

角质酶的研究进展

李江华¹, 刘龙¹, 陈晟², 堵国成^{1,3}, 陈坚^{1,2}

1 江南大学生物工程学院, 无锡 214122

2 江南大学 食品科学技术国家重点实验室, 无锡 214122

3 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

摘要: 角质酶(EC 3.1.1.74)是一种可以降解角质并产生大量脂肪酸单体的水解酶。角质酶是一种多功能酶,可水解可溶性酯、不溶性甘油三酯和各种聚酯,同时还能催化酸与醇的酯化、脂肪酸盐与醇的转酯化反应,因此在食品工业、化工工业等诸多领域都具有广泛的应用。近年来研究发现,角质酶可实现棉纤维的生物精练和合成纤维的生物改性,是推动纺织工业清洁生产的关键酶制剂。

关键词: 角质酶, 角质, 棉纤维的生物精练

Advances in cutinase research

Jianghua Li¹, Long Liu¹, Sheng Chen², Guocheng Du^{1,3}, and Jian Chen^{1,2}

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

3 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Cutinase (EC 3.1.1.74) is a kind of hydrolase capable of catalyzing the cleavage of ester bonds of cutin to release fatty acids. Cutinase displayed hydrolytic activity not only toward cutin but also a variety of soluble synthetic esters, insoluble triglycerides and polyesters. Besides its hydrolytic activity, cutinase also showed synthetic activity and transester activity. Therefore, cutinase was evaluated as a versatile lipolytic enzyme used in food and chemical industry. Recently, it is found that cutinase has potential use in cotton bio-scouring and synthetic fibers modification. Cutinase is the most important enzyme in clean production of textile industry.

Keywords: cutinase, cutin, cotton bio-scouring

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 水解酶家族中分子量较小的成员^[1-2]。角质酶来源很广,存在于植物花粉和多种微生物中^[3]。角质酶最初由植物致病菌中分离得到,

并被证实是致病菌感染植物的重要工具^[4-6];之后,花粉中角质酶的存在被认为和花粉穿越包围柱头的角质层进行授粉有关^[7-8]。目前为止,已有大量角质酶得到鉴定。

Received: September 15, 2009; **Accepted:** November 10, 2009

Supported by: National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 20625619), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-05-0488), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2009AA02Z204), Key Technology Research and Development Program of Jiangsu Province, China (No. SBE200900022).

Corresponding author: Jian Chen. Tel: +86-510-85918309; Fax: +86-510-85918309; E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

国家杰出青年基金(No. 20625619), 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-05-0488), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2009AA02Z204), 江苏省科技支撑计划(No. SBE200900022)资助。

在棉织物染整加工中,为了使棉纤维获得优良的润湿性,需要在前处理过程中去除具有疏水性的棉纤维表皮层—角质层。角质酶具有类似于脂肪酶的催化活性,但脂肪酶必须在油水界面上才有催化活性,而角质酶不需要。此外,角质酶对以聚合形式存在的底物具有较高的酶活性,特别适合棉纤维角质层的降解。近几年还发现,角质酶可用于化纤面料的表面修饰。因此将角质酶应用于纺织工业清洁生产技术是未来发展方向。

1 角质酶的来源和性质研究

1.1 角质酶的来源

按照来源,角质酶可分为真菌角质酶、细菌角质酶和花粉角质酶,其中研究最为广泛的是真菌角质酶。真菌角质酶主要来源于 *Fusarium*^[4,9]、*Monilinia*^[10]、*Botrytis*^[11]、*Aspergillus*^[12-13]等属。细菌角质酶主要来源于 *Streptomyces*^[14]、*Pseudomonas*^[15]、*Thermobifida*^[16]等属。其中研究较多的是镰孢菌 *Fusarium solani pisi* 角质酶。

1.2 角质酶的性质研究

通过亲和色谱和离子交换色谱等各种分离纯化手段,大量角质酶得到了分离纯化,并且其生化性质也得到了具体的研究^[17]。

角质酶的分子量普遍较小,真菌角质酶的分子量一般为 22~26 kD。但是灰霉菌 *Botrytis cinerea* 角质酶和炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 角质酶的分子量偏大,分别为 40.8 kD^[11]和 40 kD^[18];而 *Monilinia fructicola* 中的 2 个角质酶的分子量偏小,分别为 18.2 kD 和 20.8 kD。细菌角质酶的分子量较真菌角质酶略大,其中假单胞 *Pseudomonas putida* 和放线菌 *T. fusca* 角质酶的分子量均为 30 kD。

真菌角质酶的最适温度较低,为 30°C~40°C,细菌角质酶的最适温度高于真菌角质酶,为 40°C~60°C。角质酶的最适 pH 偏碱性,通常为 8~10,在 pH 低于 7 时酶活性急剧下降;但苹果黑星菌 *Venturia inaequalis* 角质酶的最适 pH 偏酸性,为 5~6^[19]。

大多数角质酶可水解各种可溶性酯、不溶性甘油三酯、天然聚酯角质、合成聚酯聚对苯二甲酸乙

二酯(PET)、聚丙烯腈(PAN)、尼龙 6.6 等^[20-21]。对于大多数细菌和真菌角质酶,水解对硝基苯酯类底物时符合米氏方程,并且随着底物链长的增加, K_m 值增加。

1.3 角质酶的结构研究

在众多真菌角质酶中, *Colletotrichum gloeosporioides* 角质酶的三级结构(3dcn)和 E600 抑制剂复合体结构(3dd5)已通过 X-衍射方法得到解析^[22]; *F. solani pisi* 角质酶的三级结构(1cex)^[23]、突变体结构以及抑制剂结合体的晶体结构也已得到全面解析^[3, 24-31]。

角质酶的三级结构同源性很高, *F. solani pisi* 角质酶是由 197 个氨基酸构成的紧凑型单结构域分子,属于 α/β 水解酶(图 1)。结构中心由 5 个平行的 β 折叠组成,两边各由 2~3 个 α 螺旋包围,催化三角由 S120-H188-D175 构成^[32],活性中心位于整个结构的顶端,并暴露于溶剂中,没有盖子结构遮挡,因此没有界面活化现象^[33-34]; *F. solani pisi* 角质酶有两对二硫键。*F. solani pisi* 角质酶和共价抑制剂 n-二乙基对硝基苯磷酸酯 (E600)复合体的三级结构显示, Q121 和 S42 形成氧洞结构用以稳定中间过渡态的构象,其中 S42 通过侧链稳定氧洞构象;环状结构(氨基酸 80~87、180~188)中含有大量的疏水氨基酸(L81、G82、A85、L86、P87、L182、I183 和 V184),因此是底物结合位点的重要组成部分^[26,30],角质酶和底物的结合不需要主链构象的变化,而依靠亲脂性侧链氨基酸(L81、L182)的重新定位即能完成。

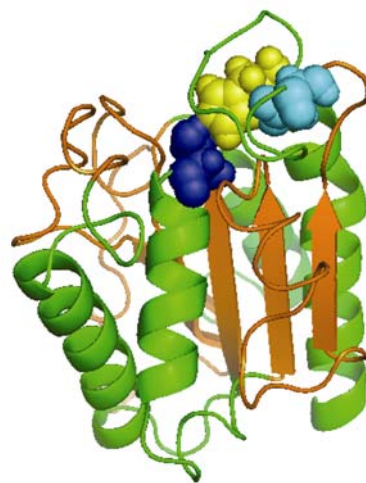


图 1 *F. solani pisi* 角质酶的三级结构图

Fig. 1 Structure of *F. solani pisi* cutinase.

2 角质酶的制备及分子改造研究

2.1 角质酶的基因及克隆表达

目前大量真菌角质酶的基因已得到鉴定, 通过序列比对发现, 真菌角质酶基因同源性较高, 基因中都存在 GXSXG 保守序列(通常为 GYSQG)^[35-36], 催化三角由 S-H-D 组成(图 2)。并且通过序列分析发现, 真菌角质酶至少含有一个蛋白激酶磷酸化位点, 通常含有两对二硫键, 构成二硫键的 4 个半胱氨酸位于 N 端和催化三角 S-H-D 附近。酪氨酸、苯丙氨

酸和色氨酸在 C 端保守, 这些氨基酸的存在和糖的结合有关^[37-38]。

F. solani Pisi 角质酶的基因已在 *Saccharomyces cerevisiae*、*Aspergillus awamari* 和 *Pichia pastoris* 等中成功表达^[39-41]。

Trichoderma harzianum 角质酶的基因也成功表达于 *Pichia pastoris* 中^[42]。

2.2 角质酶的分子改造研究

Maarten 等^[29]对经典真菌角质酶 *F. solani pisi* 角质酶进行了大量的定点突变, 以确定各

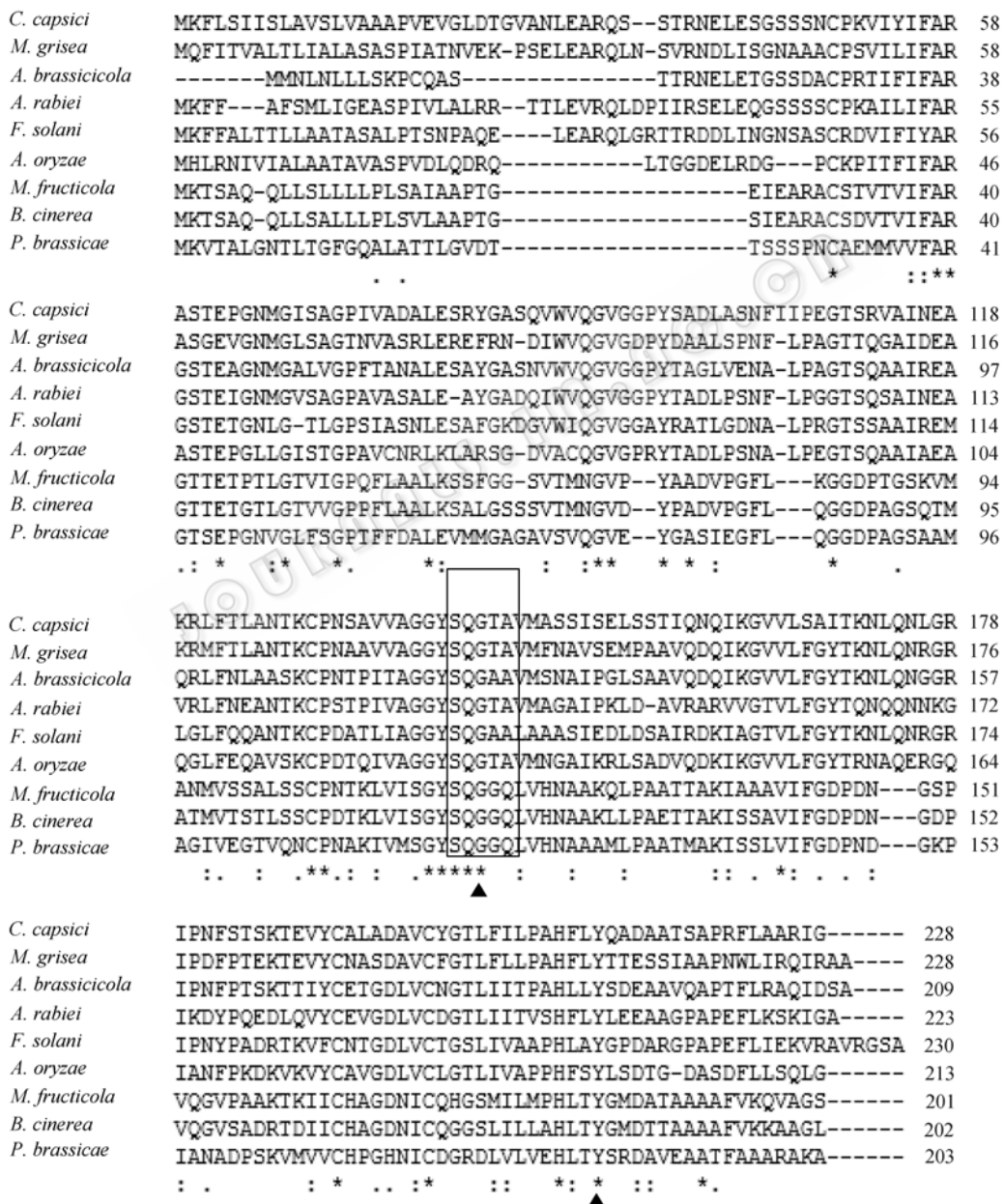


图 2 真菌角质酶序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of fungal cutinase. The GXSXG motif is boxed, ▲ is the catalytic triad.

个氨基酸残基对活性的影响(表 1)。研究表明, 角质酶的活性不仅和催化三角 S120-H188-D175 有关, 还和氧洞结构、二硫键的形成和底物结合位点有关, 对 S42 和氧洞周围氨基酸进行定点突变后, 酶活大幅度的下降^[29,43]; 二硫键的破坏也严重影响酶的构象和活力^[44]; 底物结合位点的改变极大影响酶催化效率。

在对角质酶的重要氨基酸进行分析的基础上, 研究者对 *F. solani pisi* 角质酶进行分子改造使其性质得以改善。

在底物结合位点处(40~52 位氨基酸、73~91 位氨基酸和 171~191 位氨基酸)进行改造, 将亲水性氨基酸突变为疏水性氨基酸(T179Y、L189F), 以提高对橄榄油等疏水性底物的催化活性; 底物结合位点(178~186 位氨基酸)上的氨基酸残基主要和甘油三酯 Sn-1 和 Sn-2 链发生反应, 核磁共振结果显示, Sn-1 和 Sn-2 链相对于 Sn-3 链更柔韧, 更接近于结构

表面, 而角质酶表面疏水性的增加破坏了 Sn-1 和 Sn-2 链与酶的相互作用^[45-47], 因此降低 178~186 位氨基酸残基的疏水性可增加对短链底物的活力^[25,27]; 抑制剂复合体的晶体结构显示, 甘油三酯 Sn-3 链位于 A85 附近, 体积较大的芳香族氨基酸的存在增加了酶和相邻碳链的作用, 因此可容纳更多的碳原子^[48], 因此进行 A85F 突变使底物的链长特异性发生改变, Sn-3 位 6 个碳原子的甘油三酯成为最适底物, Sn-2 和 Sn-1 位的链长特异性没有发生改变。

同时研究发现, 对结构表面带电氨基酸进行改造可增加角质酶在阴离子表面活性剂中的稳定性^[49]; 通过在基因中引入糖基化位点可使角质酶在 *Saccharomyces cerevisiae* 和 *Aspergillus awamori* 中更好地表达^[50-51]。

2.3 角质酶的生产

以 *Saccharomyces cerevisiae* 为宿主菌生产重组 *F. solani pisi* 角质酶, 结合膨胀床吸附系统进行提取

表 1 *F. solan pisi* 角质酶定点突变结果

Table 1 Site-directed mutagenesis result of *F. solan pisi* cutinase

Mutation site	Amino acid substitution	Relative enzyme activity (%)	Mutation site	Amino acid substitution	Relative enzyme activity (%)
R 17	Asn, Glu	31, 34	L 114	Y	20
T 18	V	90	S 120	A	0
T 19	V	35	D134	S	37
I 24	S	4	T 144	C	54
G 26	A	32	L 151	R	29
A 29	S	64	R 156	E, L, K	79, 71, 115
A 33	S	74	N 161	D	63
Y 38	F	62	A 164	R	41
S 42	A	0	T 167	L	54
T 45	A, K	98, 74	K 168	L	83
T 50	V	25	N 172	K	45
S 54	E, K, W	34, 96, 89	T 173	K	119
W 69	Y	12	T 179	Y	131
R 78	N, L	34, 49	L 182	W	19
A 79	G	50	I 183	F	25
T 80	D	32	A 185	L	96
D 83	S	62	L 189	F	109
N 84	A, D, L	5,0,5	G 192	Q	44
A 85	F, W	136,109	A 195	S	38
R 88	A	39	R 196	E, L, K	45, 44, 38
S 92	R	50	A 199	C	0
R 96	N	57	E 201	K	54
M 98	C	35	I 204	K	66
L 99	K	78	R 208	A	64
D 111	N	39			

是目前角质酶生产中最为高产高效的方法^[52]。Calado 等^[52]研究表明通过葡萄糖和半乳糖补料分批培养, 90 h 发酵结束酶活可达 200 U/mL, 经膨胀床吸附提取回收率为 96%。但由于酵母培养成本高、生长周期长的缺点, 至今未有 *E. solani pisi* 角质酶工业化生产的报道。

3 角质酶的应用研究

角质酶可水解可溶性酯、不溶性甘油三酯和各种聚酯, 除了水解反应外, 角质酶还能催化酸与醇的酯化、一些脂肪酸盐与醇的转酯化反应, 因此角质酶作为一种多功能酶, 具有诸多的应用领域。

目前研究较多的角质酶的应用领域主要是棉纤维的生物精练。棉纤维在横截面上, 一般分为 3 层(图 3): 1) 表皮层, 含有蜡质、角质、胶质与脂肪等成分, 主要是一层薄膜, 厚度在 0.1 μm 左右, 紧紧覆盖在纤维上; 2) 初生层, 为细胞的原始胞膜, 亦称原始皮层, 它包裹着细胞核; 3) 次生层, 它占棉纤维重量的绝大部分, 主要由纤维素构成^[53]。其中表皮层中的角质层是生长过程中表面油状物质硬化形成的, 可保护棉花免受雨水侵蚀, 由于其具有极强的疏水性导致未处理的棉纤维手感和染色性能较差, 从而成为棉纤维精练加工过程中需要去除的主要成分之一。

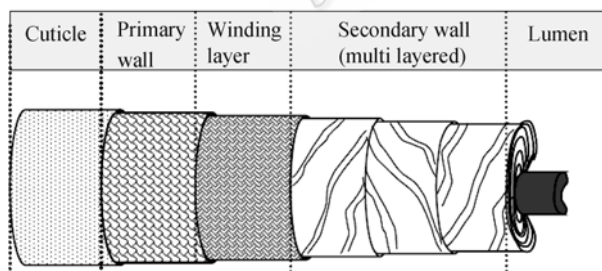


图 3 成熟棉纤维的结构示意图
Fig. 3 Schematic of mature cotton fiber.

角质酶具有脂肪酶的催化活性, 和脂肪酶不同的是, 角质酶催化的酯水解可以在均相体系中进行。而且对于以聚合物形式存在的酯类化合物, 角质酶的水解能力更强。因此将角质酶用于棉纤维生物精练, 可以在低温的条件下去除棉纤维表面蜡质和角质。而且研究还发现角质酶能加快棉纤维中果

胶的酶解速度, 有助于果胶等杂质的进一步去除, 从而达到精练目的^[54]。

近年来研究表明, 角质酶还可用于聚对苯二甲酸乙二酯(PET)、尼龙 6.6 和聚丙烯腈(PAN)等合成纤维的表面改性, 增加织物吸水性, 改善手感, 提高织物品质^[20-21]。上述两工艺目前均采用传统碱处理工艺, 存在水耗、能耗大、排放废水碱性强、色度深、COD 值高以及对纤维损伤大等弊病。酶精练工艺作为一种节能降耗、环境友好的纺织品清洁生产技术, 已成为国内外染整行业发展的新趋势。

除了在纺织工业的应用外, 角质酶还在食品工业^[55]、农业^[56]、洗涤剂工业^[57]和生物催化^[58-59]等领域中具有广泛的用途。

4 国内研究现状

江南大学自 2001 年承担“863”项目“用于纺织工业清洁生产的生物催化剂的研究”后, 对角质酶产生菌的筛选、发酵条件优化、酶的分离纯化及性质、工程菌的构建与表达、酶分子的改造和酶在棉精练中应用等方面进行了较系统的研究。

4.1 角质酶产生菌的筛选及发酵条件的优化

从堆肥中以对硝基苯丁酸酯(角质酶的模式底物)为筛选底物, 筛选得到一株产角质酶的微生物, 鉴定为嗜热单孢菌(*T. fusca*); 研究了嗜热单孢菌的生理特性和生产角质酶的适宜培养条件, 确定了角质酶高产菌发酵条件, 角质酶酶活达到 19.8 U/mL^[60-64]。

4.2 天然酶的分离纯化和性质

通过检测 pNPB 水解酶活性, 嗜热单孢菌(*T. fusca*)发酵上清液通过硫酸沉淀、疏水色谱、阴离子交换色谱进行分离纯化, 得到电泳纯的天然角质酶, 对该酶制品进行以角质为底物的角质酶的测定结果表明其具有角质水解能力; 嗜热单孢菌角质酶具有较好的热稳定性和酸碱稳定性, 最适反应温度为 60°C, 最适反应 pH 为 8, 符合纺织工业清洁生产用角质酶所需特性^[65]。

4.3 基因工程菌的构建与初步表达

因生物数据库中已有 *T. fusca* 全基因组序列, 采用蛋白质组学技术中的肽指纹图谱技术破译角质酶编码基因。用胰酶水解电泳纯的天然酶条带, 质谱

分析水解产物,将得到的小肽分子量进行数据库查询,鉴定其组成的蛋白及编码基因。由于角质酶为胞外酶,进行了N-末端10个氨基酸测序,确定了蛋白质一级结构中的信号肽和成熟酶序列。将编码角质酶的基因克隆到载体pMD18-T中,基因测序;选择具有pelB信号肽和6×组氨酸标签(His-tag)的大肠杆菌分泌型表达载体pET20b(+)作为表达载体,将角质酶基因亚克隆到该载体,并表达于大肠杆菌BL21(DE3)中。对工程菌的摇瓶发酵过程研究发现,在发酵初期角质酶大量积累于胞内,随着发酵时间的增加,角质酶被最终分泌到胞外。初步试验表明工程菌的产酶量至少是*T. fusca*产酶量的10倍^[65-66]。

4.4 角质酶在棉精练中的应用

应用角质酶和果胶酶复配进行棉精练试验表明,该酶使织物的润湿性和白度均有所改善,且酶对棉表面角质层和初生胞壁中角质、蜡质具有相对温和的“选择性刻蚀”作用,而碱精练对纤维表面杂质具有一种“无明显选择性剥皮”作用(图4),严重影响纤维强度。和未煮练棉布相比,角质酶处理后的棉布吸水性能提高了60%,角质酶和果胶酶协同作用棉布吸水性能提高了74%,与碱煮练效果相似。角质酶煮练可以提高棉纤维着色效果,并且棉布手感柔软。酶煮练后废液pH较低,对环境不会造成严重污染^[67-70]。

角质酶处理能够去除棉籽壳中的大部分脂肪类物质、部分果胶质和纤维素等物质。在降解棉籽壳

时,角质酶与碱性木聚糖酶和碱性果胶酶具有协同作用,经角质酶处理后棉籽壳吸附碱性木聚糖酶的能力提高了1.28倍。角质酶对棉籽壳的降解具有重要作用^[71]。

5 展望

节能减排是当前国家宏观经济调控的重点,纺织工业作为我国工业系统中重点污染源之一,已成为关注的焦点。利用生物酶的高度专一性、高效性和处理条件的温和性,开发高效、环保、安全和符合生态纺织品生产要求的精练酶工艺取代传统碱工艺,已成为国内外染整行业发展的新趋势,是纺织工业完成国家“十一五”节能减排指标的关键环节之一。角质酶是染整工业清洁生产精练工艺的关键酶,它们的研究开发可促进纺织精练工艺的节能、降耗、减排,进而推动染整工业全酶工艺的推广以及生态纺织业的发展。但是目前角质酶还未能能在纺织工业中实际应用,其主要原因有两点:1)现有角质酶产生菌的产酶水平太低,酶的生产成本过高,因此全球市场都未见有角质酶的商业化产品;2)棉纤维含有多种杂质,只靠一种酶是不能将其全部分解的,必须要多种酶配合起来。但不同的酶的共适条件不同,这样会影响酶的协同作用效果。

要解决以上问题,今后必须重点研究角质酶高产菌的构建技术和发酵优化技术,以大幅度提高产酶水平,从而降低其生产成本。同时还要研究角质

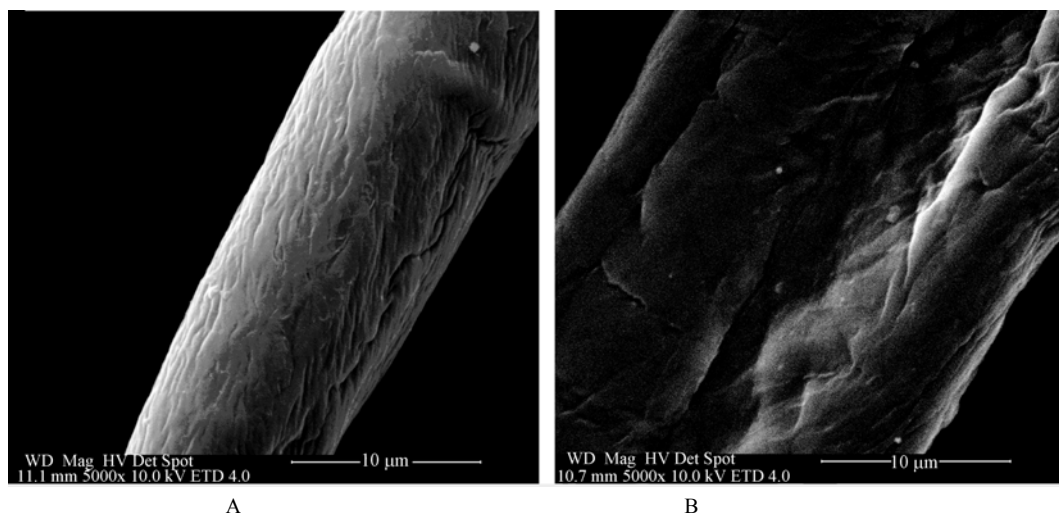


图4 碱精练(A)和酶精练(B)扫描电镜图

Fig. 4 Scanning electron microscopy images of (A) alkali-scoured cotton and (B) bioscoured cotton.

酶的分子改造技术,使其更符合生物精练的多酶工艺。研究各种酶在精练过程中的应用特性、作用机理和动力学模型,以最佳处理效果、更强稳定性为目标,进行复合酶和酶复配组分的探讨,以不同规模进行酶的应用研究,例如在棉织物精练工艺研究开发碱性果胶酶、角质酶、纤维素酶、半纤维素酶等酶的复配技术构建棉织物的绿色生物精练工艺。

REFERENCES

- [1] Nardini M, Dijkstra BW. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol*, 1999, **9**(6): 732–737.
- [2] Holmquist M. Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr Protein Pept Sci*, 2000, **1**(2): 209–235.
- [3] Kolattukudy PE, Purdy RE, Maiti IB. Cutinases from fungi and pollen. *Methods Enzymol*, 1981, **71**: 652–664.
- [4] Purdy RE, Kolattukudy PE. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Properties of cutinase I, cutinase II, and a nonspecific esterase isolated from *Fusarium solani pisi*. *Biochemistry*, 1975, **14**(13): 2832–2840.
- [5] Maiti IB, Kolattukudy PE. Prevention of fungal infection of plants by specific inhibition of cutinase. *Science*, 1979, **205**(4405): 507–508.
- [6] Shaykh M, Soliday C, Kolattukudy PE. Proof for the production of cutinase by *Fusarium solani f. pisi* during penetration into its host, *Pisum sativum*. *Plant Physiol*, 1977, **60**(1): 170–172.
- [7] Shayk M, Kolattukudy PE. Production of a novel extracellular cutinase by the pollen and the chemical composition and ultrastructure of the stigma cuticle of *Nasturtium (Tropaeolum majus)*. *Plant Physiol*, 1977, **60**(6): 907–915.
- [8] Heslop-Harrison J. The physiology of the pollen grain surface. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1975, **190**(1100): 275–299.
- [9] Pio TF, Macedo GA. Cutinase production by *Fusarium oxysporum* in liquid medium using central composite design. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, **35**(1): 59–67.
- [10] Wang GY, Michailides TJ, Hammock BD, et al. Molecular cloning, characterization, and expression of a redox-responsive cutinase from *Monilinia fructicola* (Wint.) honey. *Fungal Genet Biol*, 2002, **35**(3): 261–276.
- [11] Gindro K, Pezet R. Purification and characterization of a 40.8-kDa cutinase in ungerminated conidia of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **171**(2): 239–243.
- [12] Machida M, Asai K, Sano M, et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 2005, **438**(7071): 1157–1161.
- [13] Maeda H, Yamagata Y, Abe K, et al. Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **67**(6): 778–788.
- [14] Fett WF, Gerard HC, Moreau RA, et al. Cutinase production by *Streptomyces* sp.. *Curr Microbiol*, 1992, **25**(3): 165–171.
- [15] Sebastian J, Kolattukudy PE. Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere. *Arch Biochem Biophys*, 1988, **263**(1): 77–85.
- [16] Fett WF, Wijey C, Moreau RA, et al. Production of cutinase by *Thermomonospora fusca* ATCC 27730. *J Appl Microbiol*, 1999, **86**(4): 561–568.
- [17] Lienqueo ME, Salazar O, Henriquez K, et al. Prediction of retention time of cutinases tagged with hydrophobic peptides in hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A*, 2007, **1154**(1/2): 460–463.
- [18] Chen Z, Franco CF, Baptista RP, et al. Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **73**(6): 1306–1313.
- [19] Pio TF, Macedo GA. Cutinases: properties and industrial applications. *Adv Appl Microbiol*, 2009, **66**: 77–95.
- [20] Silva C, Cavaco-Paulo A. Biotransformations in synthetic fibres. *Biocatal Biotransf*, 2008, **26**(5): 350–356.
- [21] Feuerhack A, Alisch-Mark M, Kisner A, et al. Biocatalytic surface modification of knitted fabrics made of poly (ethylene terephthalate) with hydrolytic enzymes from *Thermobifida fusca* KW3b. *Biocatal Biotransf*, 2008, **26**(5): 357–364.
- [22] Longhi S, Cambillau C. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1441**: 185–196.
- [23] Longhi S, Czjzek M, Lamzin V, et al. Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. *J Mol Biol*, 1997, **268**(4): 779–799.
- [24] Longhi S, Nicolas A, Creveld L, et al. Dynamics of *Fusarium solani* cutinase investigated through structural comparison among different crystal forms of its variants. *Proteins*, 1996, **26**(4): 442–458.
- [25] Longhi S, Mannesse M, Verheij HM, et al. Crystal structure of cutinase covalently inhibited by a triglyceride analogue. *Protein Sci*, 1997, **6**(2): 275–286.
- [26] Martinez C, De Geus P, Lauwereys M, et al. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*, 1992, **356**(6370): 615–618.
- [27] Jelsch C, Longhi S, Cambillau C. Packing forces in nine crystal forms of cutinase. *Proteins*, 1998, **31**(3): 320–333.
- [28] Martinez C, de Geus P, Stanssens P, et al. Engineering cysteine mutants to obtain crystallographic phases with a cutinase from *Fusarium solani pisi*. *Protein Eng*, 1993, **6**(2): 157–165.
- [29] Maarten RE, Jacob de V. *Fusarium solani pisi* cutinase.

- Biochimie*, 2008, **82**(11): 1015–1021.
- [30] Prange T, Schiltz M, Pernot L, *et al.* Exploring hydrophobic sites in proteins with xenon or krypton. *Proteins*, 1998, **30**(1): 61–73.
- [31] Brzozowski AM, Derewenda U, Derewenda ZS, *et al.* A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, 1991, **351**(6326): 491–494.
- [32] Dodson G, Wlodawer A. Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem Sci*, 1998, **23**(9): 347–352.
- [33] Flipsen JA, van der Hijden HT, Egmond MR, *et al.* Action of cutinase at the triolein-water interface. characterisation of interfacial effects during lipid hydrolysis using the oil-drop tensiometer as a tool to study lipase kinetics. *Chem Phys Lipids*, 1996, **84**(2): 105–115.
- [34] Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, *et al.* Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, **15**(1): 29–63.
- [35] Drablos F, Petersen SB. Identification of conserved residues in family of esterase and lipase sequences. *Methods Enzymol*, 1997, **284**: 28–61.
- [36] Petersen SB, Drablos F, Petersen MT, *et al.* Identification of important motifs in protein sequences: program MULTIM and its applications to lipase-related sequences. *Methods Enzymol*, 1997, **284**: 61–85.
- [37] Weisenborn PC, Meder H, Egmond MR, *et al.* Photophysics of the single tryptophan residue in *Fusarium solani* cutinase: evidence for the occurrence of conformational substates with unusual fluorescence behaviour. *Biophys Chem*, 1996, **58**(3): 281–288.
- [38] Lin TS, Kolattukudy PE. Structural studies on cutinase, a glycoprotein containing novel amino acids and glucuronic acid amide at the N terminus. *Eur J Biochem*, 1980, **106**(2): 341–351.
- [39] Calado CR, Monteiro SM, Cabral JM, *et al.* Effect of pre-fermentation on the production of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng*, 2002, **93**(4): 354–359.
- [40] van Gemeren IA, Beijersbergen A, van den Hondel CA, *et al.* Expression and secretion of defined cutinase variants by *Aspergillus awamori*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(8): 2794–2799.
- [41] Kwon M, Kim HS, Yang TH, *et al.* High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2009, **68**(1): 104–109.
- [42] Belén Rubio M, Cardoza RE, Hermosa R, *et al.* Cloning and characterization of the *Thcut1* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Curr Genet*, 2008, **54**(6): 301–312.
- [43] Nicolas A, Egmond M, Verrips CT, *et al.* Contribution of cutinase serine 42 side chain to the stabilization of the oxyanion transition state. *Biochemistry*, 1996, **35**(2): 398–410.
- [44] Soliday CL, Kolattukudy PE. Primary structure of the active site region of fungal cutinase, an enzyme involved in phytopathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, **114**(3): 1017–1022.
- [45] Prompers JJ, Groenewegen A, Hilbers CW, *et al.* Backbone dynamics of *Fusarium solani pisi* cutinase probed by nuclear magnetic resonance: the lack of interfacial activation revisited. *Biochemistry*, 1999, **38**(17): 5315–5327.
- [46] Prompers JJ, Hilbers CW, Pepermans HA. Tryptophan mediated photoreduction of disulfide bond causes unusual fluorescence behaviour of *Fusarium solani pisi* cutinase. *FEBS Lett*, 1999, **456**(3): 409–416.
- [47] Prompers JJ, van Noorloos B, Mannesse ML, *et al.* NMR studies of *Fusarium solani pisi* cutinase in complex with phosphonate inhibitors. *Biochemistry*, 1999, **38**(19): 5982–5994.
- [48] Egmond MR, Antheunisse WP, Ravesteyn P, *et al.* Engineering surface charges in a subtilisin. *Adv Exp Med Biol*, 1996, **379**: 219–228.
- [49] Petersen MT, Martel P, Petersen EI, *et al.* Surface and electrostatics of cutinases. *Methods Enzymol*, 1997, **284**: 130–154.
- [50] van Gemeren IA, Musters W, van den Hondel CA, *et al.* Construction and heterologous expression of a synthetic copy of the cutinase cDNA from *Fusarium solani pisi*. *J Biotechnol*, 1995, **40**(3): 155–162.
- [51] van Gemeren IA, Beijersbergen A, Musters W, *et al.* The effect of pre- and pro-sequences and multicopy integration on heterologous expression of the *Fusarium solani pisi* cutinase gene in *Aspergillus awamori*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, **45**(6): 755–763.
- [52] Calado CR, Ferreira BS, da Fonseca MM, *et al.* Integration of the production and the purification processes of cutinase secreted by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SU50 strain. *J Biotechnol*, 2004, **109**(1/2): 147–158.
- [53] Himmelsbach DS, Akin DE, Ian Hardin JK. Chemical structural investigation of the cotton fiber base and associated seed coat: fourier-transform infrared mapping and histochemistry. *Text Res J*, 2003, **73**(4): 281–288.
- [54] Agrawal I PB, Agrawal PB, Nierstrasz VA, *et al.* Cutinase and pectinase in cotton bioscouring: an innovative and fast bioscouring process. *Biocatal Biotrans*, 2008, **26**(5): 412–421.
- [55] Parvaresh F, Robert H, Thomas D, *et al.* Gas phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **39**(4): 467–473.
- [56] Kim Y H, Ahn J Y, Moon S H, *et al.* Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Chemosphere*, 2005, **60**(10): 1349–1355.
- [57] Pocalyko D J, Tallman M. Effects of amphipaths on the activity and stability of *Fusarium solani pisi* cutinase. *Enzyme Microb Technol*, 1998, **22**(7): 647–651.
- [58] Dragana PC, de Barros, Dr, Luís P Fonseca. Synthesis of alkyl esters by cutinase in miniemulsion and organic solvent media. *Biotechnol J*, 2009, **4**(5): 674–683.
- [59] Royon D, Daz M, Ellenrieder G, *et al.* Enzymatic production

- of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresour Technol*, 2007, **98**(3): 648–653.
- [60] Bi FZ, Shi JL, Li Y, *et al.* Cutinase production conditions with *thermobifida fusca*. *Chin J Appl Environ Biol*, 2005, **11**(5): 608–610.
毕凤珍, 师俊玲, 李寅, 等. *Thermobifida fusca* 产角质酶摇瓶发酵条件研究. *应用与环境生物学报*, 2005, **11**(5): 608–610.
- [61] Zhang SL, Chen J, Hua ZZ, *et al.* Mutagenesis of cutinase-producing strain *Thermobifida fusca* WSH03-11 and optimization of fermentation conditions of mutant with high cutinase production. *Cheml Ind and Eng Prog*, 2006, **25**(5): 533–537.
张守亮, 陈坚, 华兆哲, 等. 角质酶产生菌 *Thermobifida fusca* WSH03-11 诱变及高产突变株发酵条件优化. *化工进展*, 2006, **25**(5): 533–537.
- [62] Du GC, Zhang SL, Hua ZZ, *et al.* Enhanced cutinase production with *Thermobifida fusca* by two-stage pH control strategy. *Biotechnol J*, 2007, **2**(3): 365–369.
- [63] He GQ, Huo GH, Liu LM, *et al.* Enhanced cutinase production of *Thermobifida fusca* by a two-stage batch and fed-batch cultivation strategy. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2008, **13**: 1–6.
- [64] Zhang SL, Chen J, Hua ZZ, *et al.* Optimization of fermentation conditions for cutinase production with a mutant of *Thermobifida fusca* WSH03211. *J Food Sci Biotechnol*, 2006, **25**(5): 44–48.
张守亮, 陈坚, 华兆哲, 等. *Thermobifida fusca* WSH03211 突变株合成角质酶的发酵条件. *食品与生物技术学报*, 2006, **25**(5): 44–48.
- [65] Chen S, Tong X, Woodard RW, *et al.* Identification and characterization of bacterial cutinase. *J Biol Chem*, 2008, **283**(38): 25854–25862.
- [66] Zhang FH, Chen S, Zhang DX, *et al.* Studies on two-stage pH control strategy of recombinant cutinase production. *China Biotechnol*, 2008, **28**(5): 59–64.
张芙华, 陈晟, 张东旭, 等. pH 两阶段控制策略发酵生产重组角质酶. *中国生物工程杂志*, 2008, **28**(5): 59–64.
- [67] Chen J, Wang Q, Hua ZZ, *et al.* Research and application of biotechnology in textile industries in China. *Enzyme Microb Technol*, 2007, **40**(7): 1651–1655.
- [68] Wang Q, Fan XR, Gao WD, *et al.* Bleaching and dyeing properties of enzymatic scoured cotton fabric. *China Textile Leader*, 2006, **79**(2): 79–81.
王强, 范雪荣, 高卫东, 等. 复合生物酶精练棉织物的漂白与染色性能. *纺织导报*, 2006, **79**(2): 79–81.
- [69] Wang P, Wang Q, Fan XR, *et al.* Effects of cutinase on the enzymatic shrink-resist finishing of wool fabrics. *Enzyme Microb Technol*, 2009, **44**(5): 302–308.
- [70] Wang Q, Fan XR, Hua ZZ, *et al.* Influence of combined enzymatic treatment on one-bath scouring of cotton knitted fabrics. *Biocatal Biotrans*, 2007, **25**(1): 9–15.
- [71] Yan HJ, Hua ZZ, Qian GS, *et al.* Effect of cutinase on the degradation of cotton seed coat in bio-scouring. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2009, **14**(3): 354–360.