乙醇对角质酶性质的影响

王 莉[1]，　王 淼*[1,2]

（1. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；2. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122）

摘要：研究了乙醇溶液对角质酶性质的影响，同时用圆二色光谱和荧光光谱法对经过硫酸铵沉淀、镍柱亲和层析等方法获得的电泳纯角质酶进行了构象研究。结果表明，在体积分数40%、30%和20%乙醇溶液中角质酶催化反应的最适温度分别为50、55和65 ℃；在37 ℃下，酶在体积分数20%～50%乙醇中具有较好的稳定性，体积分数30%和40%乙醇对角质酶具有激活作用；角质酶在体积分数30%和50%乙醇中催化反应的最适pH分别为9.5和9.0；在体积分数30%乙醇溶液中角质酶的pH稳定范围为6.5～10.5。角质酶在50℃的乙醇溶液中的失活动力学研究表明，角质酶的失活属于一级动力学反应（R^2＞0.98）。从角质酶构象的研究结果可以看出，在乙醇体系中角质酶的二级结构和三级结构都发生了相应的变化。

关键词：角质酶；乙醇；酶学性质；构象

中图分类号：Q 814.9　**文献标识码**：A　**文章编号**：1673－1689(2012)01－033－07

Effect of Ethanol on the Property of Cutinase

WANG Li[1]，　*WANG Miao**[1,2]

(1. The School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this manuscript, effect of ethanol solutions on the biochemical property and conformation of cutinase were studied. The results showed that the optimum temperatures of cutinase were 65 ℃, 55 ℃ and 50 ℃ respectively in 20%(V/V), 30% and 40% ethanol solutions. In 20% and 50% ethanol solutions cutinase was stable at 37℃. In 30% and 50% ethanol solutions the optimum pH of cutinase were 9.5 and 9.0 respectively. In 30% ethanol solution the pH stability range of cutinase was 6.5－10.5. In 30% and 40% ethanol solutions activity of cutinase at 37 ℃was enhanced. The inactivation kinetic of cutinase was researched in ethanol solutions at 50 ℃. The results showed that the inactivation kinetic of cutinase in ethanol solutions followed the first order reaction(R^2＞0.98). And the secondary and the tertiary structure conformations greatly changed in ethanol solutiods.

Key words: cutinase, ethanol, enzymatic property, conformation

生物酶作为高效的生物催化剂，传统意义上是在水溶液中进行的，但是，目前对其在有机溶液中的催化反应已经倍受关注，酶学领域也有了一个全新的分支－非水酶学[2]。通常认为在极性溶剂中

收稿日期：2011－03－23

基金项目：国家自然科学基金项目(20776063)；国家计划863项目(2011AA100905)。

*通信作者：王淼(1962－)，女，江苏无锡人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品生物化学方面的研究。

Email：mwang@jiangnan.edu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

酶的稳定性较差,大部分非水相酶反应均被限制于相对非极性的溶剂中。一方面非极性溶剂利于提高酶的稳定性,另一方面,在非极性溶剂中酶易于保持其活性构象而表现出高的催化活力。极性有机溶剂会争夺酶分子表面的结构水,使酶失活。因此,对酶在有机溶剂中性质及稳定性的研究主要集中与非极性溶剂中[3,4]。

角质酶是一种可以降解角质并产生大量脂肪酸单体的水解酶,是 α/β 水解酶家族中相对分子质量较小的成员,其活性中心含有典型的催化三元组(Ser_{120}、His_{180}、Asp_{175}),具有酯酶和脂肪酶的功能[5]。角质酶可降解不溶性甘油三酯、可溶性酯和角质等聚酯,也能破坏角质多聚物分子的酯键使其水解为单体和小分子寡聚体[6-7]。它作为一种多功能水解酶,在食品、化工及纺织等诸多领域都具有广泛的应用[7-9]。

目前,国内关于角质酶的研究较少,国外对角质酶的研究大多集中于酶学性质、结构以及生产菌株构建、以及酶在反胶束体系中的性质及应用[10-12],虽然有研究表明角质酶在体积分数 75% 乙醇中 20 ℃下放置 18 h 活力基本不丧失[13],但并未对酶在乙醇体系中的性质进行系统研究。乙醇在工业中被广泛应用,是一种良好的有机溶剂,许多食品原料中功能性成分的提取都是用乙醇作为溶剂的,研究角质酶在乙醇中的催化性质,将有助于扩大角质酶的应用范围。

1 材料与方法

1.1 实验材料

角质酶发酵液:作者所在实验室提供;对硝基苯丁酸酯(*p*NPB)、硫磺脱氧胆酸:购自 Sigma 公司;其它试剂均为分析纯试剂。

1.2 实验仪器

ARB 120 电子天平:尤尼柯上海仪器有限公司产品;AB 204-N 电子天平:上海森信实验仪器有限公司产品;EL20 型 pH 计:梅特勒-托利多仪器有限公司产品;Backman Coulter(USA)台式冷冻离心机:上海力申科学仪器有限公司产品;V-1800 型可见分光光度计:上海美谱达仪器有限公司产品;F-7000 荧光光谱仪:日本日立公司产品;MOS-450 AF-CD 圆二色光谱仪:法国 Bio-logic 公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 *p*NPB 水解酶活力的测定 分光光度法。酶活在 20 ℃下测定,反应体积为 1 mL,其含 20 μL 酶液、50 mmol/L 对硝基苯丁酸酯和 50 mmol/L 硫磺脱氧胆酸钠 pH 为 8.0 的缓冲液 980 μL。在 405 nm 记录对硝基酚的生产速率。酶活定义:20 ℃下,每分钟催化对硝基苯丁酸酯水解 1 μmol 对硝基酚的酶量为一个酶活力单位[1,14]。

1.3.2 酶的分离与纯化 将发酵液于 4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min 去除菌体,上清液经质量分数 50% 的硫酸铵盐析,4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min,得沉淀并透析,经 0.45 nm 的滤纸微滤,然后经镍柱进行亲和层析,得纯酶制品。

1.3.3 蛋白质含量测定 福林酚法。

1.3.4 SDA-PAGE 分析 分离胶质量浓度为 12 g/dL,浓缩胶质量浓度为 2.5 g/dL,电泳采用 pH 8.3 的 Tris-HCl 缓冲体系,电泳后用考马斯亮蓝 G250 染色。

1.3.5 角质酶性质的研究 角质酶性质研究采用硫酸铵分级沉淀、透析后的粗酶液。

1) 角质酶在乙醇溶液中的最适反应温度 以 *p*NPB 为底物,用不同体积分数乙醇溶液(20%、30%、40%、50%)配制 pH 8.0、20 mmol/L 的缓冲液代替 *p*NPB 水解酶活测定方法中的缓冲液,在不同温度下(37~70 ℃)测定酶的剩余活力,以天然酶活力为 100%,确定该酶在不同体积分数乙醇溶液中的最适反应温度。

2) 角质酶在体积分数 30%和 50%乙醇溶液中的最适反应 pH 值 分别用体积分数 30%和 50%的乙醇溶液配制不同 pH 值(6.0~11.0)的缓冲液,代替 pNPB 水解酶活测定方法中的缓冲液,在其最适反应温度下测定酶的残余活力,以天然酶活力为 100%,研究酶在体积分数 30%和 50%乙醇溶液中最适作用 pH。所用的缓冲液体系是用体积分数 30%和 50%乙醇溶液配制,分别为:20 mmol/L 磷酸缓冲体系(pH 6.0~7.0);20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液体系(pH 7.5~9.0);20 mmol/L 磷酸氢二钠-NaOH 缓冲体系(pH 9.5~11.0)。

3) 角质酶在乙醇溶液中的热稳定性 为了研究该酶的在不同体积分数乙醇溶液(20%、30%、40%、50%)中的热稳定性,将酶液按一定比例分别与不同体积分数乙醇溶液配制的 pH 8.0 20 mmol/

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

L Tris-HCl 缓冲液混合在 37、45、50 和 55 ℃保温，每隔一定时间取出部分酶液，立即在冰浴中冷却，按 pNPB 水解酶活力测定方法测定残余酶活。

4）角质酶在体积分数 30%和 50%乙醇溶液中的 pH 稳定性　将酶在 37 ℃、不同 pH 值（pH6.0～11.0）的缓冲液中放置 12 h，每隔一段时间取出部分酶液，按 *p*NPB 水解酶活力测定方法测定残留酶活。缓冲液体系同 1.3.7。

5）酶在乙醇溶液中的失活动力学　将酶液按一定比例分别与体积分数 20%、30%、40%、50%乙醇溶液配制的 pH 8.0、20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液混合，在 50 ℃下放置一定时间，每隔一定时间取出部分酶液，按 *p*NPB 水解酶活力测定方法测定残余酶活。

根据 Arrhenius 方程 $\ln A=-kt$ 和 $\ln k=\ln k_0-(E_0/RT)$ 计算失活动力学参数。其中 A 是酶活，U/ml；T 是绝对温度，K；E_0 是活化能；$t_{1/2}$ 是半衰期，min；t 是保温时间，min；R 是气体常数，8.314 510 J/(K·mol)；k 是速率常数，1/min。

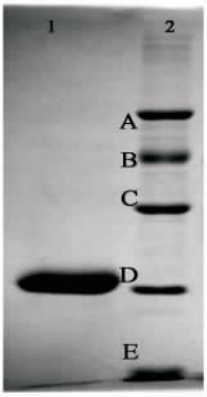
1.3.6　角质酶在醇溶液中的构象　圆二色光谱检测：将纯化后的样品溶解于 pH 8.0、20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中室温放置 30 min，立即冰浴；样品溶解于体积分数 30%、50%乙醇溶液配制的 pH 8.0、20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中，各自分别在 37 ℃、50 ℃下放置 30 min，立即冰浴。蛋白质质量浓度为 0.1 mg/mL。测定远紫外区（190～250 nm）CD 谱，扫描速度 1 nm/s，重复 5 次。圆二色谱用平均椭圆度[θ]表示，单位为度·厘米 2 分摩尔（deg·cm^2·dmol^{-1}）。

荧光光谱检测：样品处理方式同圆二色光谱检测。荧光扫描采用 F-7000 FL 型分光光度计，激发波长为 280 nm，发射波长为 290～450 nm[15-20]。

2　结果与分析

2.1　角质酶的分离纯化

将含有角质酶的发酵液通过硫酸铵分级盐析、透析、镍柱亲和层析进行分离纯化，纯化表见表 1，得到的样品通过 SDS-PAGE 凝胶电泳检测只显现出一条谱带，说明纯化的角质酶已达到电泳纯（图 1）。纯化后 *p*NPB 水解酶比活力从 19.02 U/mg 提高到 116.28 U/mg，纯化倍数为 6.12，回收率为 9.75%，以上各步的纯化结果如表 1 所示。



Lane 1：Purified cutinase；Lane 2：Molecular weight marker（A，97 400；B，66 200；C，43 000；D，31 000）

图 1　*p*NPB 水解酶的 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig. 1　SDS-PAGE of cutinase

表 1　角质酶纯化过程参数

Tab. 1　The parameters of cutinase purification

纯化过程	总酶活/U	回收率/%	总蛋白质/mg	比酶活/(U/mg)	纯化倍数
粗酶液	37 384.40	100.00	1 965.95	19.02	1.00
盐析	37 111.95	99.27	975.45	38.05	2.00
透析	36 858.64	98.59	896.06	41.13	2.16
镍柱层析	3 646.68	9.75	31.36	116.28	6.12

2.2　角质酶在乙醇溶液中的性质

2.2.1　乙醇体积分数对角质酶最适反应温度的影响　温度是影响酶催化作用的主要因素之一，一方面随着温度的升高，化学反应速度加快，另一方面高温会使酶变性失活，有机溶剂的加入也会影响酶反应的最适温度。因此，需要通过实验确定酶在有机介质中酶催化的最适温度，以提高酶催化反应速率。

在不同体积分数乙醇溶液中，角质酶的最适反应温度也不同，且不同于酶在正常情况下的最适作用温度 60 ℃[1]。由图 2 可知，体积分数 20%、30%和 40%乙醇溶液中，酶的最适反应温度分别为 65℃、55℃和 50℃，且当乙醇体积分数低于 40%时，角质酶的催化活力明显高于其在缓冲液中，该体系对角质酶具有激活作用，在体积分数 30%乙醇溶液中的酶活力最高可达缓冲液中的 2.14 倍，当乙醇体积分数达到 50%时，酶活力显著降低。有研究表明

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

上述现象可能是由于适当体积分数的乙醇改变了酶的构象,从而使酶分子更有利于与底物接触进行催化反应,当乙醇浓度过高时,它对酶构象的改变超出了酶的承受能力,使酶变性,酶活力下降甚至失活[2]。

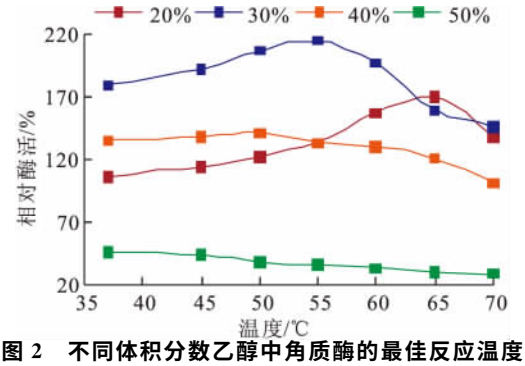
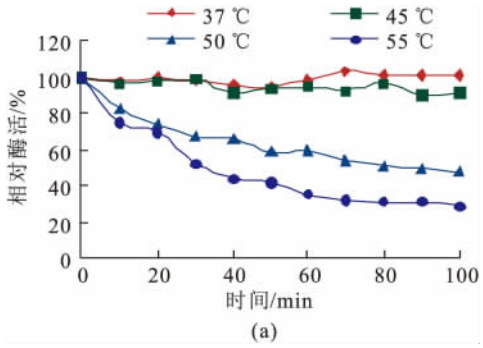


图 2 不同体积分数乙醇中角质酶的最佳反应温度

Fig. 2 Optimal temperature of cutinase in ethanol solutions

2.2.2 角质酶在乙醇溶液中的热稳定性研究 角质酶在乙醇溶液中热稳定性研究表明(见图 3)。在体积分数 20%乙醇溶液中,45℃以下酶活基本保持不变,酶相对稳定。温度高于 45℃时,随着温度的升高,酶的稳定性显著降低(图 3(a));在体积分数 30%乙醇溶液中,37 ℃时酶稳定性较好,在此条件下保温 100 min 后,残余酶活仍比在缓冲液中的原始酶活高。但在 45 ℃下酶的稳定性有所下降,且随着温度升高酶稳定性快速下降(图 3(b));当乙醇体积分数为 40%~50%时,酶只在 37℃具有较好的热稳定性(图 3(c)、(d))。这说明酶在高体积分数的乙醇溶液中,只有在低温下具有较好的稳定性。角质酶在水溶液中 40 ℃下保温 70 h,残留酶活仍在 80%以上;在 60 ℃时半衰期为 42 h。[1],与此相比在乙醇溶液中热稳定性有所下降。乙醇是与水互溶的极性溶剂,会与酶争夺水分子,甚至剥除蛋白质分子的"必需水"层,扰乱酶分子天然构象的形成[3],在乙醇存在的条件下,高温更易使酶变性,从而使酶在醇中的稳定性降低。



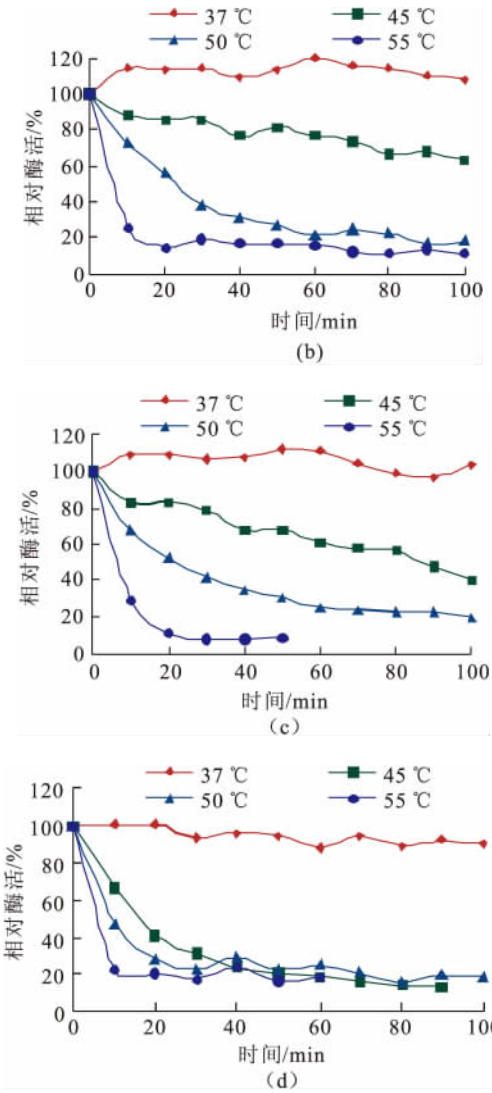


图 3 角质酶在乙醇溶液中的热稳定性(a、b、c、d 分别为角质酶在体积分数 20%、30%、40%和 50%乙醇中的热稳定性)

Fig. 3 Thermostability of cutinase in ethanol solutions a (20%), b(30%), c(40%) and d(50%)

2.2.3 角质酶在乙醇溶液中的最适 pH 值 由上述研究结果可知角质酶在体积分数 30%乙醇溶液中的催化活性最高,当乙醇体积分数大于 30%时,角质酶的催化活性下降,达到体积分数 50%时只在 37 ℃下有一定的稳定,选择研究体积分数 30%和 50%乙醇中角质酶的最适反应 pH 值具有代表性。前人研究表明,角质酶在水溶液中的最适 pH 8.0[1],乙醇对角质酶最适 pH 值的影响如图 4 所示,角质酶在乙醇溶液中的最适反应 pH 值发生了改变,在体积分数 30%、50%乙醇溶液中的最适反应 pH 值分别为 9.5 和 9.0,在体积分数 30%乙醇

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

溶液中 pH 8.0～10.0 范围内酶活变化不大，但均比在水溶液中有大幅提高，当 pH 为 9.5 时，最大活力是水中的 2.45 倍。很多研究表明酶在有机介质中催化反应的最适 pH 值通常与酶在水溶液中反应的最适 pH 值接近或相同[4,16]，这主要是针对非极性有机溶剂而言，乙醇是与水互溶的极性溶剂，它对角质酶的激活效应有待进一步探讨。

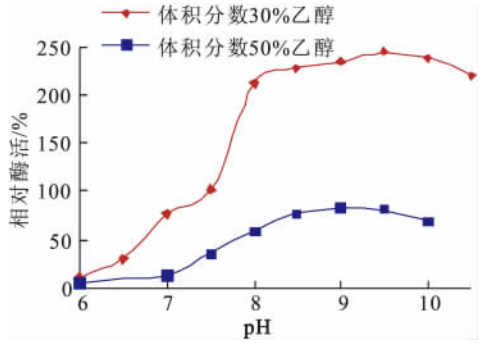
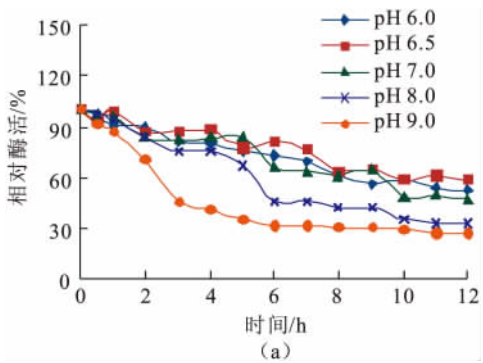


图 4　角质酶在体积分数 30%、50%乙醇中的最适反应 pH 值

Fig. 4　Optimal pH of cutinase in ethanol solutions

2.2.4　角质酶在乙醇溶液中的 pH 稳定性　由角质酶在乙醇溶液中最适反应温度和温度稳定性可知，37 ℃时角质酶在体积分数 50%以下的乙醇溶液中都具有一定的稳定性，且角质酶在体积分数 30%乙醇溶液中活性最高；从角质酶在乙醇溶液中最适反应 pH 的研究结果可知，角质酶在体积分数 50%乙醇溶液具有一定的酶活，且乙醇作为一种食品级的有机溶剂，高体积分数的乙醇在工业中被广泛应用，因此研究角质酶在体积分数 50%乙醇中的 pH 稳定性是有必要的。角质酶在乙醇中的 pH 稳定性如图 5 所示，在体积分数 50%乙醇溶液中，角质酶的 pH 稳定性较差，短时间内，在 pH 6～7 的范围内有一定稳定性，当 pH 到 9.0 时，酶的稳定性迅速下降(图 5(a))，而在 30%乙醇溶液中，角质酶较稳定，pH 稳定范围为 pH 6.5～10.5(见图 5(b))。



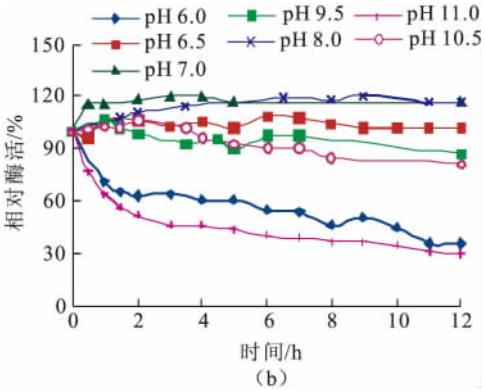


图 5　角质酶在体积分数 50%(a)、30% (b)乙醇中的 pH 稳定性

Fig. 5　pH stability of cutinase in ethanol solutions (a)(50%) and (b)(30%)

2.2.5　角质酶在乙醇溶液中的失活动力学　为了进一步探索分析不同体积分数乙醇对角质酶活力的影响，作者对 50 ℃下角质酶的失活动力学进行研究，不同乙醇体积分数下角质酶的失活动力学曲线见图 6 所示。

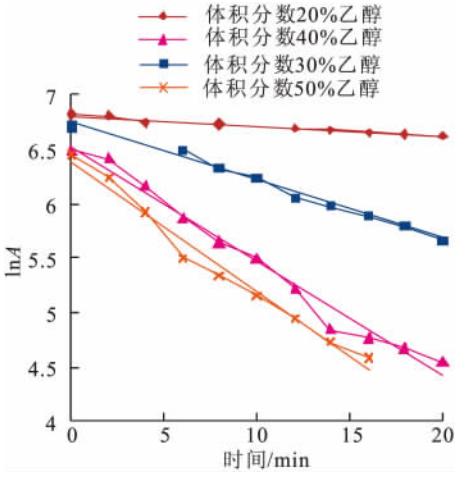


图 6　角质酶在醇溶液中的失活动力学曲线

Fig. 6　Inactivation curves of cutinase in ethanol solutions

从图 6 可以看出，角质酶的失活反应基本符合一级反应动力学的规律，利用 Arrhenius 方程可以计算出各种失活动力学参数，结果如表 2 所示。

从表 2 可以看出，随着醇体积分数的增大，酶的失活速率常数增加，失活的活化能下降。角质酶在体积分数 20%乙醇溶液中半衰期为 71.63 min，而在体积分数 50%乙醇溶液中其半衰期迅速下降到 5.23 min。这说明 50 ℃下角质酶会很快失活。酶失活的活化能 E_0 与角质酶的稳定性有关，E_0 越大角质酶越稳定，由此也可以看出随着醇体积分数

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的增大，角质酶的稳定性在下降。

表 2　角质酶在醇溶液中的失活动力学参数

Tab. 2　The inactivation kinetic parameters of cutinase in ethanol solutions

乙醇体积分数/%	失活速率常数 k	活化能 E_a(J)	半衰期 $t_{1/2}$/(min)
20	0.009 6	17 636.07	71.63
30	0.053 1	12 997.22	13.89
40	0.105 6	11 106.91	6.86
50	0.118 6	10 712.08	5.23

2.2.6　角质酶在醇溶液中的构象　上述研究表明角质酶在 37 ℃体积分数 30%的乙醇溶液中具有较高活性，且有较好的稳定性，为此，作者对角质酶的构象进行了研究。图 7 是角质酶在不同温度下、不同体积分数的乙醇溶液中放置 30 min 后测得的圆二色图谱。

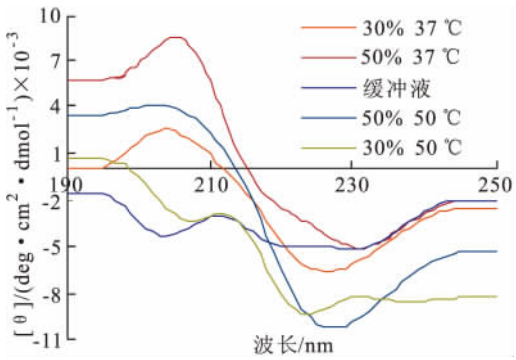


图 7　不同方式处理后角质酶的圆二色光谱

Fig. 7　Circular dichroism spectrums of cutinase incubated 30min in different ways

从图 7 可以看出，在不同体积分数的乙醇溶液中角质酶 CD 光谱有较大差别，通过 SELCON3 软件分析，得出角质酶在不同体系中 α 螺旋、β 折叠、β 转角及无规则卷曲的比例(见表 3)。从表 3 的数据可以看出，酶的相对活力与其二级结构之间没有明显的相关性。因此作者采用荧光光谱法对酶蛋白的三级结构进行进一步的研究。图 8 是不同体系中角质酶的荧光发射光谱，角质酶在 336～342 nm 处有一特征荧光发射峰，但在 50 ℃下、体积分数 50%乙醇中角质酶的荧光发射峰位红移至 342 nm，其他条件下角质酶的荧光发射峰未发生位移，只是荧光强度不同，对于活力较高的 37 ℃下 30%乙醇中的角质酶，在 336 nm 的荧光强度明显低于其他条件下角质酶的荧光强度。蛋白质在 340 nm 左右的荧光强度主要与蛋白质分子中 Trp 和 Tyr 残基的暴露和解离的程度有关[2,21]。荧光发射光谱的变化与生色基团的微环境等多方面因素相关。由此推测，角质酶在 37 ℃下 30%乙醇中三级结构发生了有利于催化活性的变化。

表 3　角质酶分子构象中各结构单元含量

Tab. 3　Secondary structural compositions of cutinase

处理方式	α 螺旋/%	β 折叠/%	β 转角/%	无规则卷曲/%
缓冲液、常温	42.37	15.27	17.39	25.08
30%乙醇、37 ℃	9.24	45.88	10.84	33.94
30%乙醇、50 ℃	55.66	3.40	19.42	20.52
50%乙醇、37 ℃	9.11	45.95	10.91	33.93
50%乙醇、50 ℃	9.32	45.79	10.72	34.17

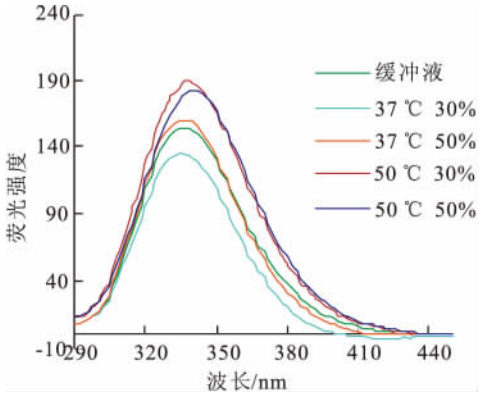


图 8　不同方式处理后角质酶的荧光发射光谱图

Fig. 8　Fluorescence intensity of cutinase incubated 30min in different ways

3　结　语

1)角质酶在低体积分数的乙醇溶液中的催化性质发生了变化。20%、30%、40%乙醇溶液中的最适温度分别为 65、55、50 ℃。热稳定性研究表明，在 37 ℃下，酶在体积分数 20%～50%乙醇中都具有较好的稳定性。

2)角质酶在体积分数 30%和 50%乙醇中催化反应的最适 pH 分别为 9.5 和 9.0。在 30%乙醇溶液中角质酶的 pH 稳定范围为 6.5～10.5；在 50%乙醇溶液中角质酶的 pH 稳定性较差。

3)角质酶在 50℃的乙醇溶液中的失活动力学研究表明，角质酶的失活属于一级动力学反应(R^2

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

>0.98）。

4）用 CD 光谱法和荧光光谱法对电泳纯的角质酶进行构象研究表明，角质酶的二级结构与其催化活性没有明显相关性，但与三级结构有很大的相关性，且角质酶在 37 ℃下 30%乙醇中三级结构可能发生了有利于催化活性的变化。

参考文献(References)：

[1] 陈晟，陈坚，吴敬. 一种嗜热细菌来源角质酶的分离纯化及酶学性质[J]. 应用与环境生物学报，2009，15(6)：846－850.
CHEN Sheng，CHEN Jian，WU Jing. Purification and characterization of cutinase from a thermophilic bacterium[J]. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**，2009，15(6)：846－850.(in Chinese)

[2] 初志战，黄卓烈，巫光宏，等. 乙醇溶液对木瓜蛋白酶催化活性的影响[J]. 热带亚热带植物学报，2005，13(14)：329－312.
CHU Zhi-zhan，HUANG Zhuo-lie，WU Guang-hong，et al. Effect of ethanol on catalytic activity of papain[J]. **Journal of Tropical and Subtropical Botny**，2005，13(14)：329－312.(in Chinese)

[3] 袁勤生 . 现代酶学[M]. 上海：华东理工大学出版社，2001.

[4] 罗贵民，曹淑桂，冯雁. 酶工程[M]. 北京：化学工业出版社，2008.

[5] Mehdi Y M，Majid E M. The role of short-range Cys171-Cys178 disulfide bond in maintaining cutinase active site integrity：A molecular dynamics simulation[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**，2009，390：201－204.

[6] Marco N，Bauke W. α/β Hydrolase fold enzymes：the family keeps growing[J]. **Current Opinion in Structural Biology**，1999，9：732－737.

[7] Maarten R E，Jacob de V. Fusarium solani pisi cutinase[J]. **Biochimie**，2000，82：1015－1021.

[8] Cristina M，Maria R，Joaquim M S. Cabral cutinase：from molecular level to bioprocess development[J]. **Biotechnology and Bioengineering**，1999，66(1)：17－34.

[9] WANG Ping，WANG Qiang. Effects of cutinase on the enzymatic shrink-resist finishing of wool fabrics[J]. **Enzyme and Microbial Technology**，2009，44：302－308.

[10] 张守亮，陈坚，华兆哲，等. Thermobifidafusca WSH 03-11 突变株合成角质酶的发酵条件[J]. 食品与生物技术学报，2006，25(5)：44－48.
ZHANG Shou-liang，CHEN Jian，HUA Zhao-zhe，et al. Optimization of fermentation conditions for cutinase production with a mutant of *Thermobifida fusca* WAH03-11[J]. **Journal of Food Science and biotechnology**，2006，25(5)：44－48.(in Chinese)

[11] Melo E P，Costa S，Cabral J，et al. Cutinse-AOT interactions in reverse micelles：the effect of 1-hexanol[J]. **Chemistry and Physics of Lipids**，2003，124：37－47.

[12] Tomas T，Allan S M，Patrick A. Unfolding and inactivation of cutinase by AOT and guanidine hydrochloride[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**，2005，1784：74－83.

[13] Chen Sheng，Su Lingqia，Billig S，et al. Biochemical characterization of the cutinase from *Thermobifida fusca*[J]. **Journal of Molecular Catalysis B：Enzymatic**，2010，63：121－127.

[14] Sheryl F，Gote J，Rajni H K. Purification of recombinant cutinase by extraction in an aqueous two-phase system facilitated by a fatty acid substrate[J]. **Biotechnology and Bioengineering**，2001，73(6)：465－475.

[15] Merz J，Schembecker G，Stephanie RM. Nimtz et al. Purification and identification of a novel cutinase from *Coprinopsisi cinerea* by adsorptive bubble separation[J]. **Separation and Purification Technology**，2009，69：57－62.

[16] 郭勇. 酶工程[M]. 北京：科学出版社，2004.

[17] 徐冬梅，刘广深，王黎明，等. 麦芽酸性磷酸酶与乙醇相互作用的谱学研究[J]. 光谱学与光谱分析，2004，24(11)：1388－1390.
XU Dong-mei，LIU Guang-shen，WANG Li-ming，et al. Spectroscopic analysis of the interaction of ethanol and acid phosphatase from wheat germ[J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**，2004，24(11)：1388－1390.(in Chinese)

[18] 陈巧，廖金花，林丽蓉，等. 乙醇对鲍鱼碱性磷酸酶活力与构象的影响[J]. 厦门大学学报：自然科学版，2005，44(4)：563－565.
CHEN Qiao，LIAO Jin-hua，LIN Li-rong，et al. Effect of ethanol on activity and conformation of alkaline phosphatase from Haliotis diversicolor[J]. **Journal of Xiamen University：Natural Science**，2005，44(4)：563－565.(in Chinese)

[19] 陈清西，严思旭. 果菠萝蛋白酶在有机溶剂微扰时的分子折叠与活力变化的研究[J]. 高等学校化学学报. 1993，14(3)：424－427.
CHEN Qing-xi，YAN Si-xu. Effect of organic solvents on the molecular folding and the enzyme activity of fruit bromelain [J]. **Chemical Journal of Chinese Universities**，1993，14(3)：424－427.(in Chinese)

[20] Brissos E P，Melo J M，Martinho G，et al. Biochemical and structural characterization of cutinase mutants in presence of the anionic surfactant AOT[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**，2008，1784：1326－1334.

[21] 陶慰孙，李惟，姜涌明. 蛋白质分子基础[M]. 北京：高等教育出版社，1995.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net