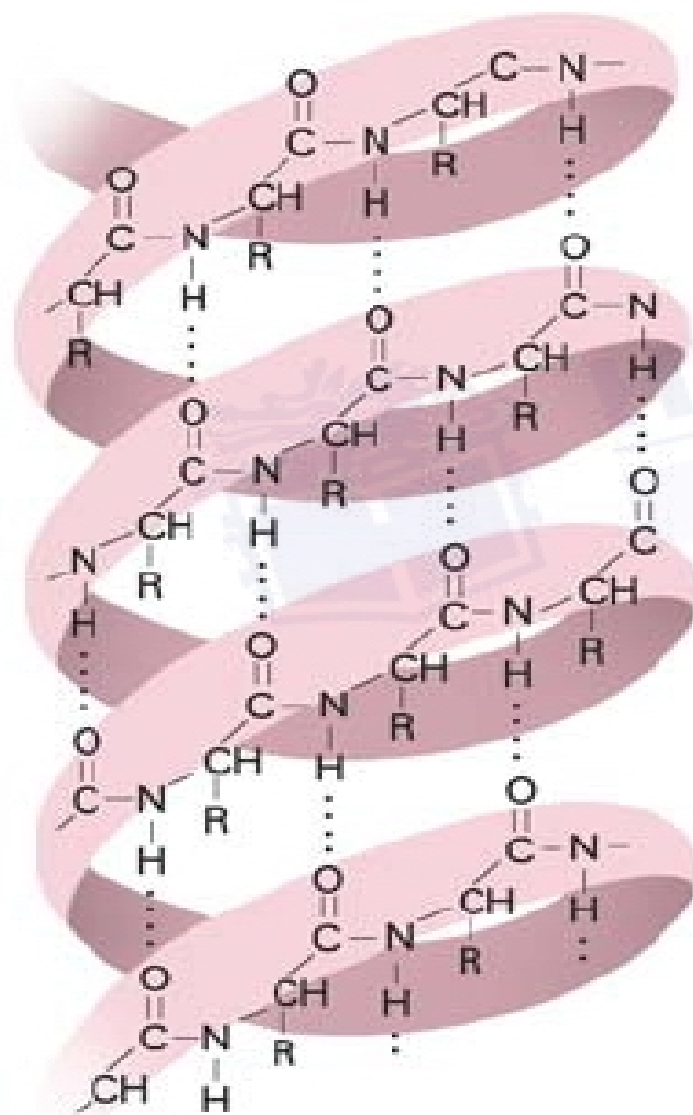


## ■蛋白质二级结构

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

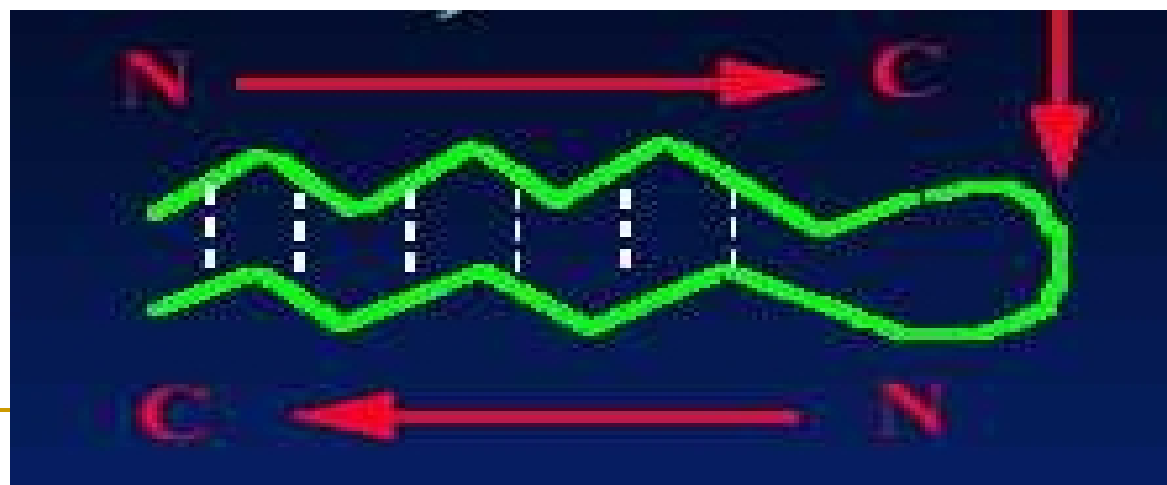
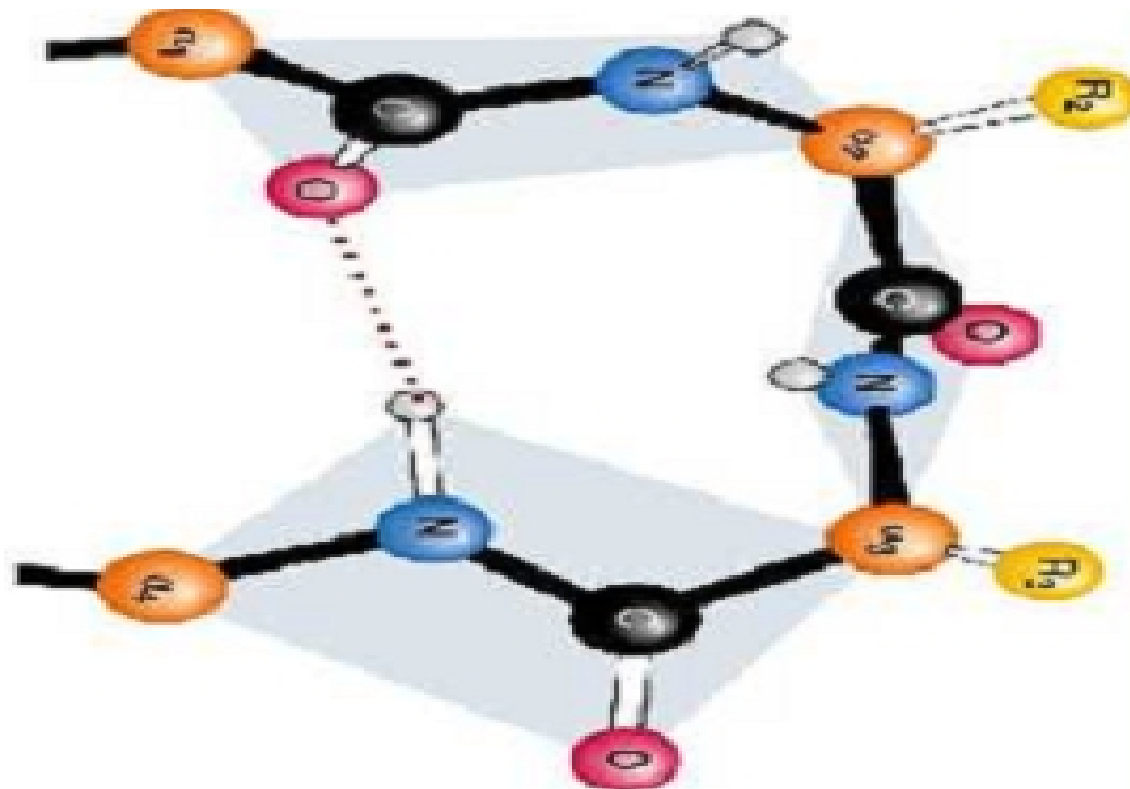


(a)  $\alpha$  螺旋

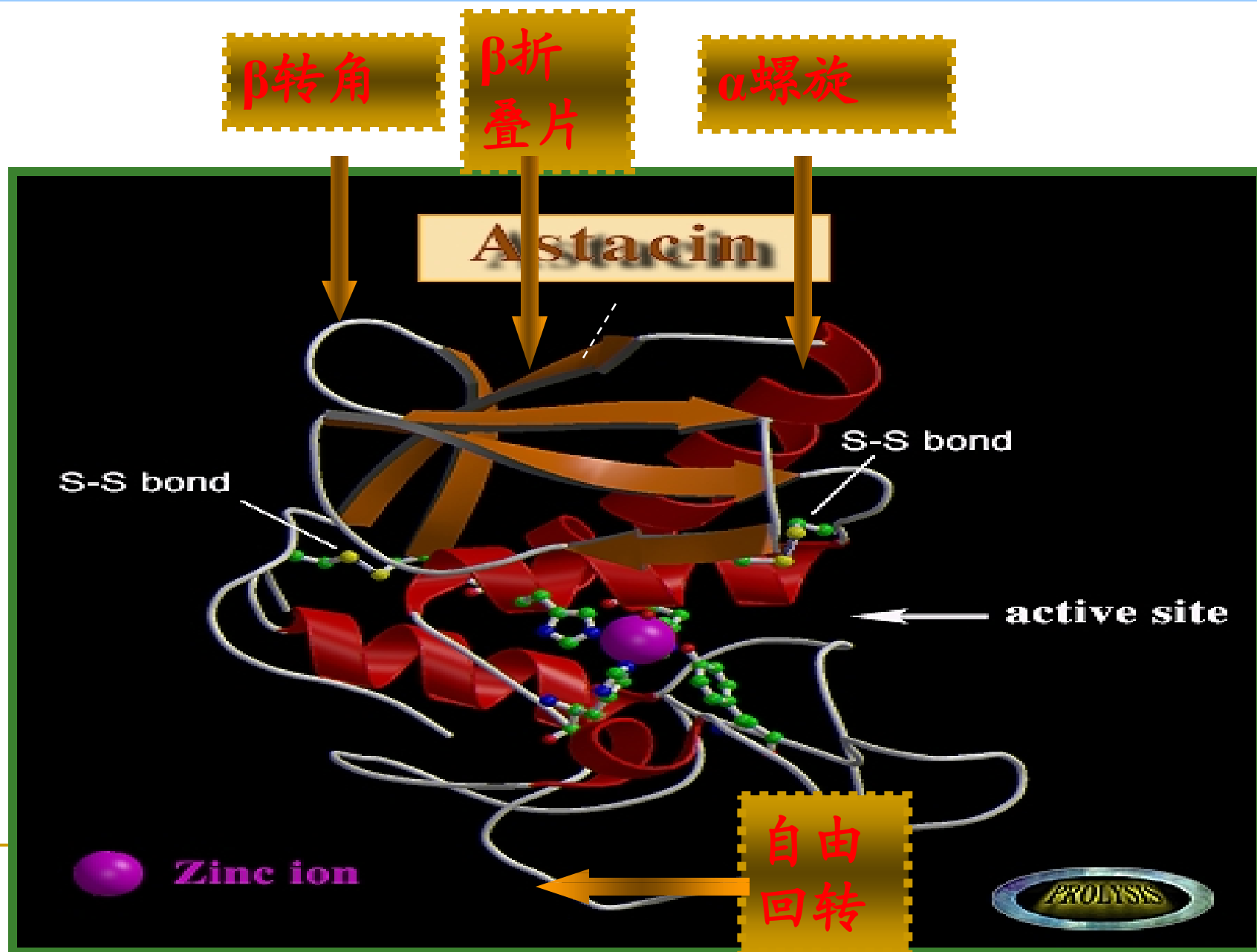


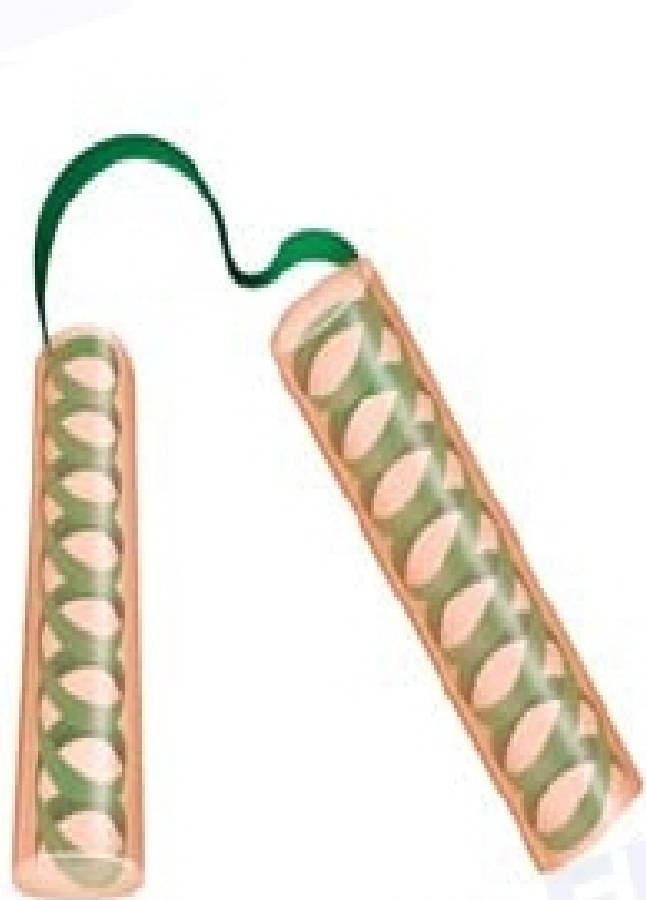
(b)  $\beta$  折叠

$\beta$ -转角



# 蛋白质分子的二级结构





螺旋-环-螺旋结构



$\beta-\alpha-\beta$  结构



发夹结构

## ■三级结构

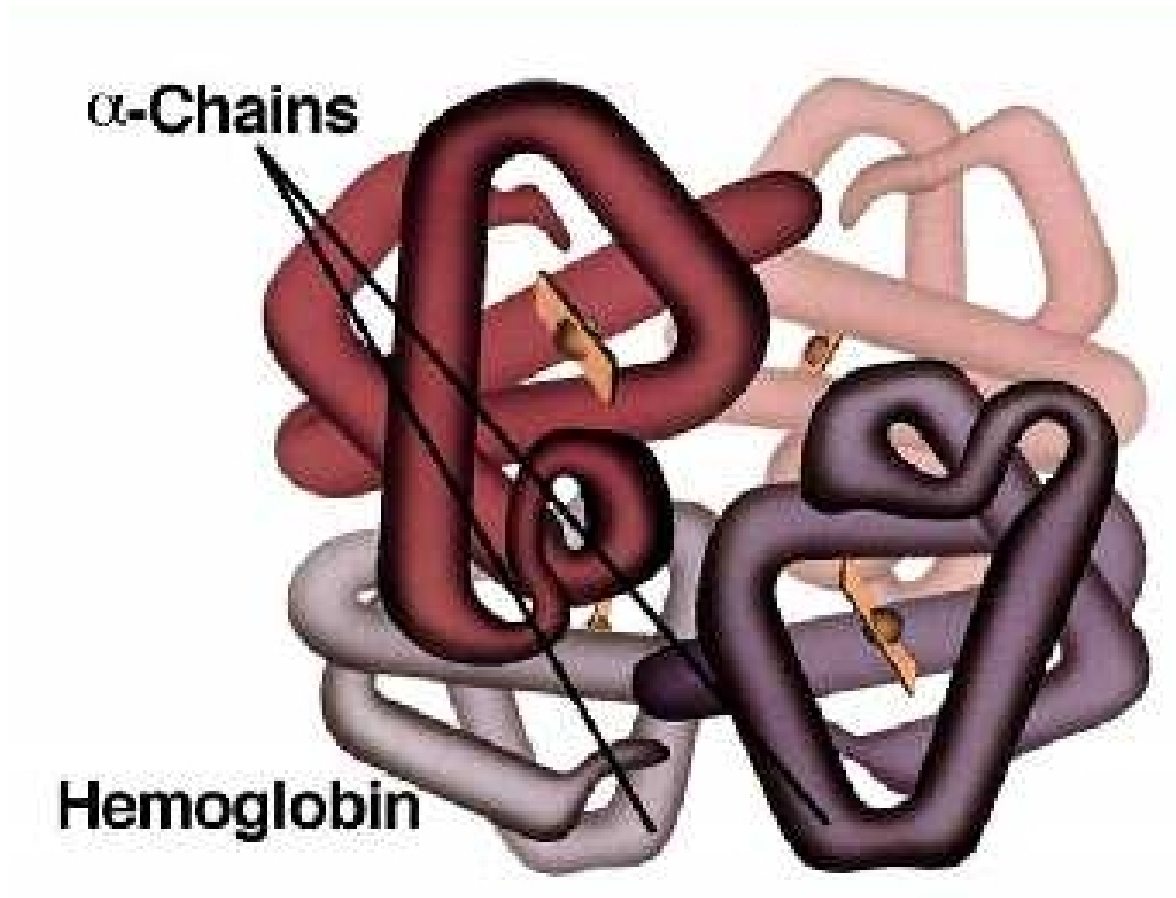
三级结构是指整条多肽链在二级结构的基础上进一步盘曲而成特定格式的三级结构。

## ■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。

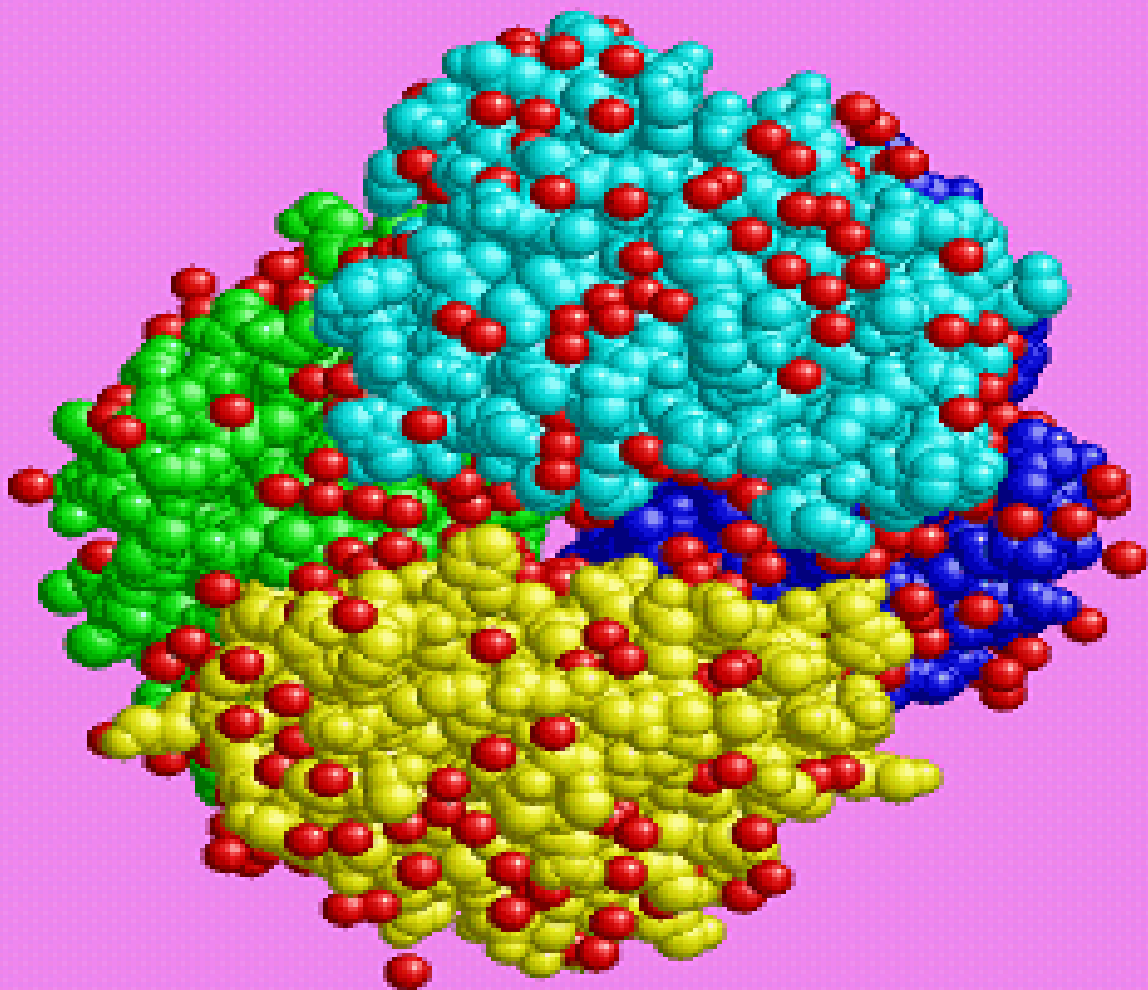


血红蛋白中四亚基两两相同，  
分别称为 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$



## 血红蛋白质的四级结构

血红蛋白分子就是由二个由**141**个氨基酸残基组成的 $\alpha$ 亚基和二个由**146**个氨基酸残基组成的 $\beta$ 亚基按特定的接触和排列组成的一个球状蛋白质分子，每个亚基中各有一个含亚铁离子的血红素辅基。





## 第二节 、蛋白质改造方法

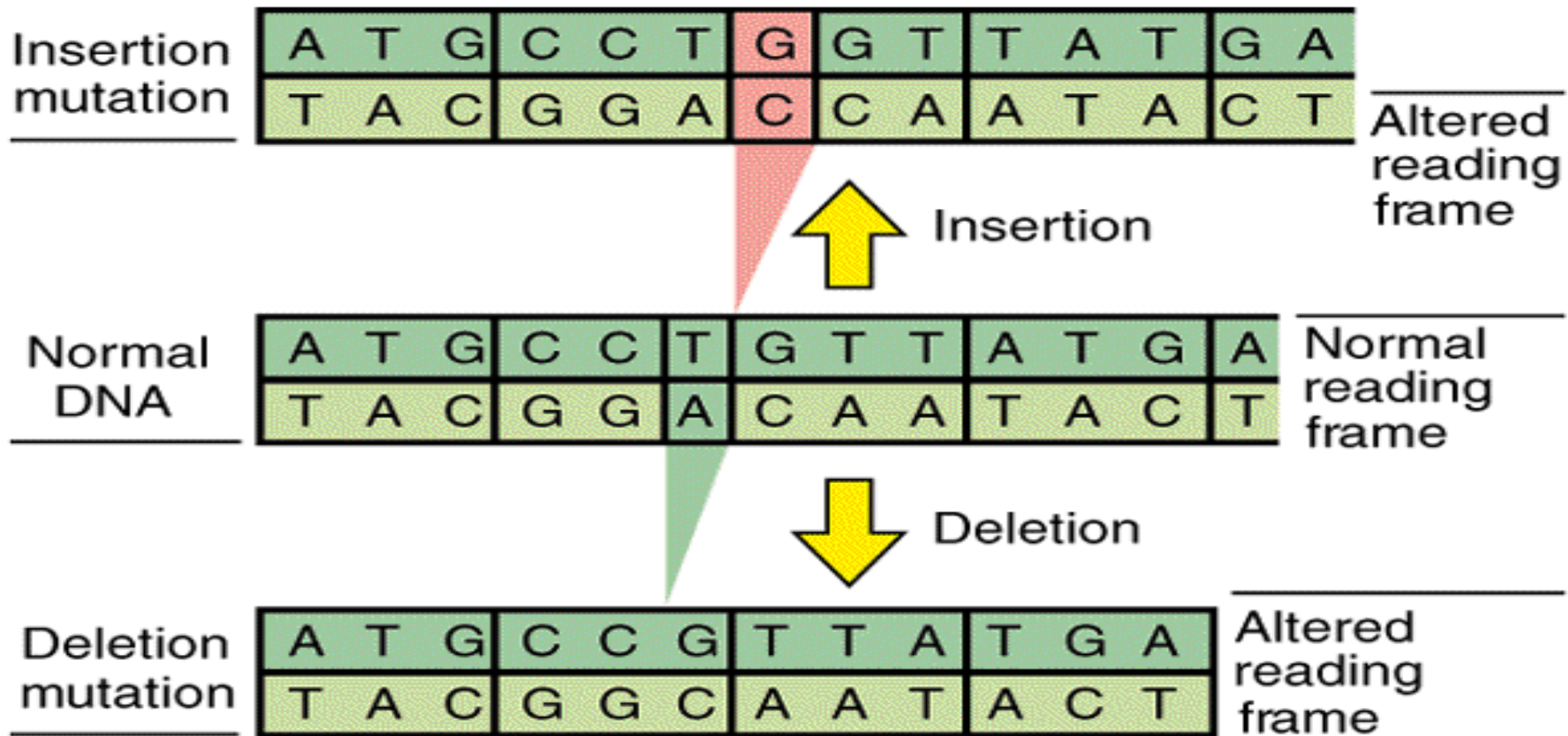
在基因水平上对蛋白质进行改造，按改造的规模和程度可以分为：

- 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 体外定点突变

- 基因定点突变是指按照设计的要求，使基因的特定序列发生插入、删除、置换和重排等变异。
- 体外定点突变技术是研究蛋白质结构和功能之间的关系的有效工具。
- 蛋白质的结构决定其功能，对某个已知基因的特定碱基进行定点改变、缺失或者插入，可以改变对应的氨基酸序列和蛋白质结构和功能，改造酶的不同活性或者动力学特性

# 碱基替代插入或缺失



## 2 体外定点突变的方法

具体方法有三种：

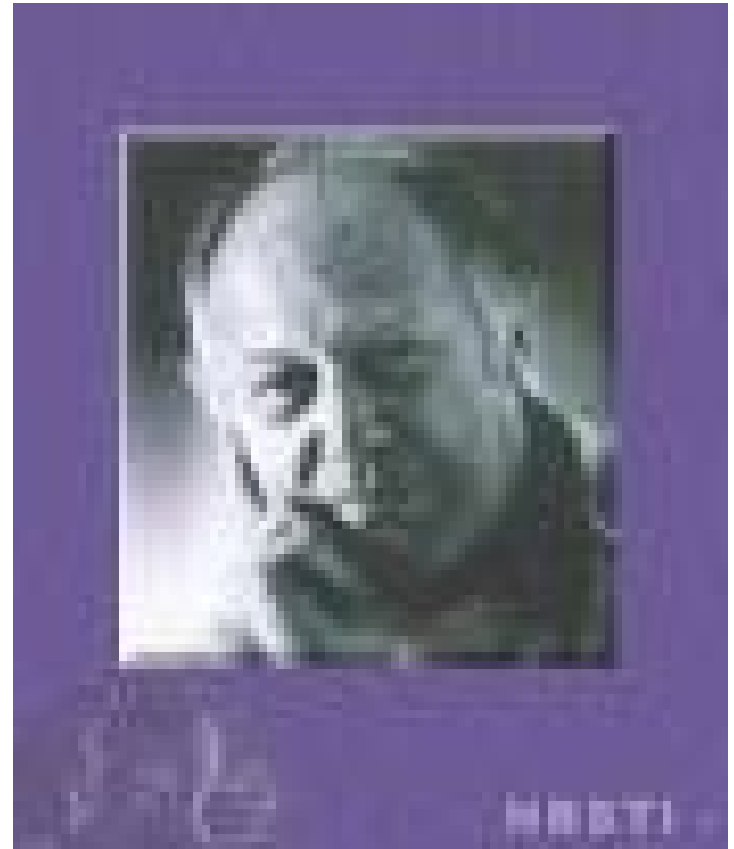
(1)寡核苷酸介导的定点突变

(2)PCR介导的定点突变

(3)盒式突变

# (1) 寡核苷酸介导的定点突变

- 寡聚核苷酸定点诱变技术是由加拿大的生物化学家（**michael smith**, 1932-）发明的。



# 寡核苷酸定点突变基本原理

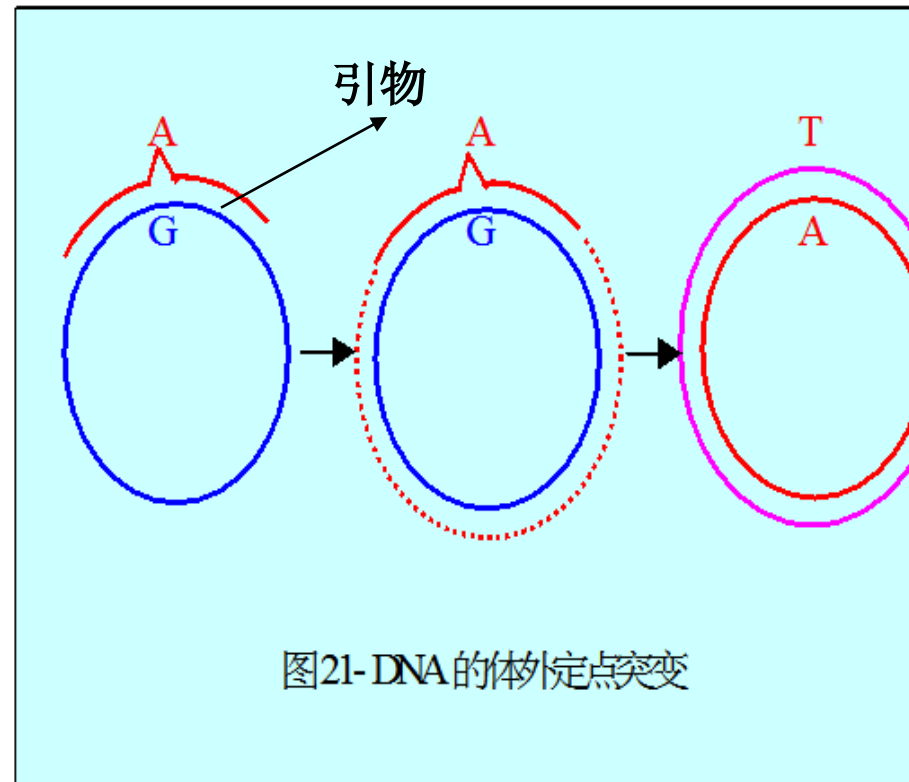
合成一段寡聚脱氧核糖核苷酸作为引物，其中含有所需要改变的碱基，使其与带有目的基因的单链 DNA 配对。

合成的寡核苷酸引物除短的错配区外，与目的基因完全互补。

然后用 DNA 聚合酶使寡核苷酸引物延伸，完成单链 DNA 的复制。

由此产生的双链 DNA，一条链为野生型亲代链，另一条为突变型子代链。

将获得的双链分子通过转导入宿主细胞，并筛选出突变体，其中基因已被定向修改。



# 寡核苷酸定点突变

- 1) 在克隆外源基因时，需要从已感染 **M 13** 的大肠杆菌细胞中获取含有 **M 13** 双链复制型 **DNA**，将外源基因插入到 **M 13** **DNA** 中；
- 2) 在定点诱变时，需从培养液中分离出 **M 13** 的重组噬菌体，并从中提取携带外源基因 **M 13** 的单链重组 **DNA**。
- 3) 再进行体外定位诱变，人工合成一段改变了碱基顺序的寡核苷酸片段（**8~18bp**），以此作为引物，在体外合成互补链，获得含有错配碱基的完整双链 **M 13** **DNA**，
- 4) 双链 **M 13** **DNA** 转染大肠杆菌，**M 13** 在大肠杆菌中扩增，形成噬菌斑。
- 理论上**一半是野生型**，**另一半则含有突变基因**。用诱变的寡核苷酸引物作为探针，通过杂交即可鉴定出突变体。

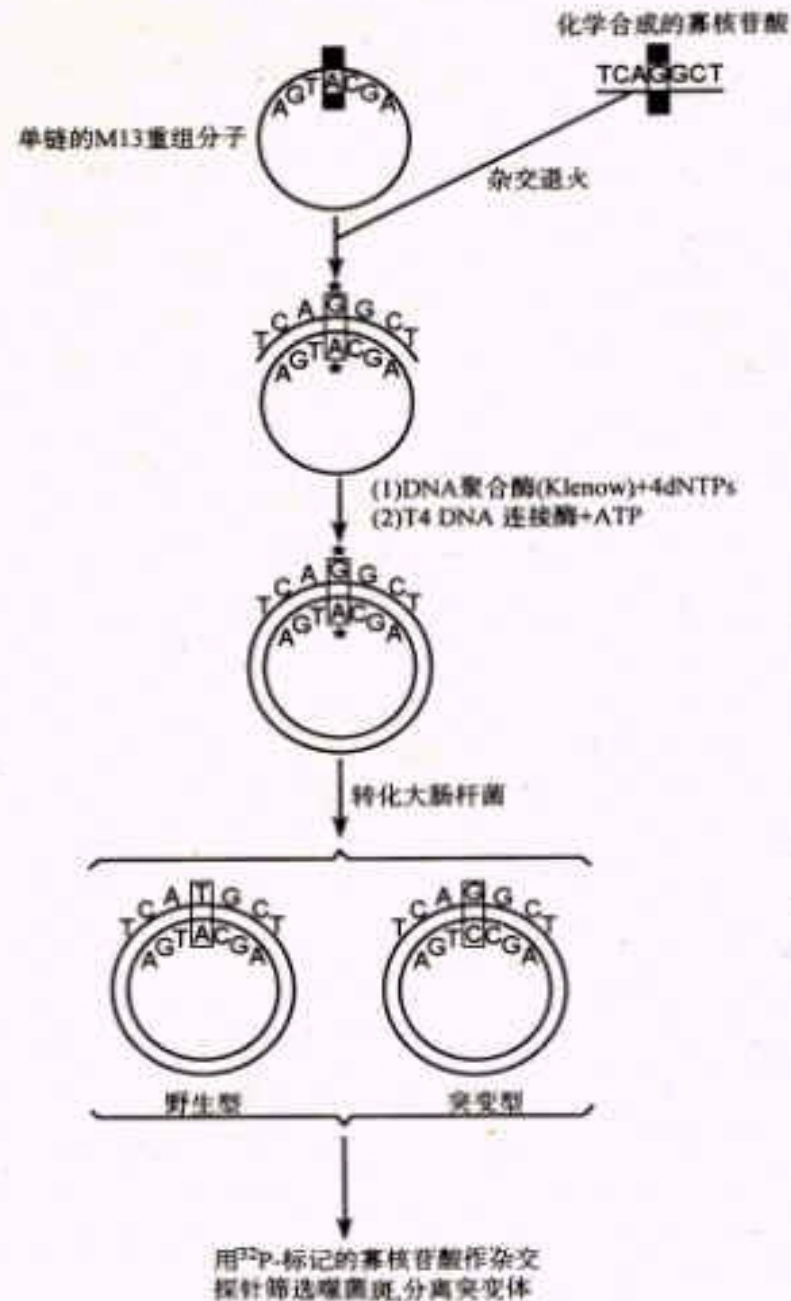


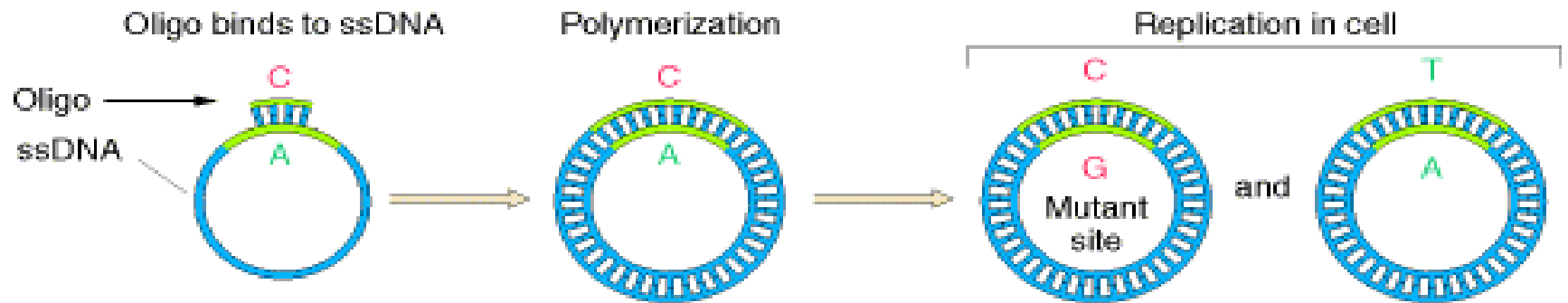
图 2-26 用合成的寡核苷酸诱发定点突变的基本过程

• 号表示错配的碱基

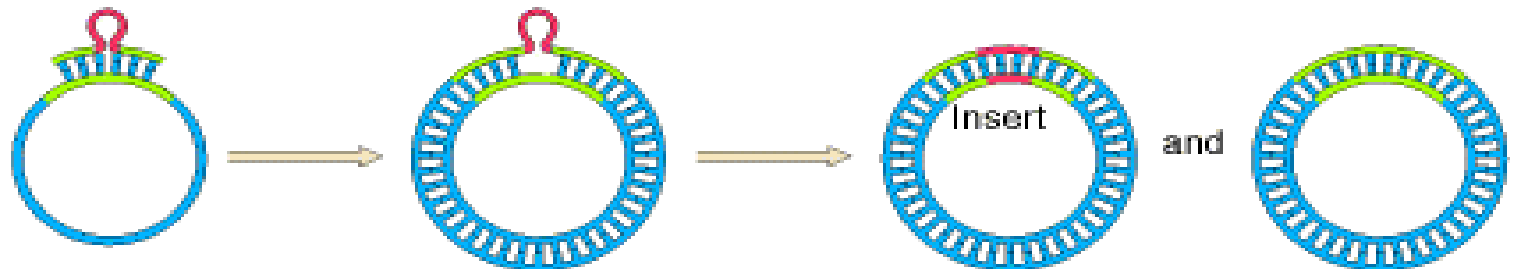
# 寡核苷酸定点突变

## (a) Oligonucleotide-directed mutagenesis

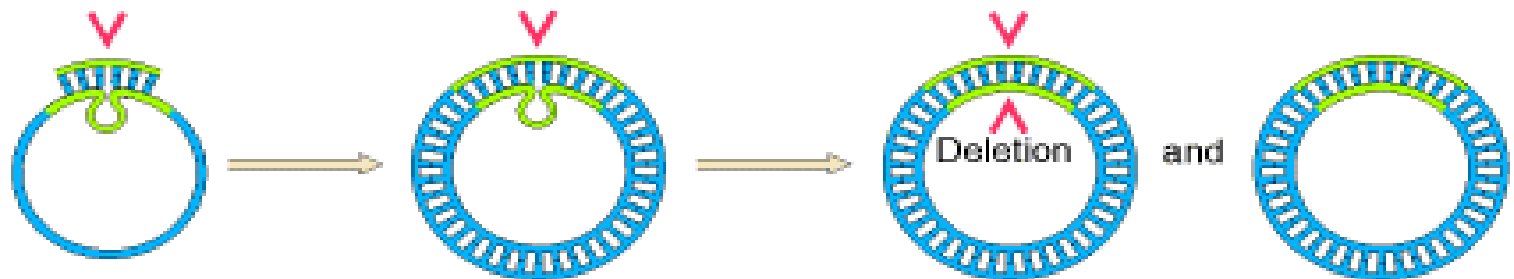
### (i) Base-pair substitution



### (ii) Insertion



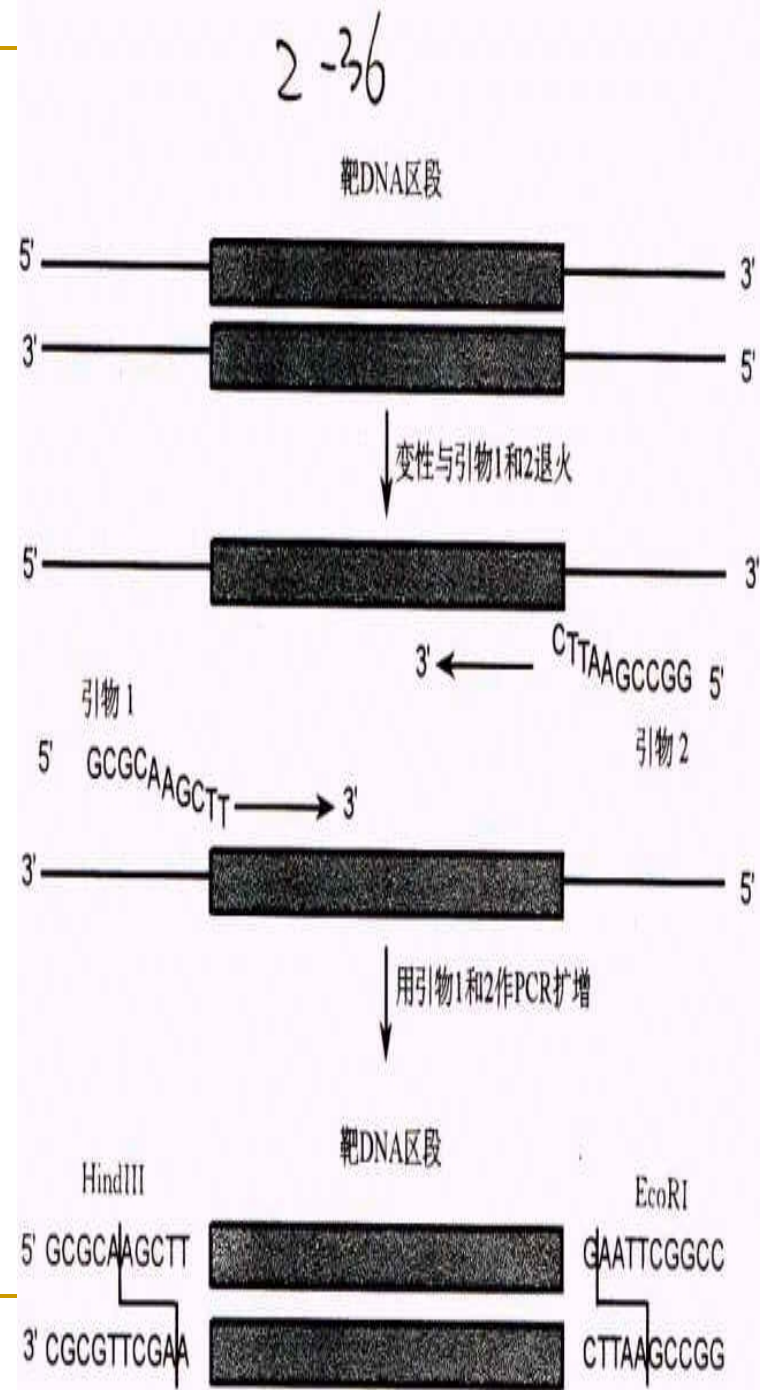
### (iii) Deletion





## (2)PCR介导的定点突变

- 在最初所建立的 **PCR** 方法中就可看出只要引物带有错配碱基，便可使 **PCR** 产物的末端引入突变。但是诱变部位并不总在 **DNA** 片段的末端，有时也希望对靶 **DNA** 的中间部分进行诱变。
- 目前采用重组 **PCR** 进行定位诱变，可以在 **DNA** 片段的任意部位产生定位突变。



# PCR介导的定点突变

需要4条PCR引物:分别是含有突变的碱基并且反向部分重叠的引物A,A',以及与目的基因两端互补的引物B,C.

任何基因,只要两端及需要变异的部位的序列已知,就可用PCR诱变去改造基因的序列。

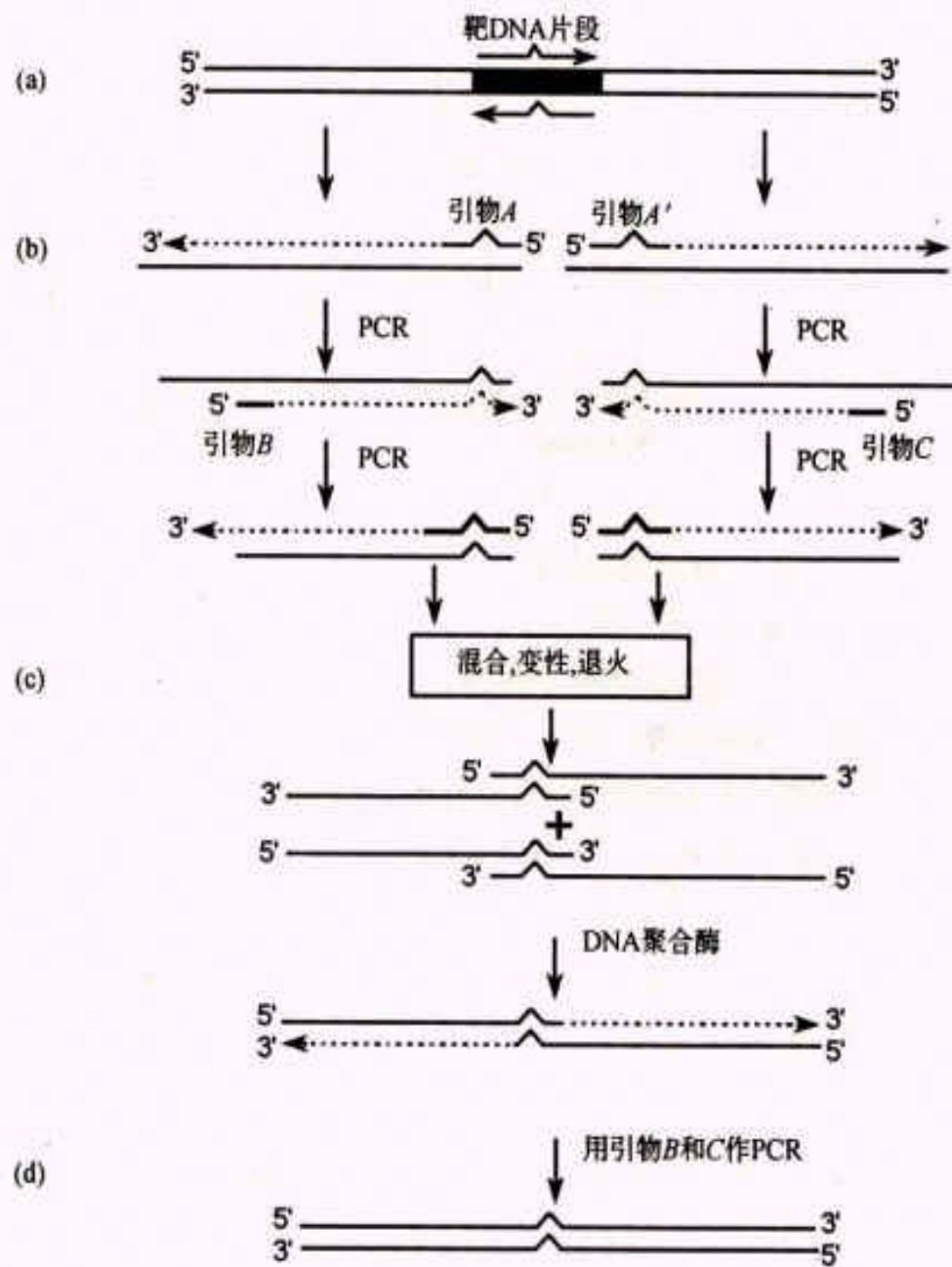


图 2-30 PCR 定点诱变

# PCR介导的定点突变

- 首先,引物A, B和A', C两两配对,分两管进行第一次PCR,产生两个部分重叠的DNA片段.
- 然后将上述两管PCR产物混合,变性再复性,在DNA聚合酶的作用下延伸产生完整的双链DNA,
- 用引物B, C,以新合成的完整双链DNA为模板进行第二次PCR,即可得到含有预期突变位点的DNA片段.

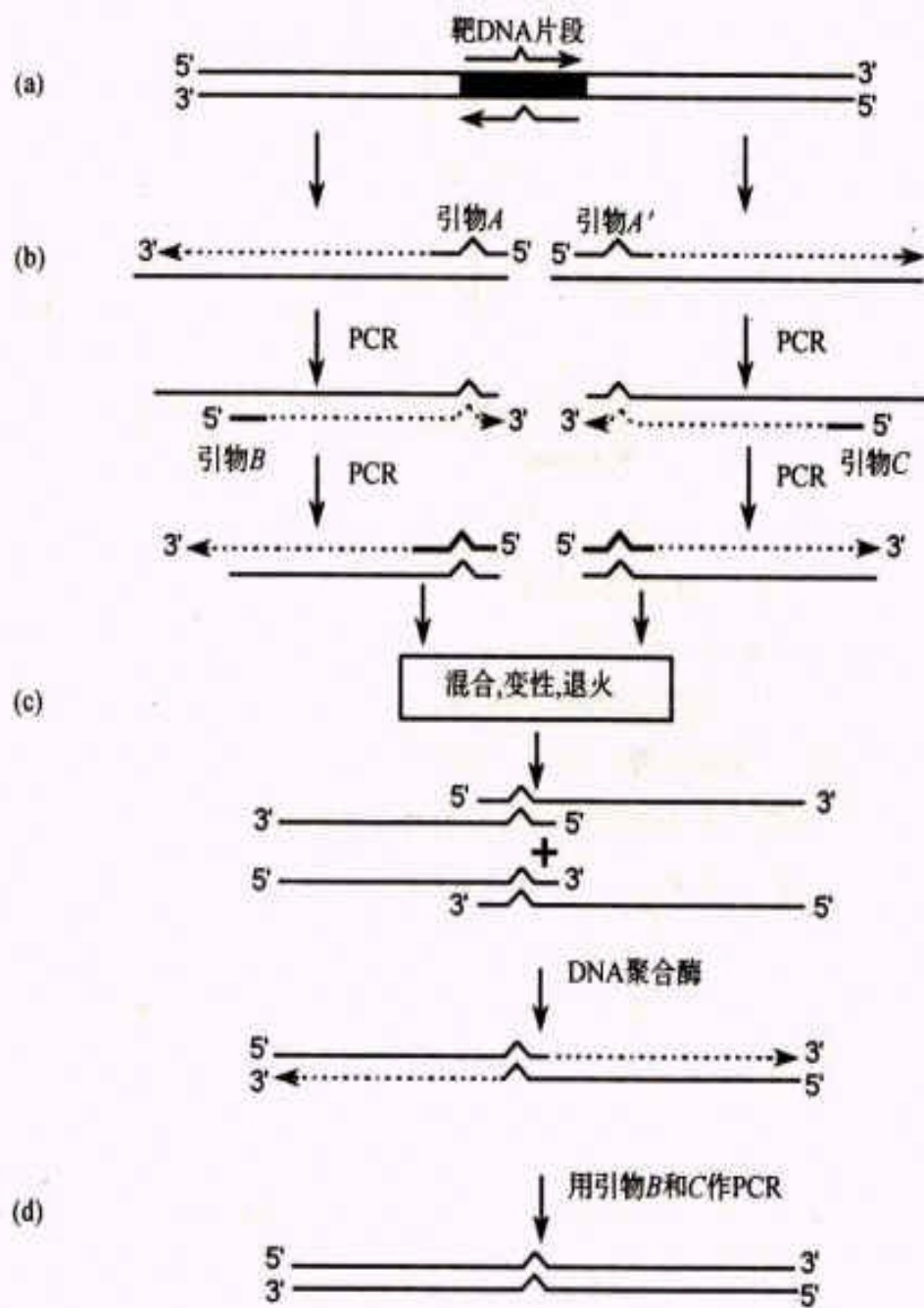


图 2-30 PCR 定点诱变

### (3) 盒式突变

(cassette mutagenesis) :

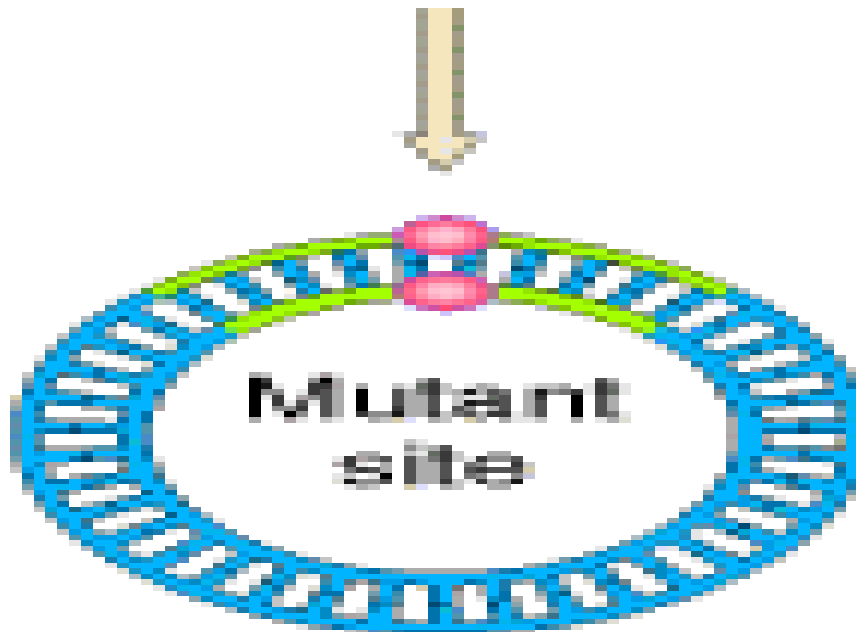
- 1985年Wells提出的一种基因修饰技术—盒式突变。
- 盒式突变：就是用一段人工合成具有突变序列的DNA片段，取代野生型基因中的相应序列,这就好像用各种不同的盒式磁带插入收录机中一样，故而称合成的片段为“盒”，这种诱变方式为盒式诱变。
- 然而，并非所有变异区附近都能找到合适的限制位点，如果不存在限制位点，就要用寡核苷酸指导的定位诱变引入限制位点。

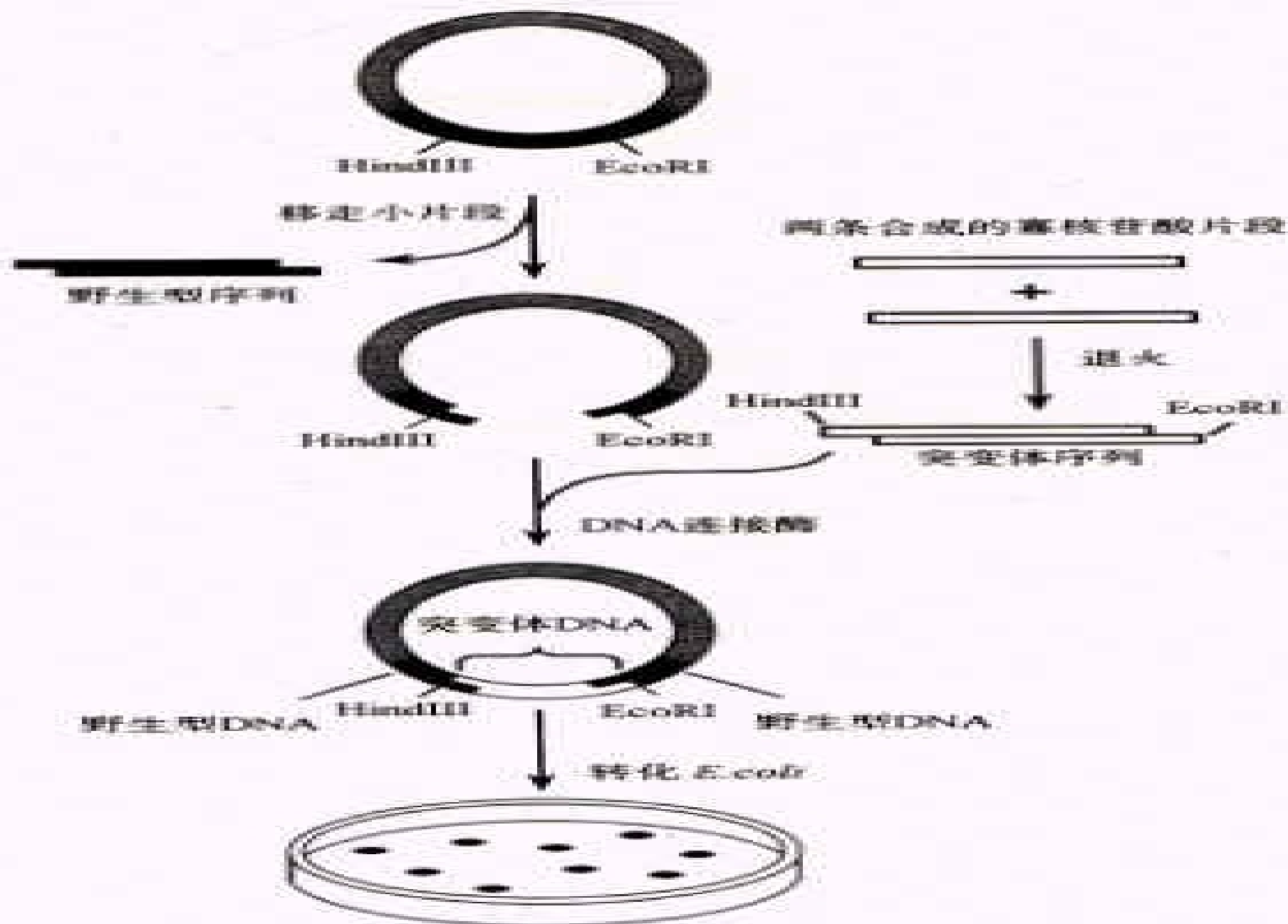
## (b) Cassette replacement

人工合成  
具有突变  
序列的  
**DNA**片段



野生型基因





所有菌落均含有突变体质粒

图 2-24 盒式取代诱变

# SOD酶化学修饰研究：

- 天然的**SOD** 稳定性较差，具有免疫原性，功能相对单一，而限制了其应用，化学修饰可以增强酶稳定性，降低免疫原性。
- 2003 年，赵数进，尹亮等用相对分子量为2000~20000的**PEG** 修饰**SOD**，发现相对分子量为6000 的**PEG** 修饰效果最
- 1986 年，袁勤生等用**高碘酸钠氧化右旋糖酐**成二醛修饰**SOD**，实验表明，修饰酶不仅完全保留了天然酶的活性，而且在耐热性、耐酸性，抗胃蛋白酶水解的能力等方面明显优于天然酶。



# SOD酶化学修饰研究:

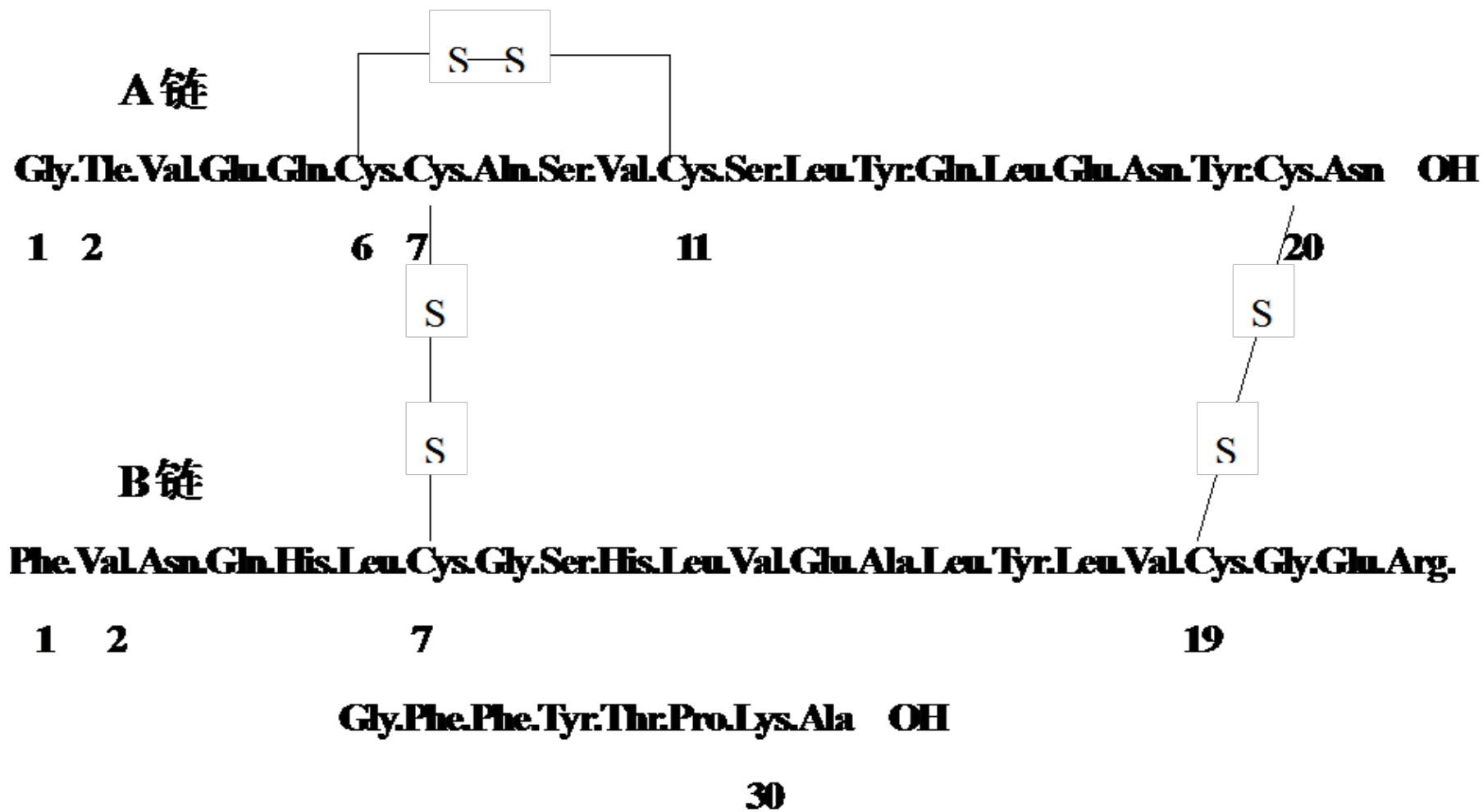
- 1994 年，阎家麟、谢文正等用被**氯化亚砷活化的月桂酸修饰**牛血Cu,Zn-SOD，其活性回收率为**93%**，修饰率为**80%**，半衰期明显延长，蛋白质的免疫原性降低，热稳定性及抗蛋水解酶的能力也明显增强。
- 1996 年，邹国林，胡萍等用膜脂成分的**硬脂酸**作为修饰剂，对**SOD** 进行化学修饰。修饰**SOD** 对温度、pH、蛋白酶水解的稳定性比天然**SOD** 增强，且免疫原性消除，在低浓度的某些有机介质中活性比在水中高。



# SOD酶化学修饰研究：

- 有关**SOD** 化学修饰开展的工作，用来作为修饰剂的分子有脂肪酸、糖、蛋白质及维生素等，但未发现用激素作为修饰剂。
- 有报道：褪黑素**MT**，化学名称为**N-乙酰-5-甲氧基色胺**，研究表明它是一种抗氧化剂，可有效清除化学反应中产生的羟自由基。
- 修饰酶**MT-SOD**，保留**SOD** 的歧化活性的同时，也具备**MT** 清除自由基的能力以及**MT**其他的生理功能。

## ➤蛋白质初级结构改造的例子



---

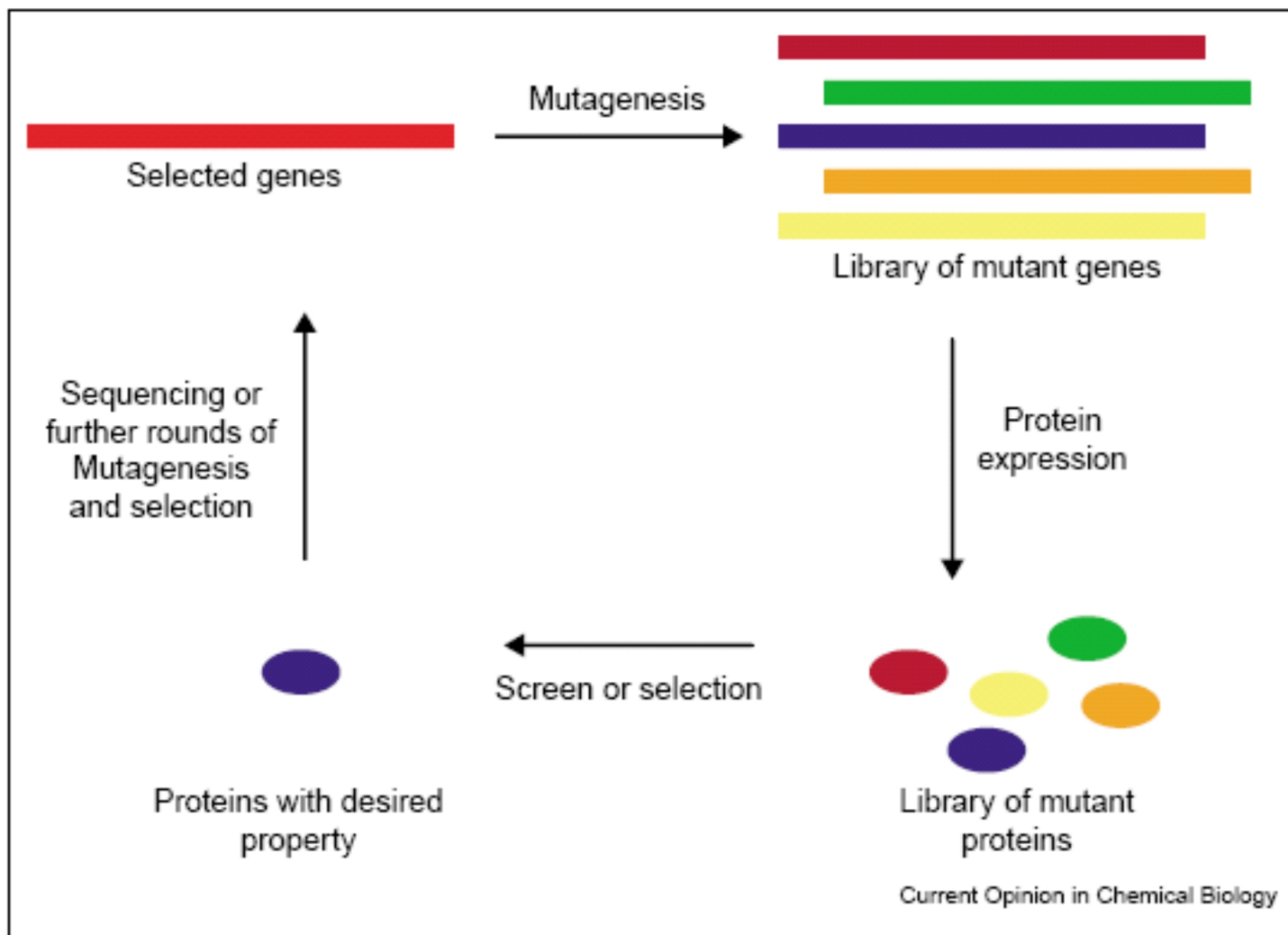
## 二 蛋白质定向进化

1993年, 美国科学家Arnold F H 首先提出酶分子的定向进化的概念, 并用于天然酶的改造或构建新的非天然酶。

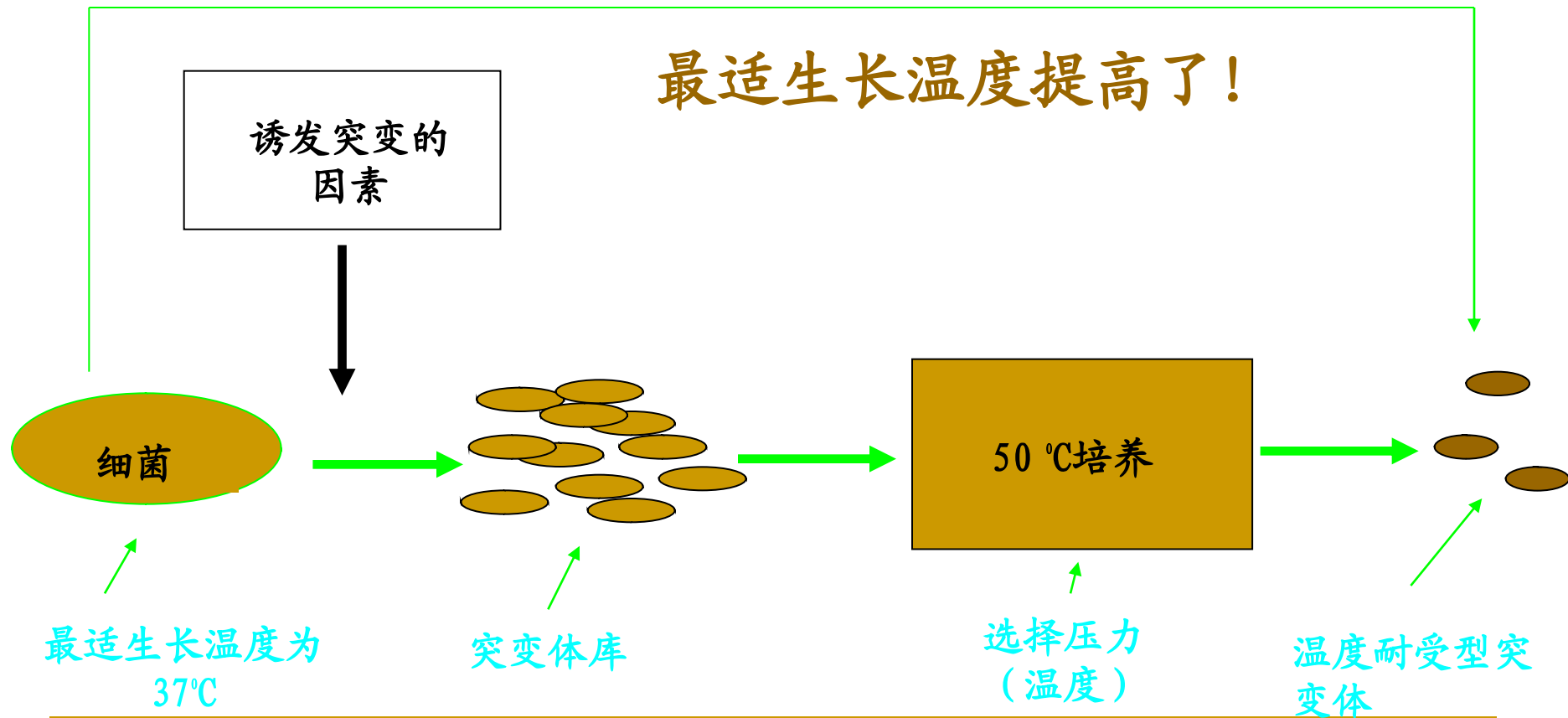
---

- **定向进化 (Directed evolution) 是近20年发展起来的一项新技术，是达尔文的进化论思想在核酸、肽或蛋白等分子水平上的延伸和应用**
- **它不需要深入了解蛋白质的结构功能关系，在实验室条件下人工模拟生物大分子自然进化过程，在体外对基因进行随机诱变，使基因发生大量变异，并定向选择出所需性质的突变体，**
- **可以在短时间内实现自然界几百万年才能完成的进化过程**

# 定向进化的原理



# 定向进化 = 随机突变 + 选择



# 定向进化不是定点突变

## ■ 定向进化：突变 筛选

突变位点是随机的，不确定的；

突变位点的数目也是不确定的；

突变的效应更是不可预知的；

理论上讲，凡是能够引起突变的因素（物理的，化学的，生物的）都可以应用于定向进化中突变体的产生。

## ■ 定点突变：

突变位点是确定的，突变的个数也是预知的；

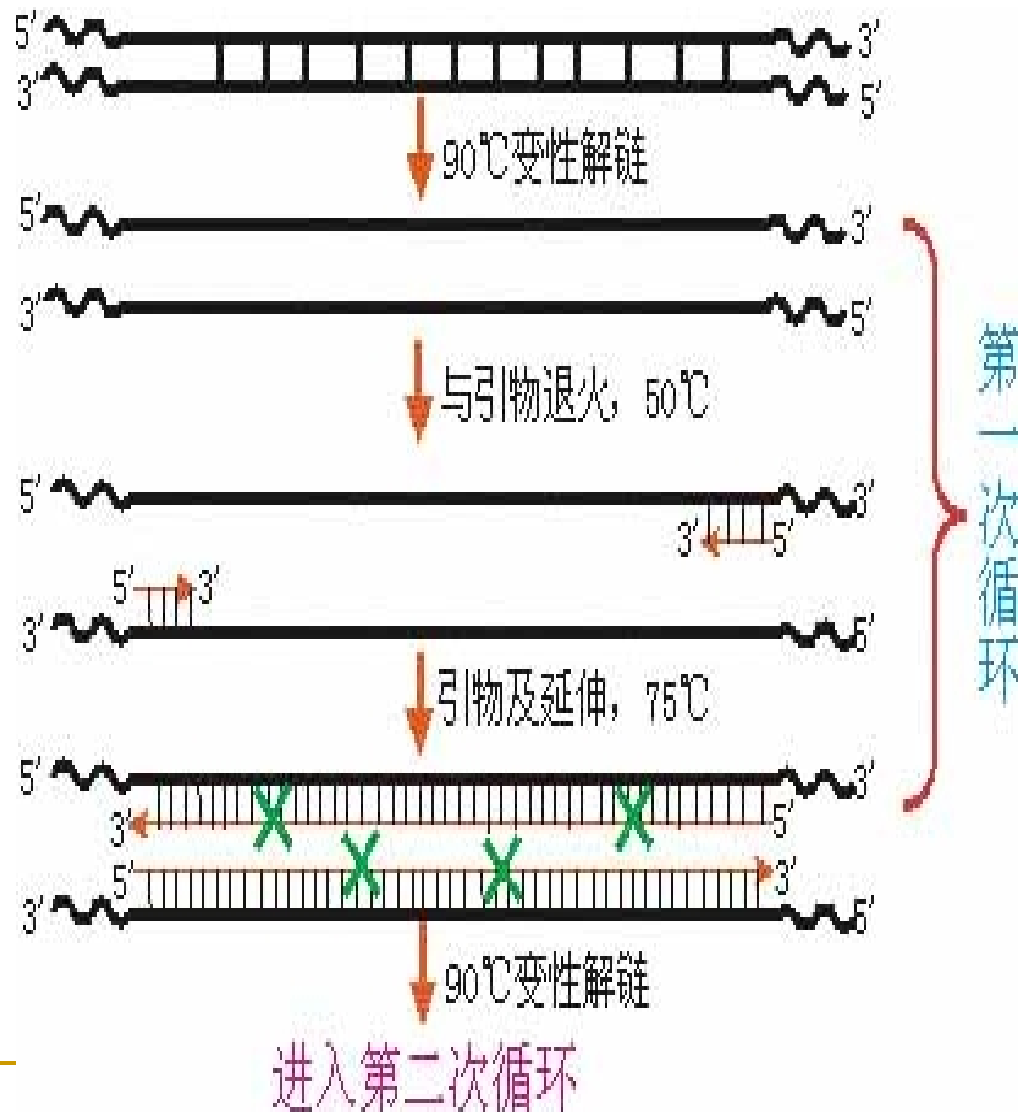
突变的效应可能是已知的，也可能是未知的；

定点突变的方法一般是以PCR技术为基础的。

# 1 易错PCR

1) 易错 PCR (error prone PCR) 是指在扩增目的基因的同时引入**碱基错配**，导致目的基因随机突变。

- 是指通过改变反应条件，如：调整反应体系的4种dNTP浓度、增加Mg离子的浓度、加入Mn离子 或使
- 用低保真度Taq聚合 酶等，
- 使碱基在一定程度上随机错配而引入多点突变，构建突变库，筛选出所需的突变体。





## 易错PCR 的关键是控制DNA的突变频率

- 如果**DNA** 的突变频率太高，产生的绝大多数酶将失去活性；
- 如果突变频率太低，野生型的背景太高，样品的多样性则较少。
- 对于每一**DNA**序列来说，合理的碱基突变数是1-3.

## 2) 连续易错PCR (sequential error prone PCR)

- 在通常情况下，经一轮的易错PCR、定向筛选，很难获得令人满意的结果，由此发展出了连续易错PCR。
- 即将一次PCR扩增得到的有用突变基因作为下一次PCR扩增的模板，连续反复地进行随机诱变。
- 使每一次获得的小突变累积而产生重要的有益突变。
- 在该方法中，遗传变化只发生在同一类分子内部，所以属于无性进化

# 例：枯草杆菌蛋白酶

- Chen等人用此策略使在非水相（二甲基甲酰胺，DMF）溶液中定向进化枯草杆菌蛋白酶的活性获得成功，所得突变体PC3在60%和85%的DMF中，**催化效率分别是野生酶的256和131倍**，比活性提高了157倍。
- 将PC3再进行两个循环的定向进化，产生的突变体13M的催化效率比PC3高3倍（在60%DMF中），**比野生酶高471倍**。

## 2 DNA改组

➤ 1) DNA改组 (DNA shuffling) 又称有性PCR (sexual PCR),

➤ 将一群密切相关的序列 (如多种同源而有差异的基因或一组突变基因文库) 在DNaseI的作用下随机酶切成小片段

➤ 这些小片段之间有部分的碱基序列重叠) 它们通过自身引导PCR (self-priming PCR) 延伸, 并重新组装成全长的基因。

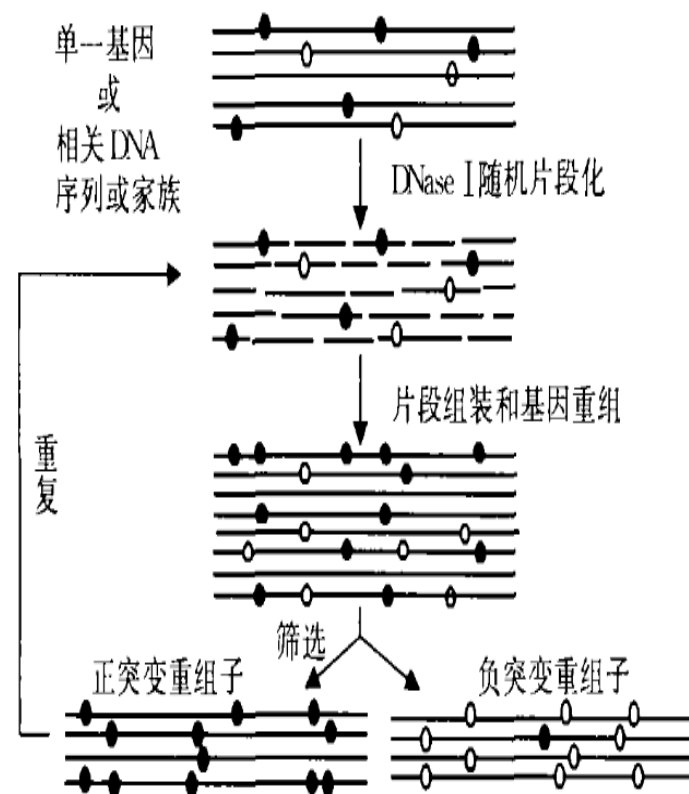


Fig.1 DNA shuffling procedure

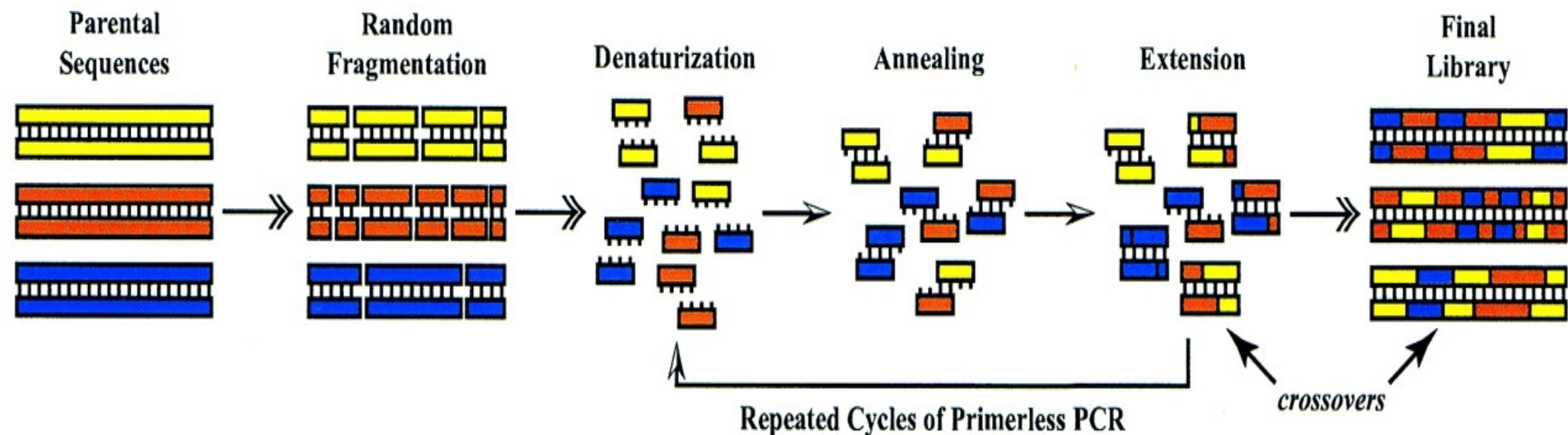
图1 DNA shuffling 原理

○:负突变表型; ●:正突变表型.

# DNA改组包括以下步骤：

- (1) 目的DNA片段的获得；
- (2) 目的基因的随机片段化，即将目的基因（可以是单个基因或一组相关基因）酶切成随机片段，这些随机片段集合包含了来自不同的同源序列的寡核苷酸，这些寡核苷酸具有不同的3'末端，从而为下一步的无引物PCR提供了条件；
- (3) 无引物PCR，即具有互补3'末端的寡核苷酸互为引物，各为模板，通过不断的PCR循环，在不同模板上随机互补结合并进一步延伸；
- (4) 有引物PCR，即以上轮无引物PCR的产物为模板，加入基因两端序列为引物，经过多轮PCR得到重排产物的集合，称为突变文库；
- (5) 克隆、筛选、分析及多轮筛选，即进一步对突变文库进行筛选，选择改良的突变体组成下一轮改组的模板，重复上述步骤进行多次重排和筛选，最终获得性状比较理想的突变体。

# DNA重组装原理图 (DNA shuffling)



1. DNaseI产生随机片段；
2. 随机片段变性；
3. 随机片段复性；
4. 延伸 反复重复2-4步后，可获得全长DNA片段

该过程所产生的相关序列间的交换归因于模板的转换，其目的是创造将亲本基因群中的突变尽可能组合的机会，导致更大的变异，最终获取最佳突变组合的蛋白质，同时也可实现目的蛋白多种特性的共进化。

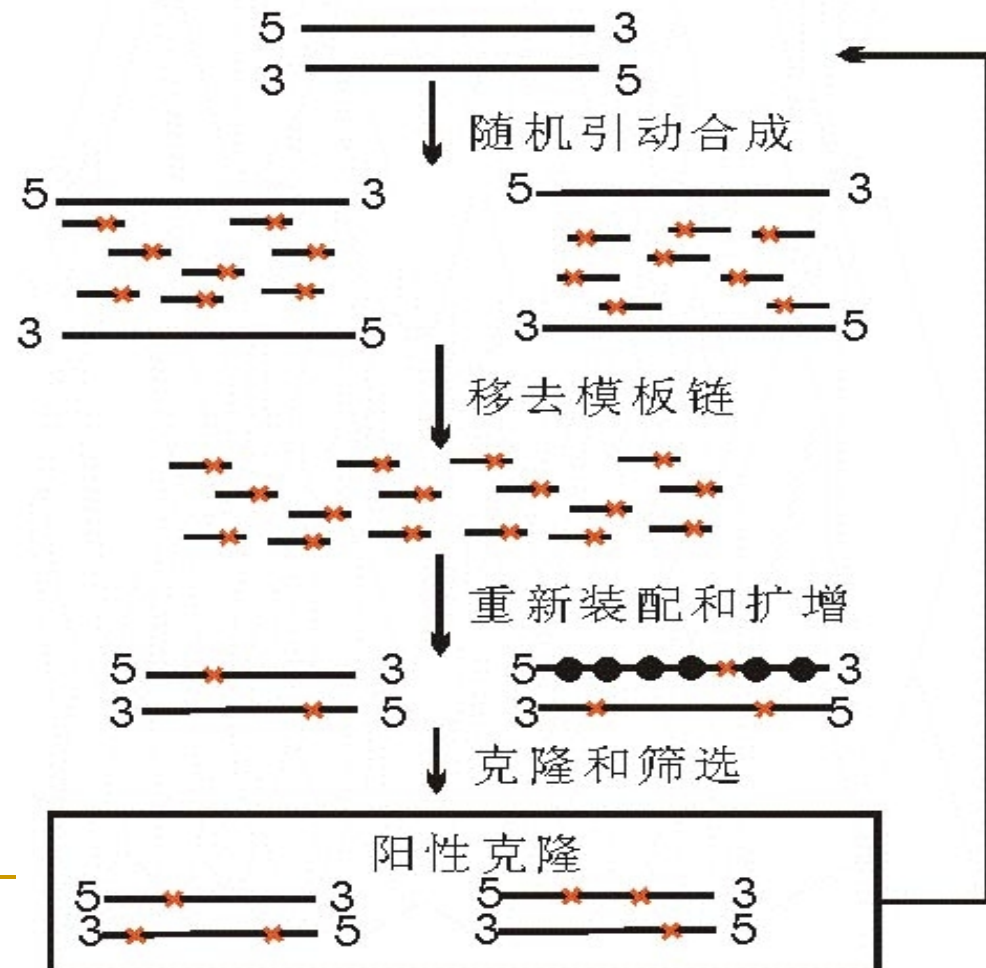
# DNA改组有以下显著优点：

- ①DNA改组可在短时间内通过重组有效的突变体发掘所有可能的重组体与突变序列，从而大大加快进化速度；而且对可操作的靶序列没有任何要求，长度可以达到几十kb；
- ②通过多轮筛选或选择，可以使有益突变迅速积累，导致功能的明显提高；
- ③DNA改组从表型上早期进行选择，而不必了解DNA片断上序列的信息，简化了操作程序；
- ④DNA改组比随机突变显著提高了良性突变的概率。研究表明，DNA改组比随机突变具有较大的优势，随机突变的方法一般产生1%的良性突变，但DNA改组可产生13%的良性突变。

# 3 体外随机引发重组

体外随机引发重组(random priming in vitro recombination, RPR)以**单链DNA**为模板，配合一套随机序列引物，先产生大量互补于模板不同位点的**短DNA片段**，由于碱基的错配和错误引发，这些短DNA片段中也会有少量的点突变，在随后的PCR反应中，它们**互为引物**进行合成，伴随组合，再组装成完整的基因长度。  
(类似于DNA shuffling)

## 体外随机引发重组原理





# 体外随机引发重组其特点在于

:

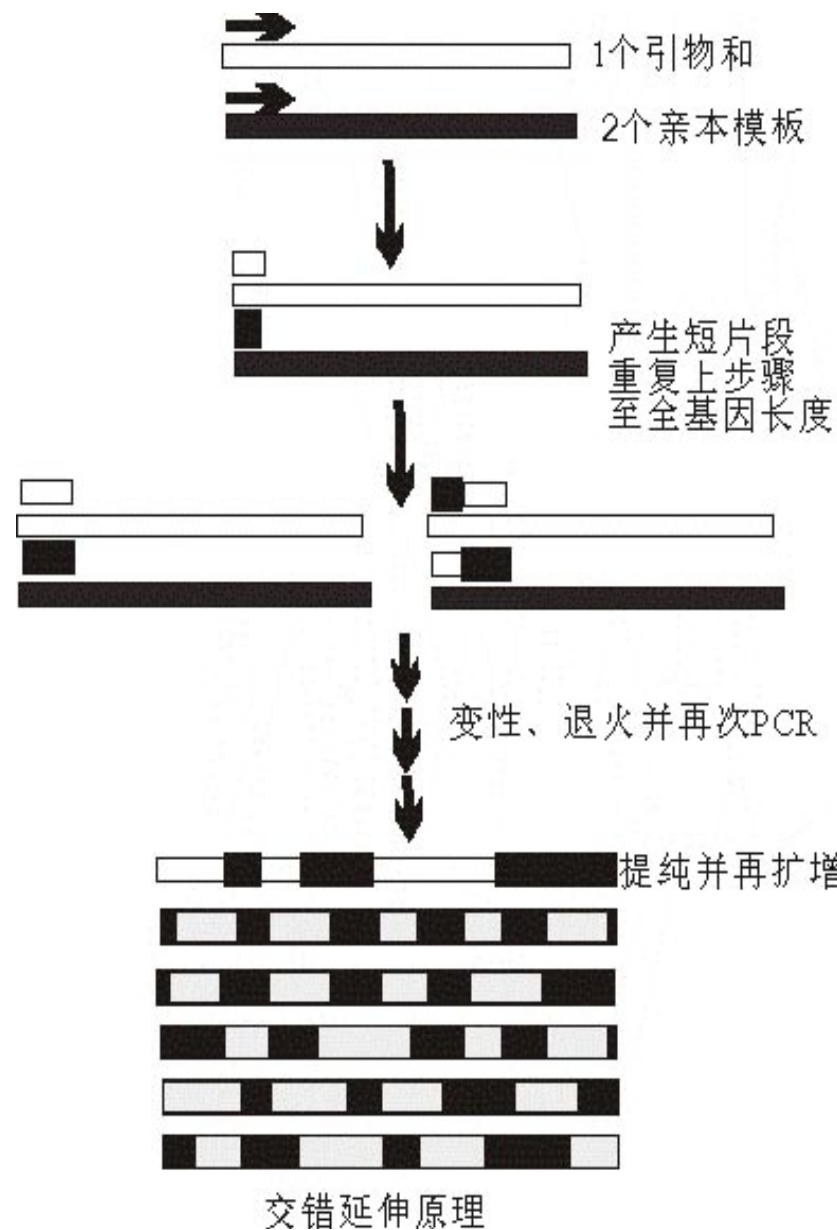
- 可以利用单链DNA或mRNA 为模板，故可10-20倍地降低亲本DNA量；
- DNA shuffling片段重新组装前必须彻底除去DNaseI, 因此该方法更简单；
- 该方法合成的随机引物具有同样长度，无顺序倾向性。在理论上，PCR扩增时模板上每个碱基都应被复制或以相似的频率发生突变或以相似的频率发生突变；
- 该方法不受DNA模板长度的限制这给小肽的改造提供了机会。

# 4 交错延伸

**交错延伸** (stagger extension process, StEP) 是一种简化的

DNA shuffling方法，它不是由短片段组装全长基因，而是在PCR反应中，把常规的退火和延伸合并为一步，缩短其反应时间，从而只能合成出非常短的新生链，经变性的新生链再作为引物与体系内同时存在的不同模板退火而继续延伸。此过程反复进行，直到产生完整的基因长度。

由于模板转换而实现不同模板间的重组，如此重复直至获得全长基因片段。



# 定向进化与自然进化的异同点

- 定向进化的实质是达尔文进化论在分子水平上的延伸和应用。
- 定向进化是在体外模拟突变、重组和选择的自然进化，使进化朝着人们需要的方向发展。
- 两者的不同：
  - 进化动力不同： 保守突变      非保守取代；
  - 进化方向不同： 适应突变的积累；
  - 进化速度不同： 非常漫长      只需几年、甚至几天；
  - 进化目标不同： 适应环境      超越生物学意义的要求，探索所希望的蛋白质在顺序空间的可及性。

## 二、蛋白质分子的高级改造（结构域的拼接）

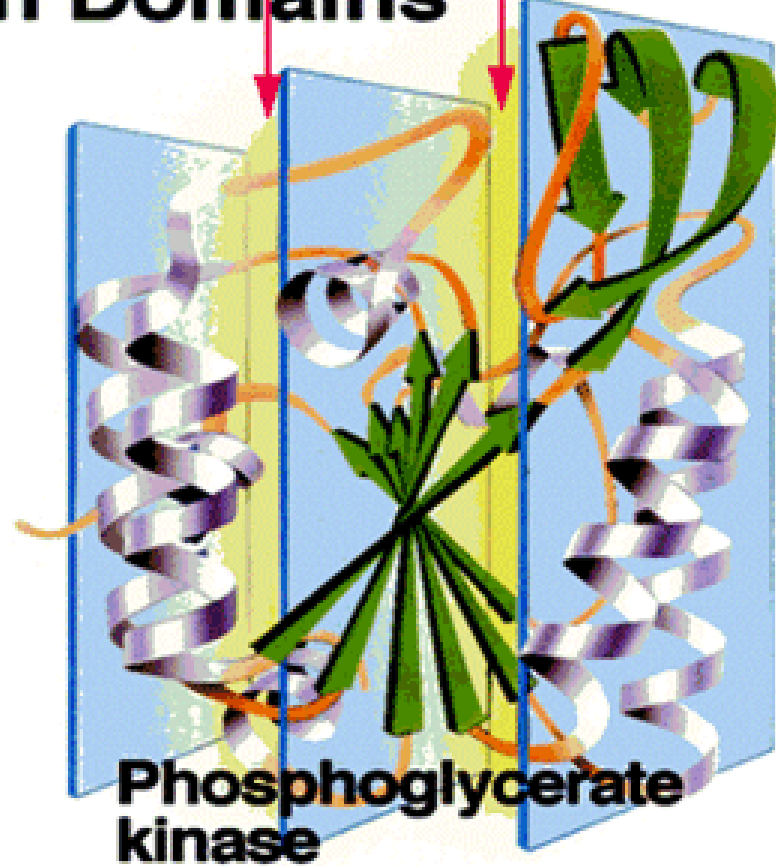
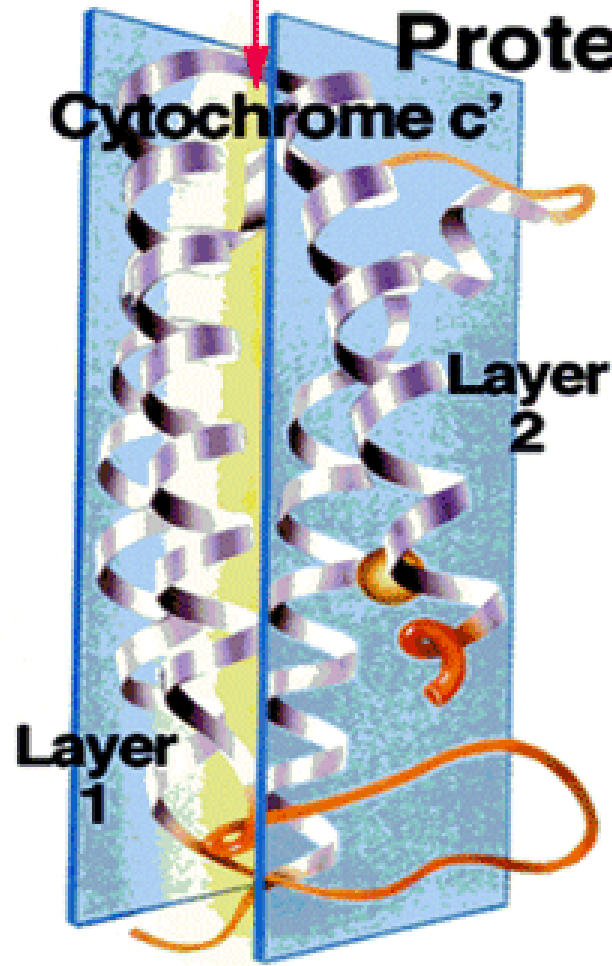
➤研究证明，在二级结构和三级结构之间还有一个结构层次，即结构域

➤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。

hydrophobic core residues

## Protein Domains



### 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。

## 第三节 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

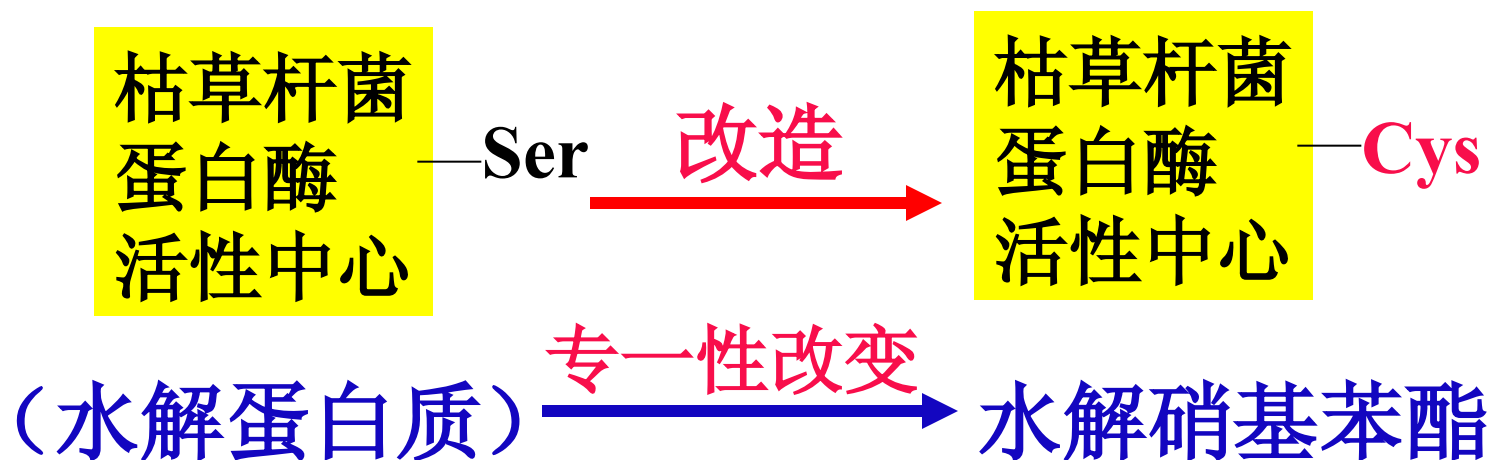
➤葡萄糖异构酶最适pH为碱性，在80℃稳定，而在碱性条件下，80℃时使高果糖浆焦化产生有害物质，反应只能在60℃进行。

➤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、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

例如：改变酶的专一性



## 六、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。