橘色梅泽氏菌新型角质酶的发掘、性质及在合成短链脂肪酸酯中的应用

陈岩[1]，胡志怡[1]，江正强[1,2]，闫巧娟[3]，杨绍青[1*]

（1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院，北京 100083）

（2. 中原食品实验室，河南漯河 462300）（3. 中国农业大学工学院，北京 100083）

摘要：短链脂肪酸酯具有令人愉悦的、类似水果和脂肪的香味，在食品和化妆品等领域应用广泛。角质酶能催化有机酸和醇反应生成短链脂肪酸酯，酶法合成相比与化学合成具有反应条件温和且环境友好等优点。本研究旨在挖掘新型角质酶，研究其酶学性质，并用于高效合成短链脂肪酸酯。从橘色梅泽氏菌（*Umezawaea tangerina*）中克隆得到角质酶基因（*UtCut*），构建重组表达质粒 pET-32a-UtCut 并在大肠杆菌 BL21（DE3）中表达，经亲和层析纯化后研究了重组角质酶（UtCut）的酶学性质，并测定了该酶对短链脂肪酸酯的合成效果。结果表明，UtCut 与地中海拟无枝酸菌（*Amycolatopsis mediterranei*）角质酶相似性最高，为 74.9%。UtCut 的比酶活力为 279.29 U·mg^{-1}，最适 pH 值和温度分别为 pH 值 8.0 和 35 ℃，在 pH 值 6.0~8.5 和 35 ℃以下保持稳定。该酶对 *p*NPH（C_6）和三丁酸甘油酯水解活性最高。UtCut 在 35 ℃、加酶量 25 U·mL^{-1} 的条件下合成己酸乙酯的酯化率为 100%。本研究挖掘的新型角质酶 UtCut 对短链脂肪酸酯具有高效的合成效果，在风味酯合成领域具有较大的潜在应用价值。

关键词：橘色梅泽氏菌；角质酶；短链脂肪酸酯；己酸乙酯

文章编号：1673-9078(2026)10-10-18 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.10.1903

Characterization of A Novel Cutinase from *Umezawaea tangerine* and Its Application in Short-chain Aliphatic Esters Synthesis

CHEN Yan[1], HU Zhiyi[1], JIANG Zhengqiang[1,2], YAN Qiaojuan[3], YANG Shaoqing[1*]

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2. Food Laboratory of Zhongyuan, Luohe 462300, China)

(3. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Short-chain aliphatic esters possess pleasant fruity and fatty aromas and are widely used in food products and cosmetics. Cutinases can catalyze the synthesis of short-chain aliphatic esters from organic acids and alcohols. Compared with chemical synthesis, enzymatic synthesis of short-chain aliphatic esters has advantages such as mild reaction conditions and environmental friendliness. The present study aimed to identify novel cutinases and investigate their application potential in the efficient synthesis of short-chain aliphatic esters. A cutinase gene (UtCut) was cloned from *Umezawaea tangerine* and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant enzyme (UtCut) was purified by affinity chromatography and characterized, and its effects on the synthesis of short-chain aliphatic esters were determined. The results indicated that UtCut shared the highest similarity of 74.9% with the cutinase derived from *Amycolatopsis mediterranei.* The specific activity of UtCut was 279.29 U·mg^{-1}, and its optimum pH and temperature were 8.0 and 35 ℃ , respectively. The enzyme maintained its stability at temperatures up to 35 ℃ and within the pH range of 6.0~8.5. It showed the highest hydrolytic activity toward *p*NPH (C_6) and tributyrin. At an enzyme concentration

收稿日期：2025-12-31；修回日期：2026-03-07；接受日期：2026-03-11

基金项目：国家重点研发计划项目（2022YFD2101400）

作者简介：陈岩（2001-），女，硕士研究生，研究方向：食品酶工程，E-mail：s20233061264@cau.edu.cn

通讯作者：杨绍青（1980-），男，博士，教授，研究方向：食品酶工程，E-mail：ysq@cau.edu.cn

of 25 U·mL^{-1} and temperature of 35 ℃ , an esterification rate of 100% was obtained for the synthesis of ethyl caproate. The newly identified cutinase may have application potential in the flavor ester production industry.

Key words: *Umezawaea tangerine*; cutinase; short-chain aliphatic esters; ethyl caproate

引文格式:

陈岩,胡志怡,江正强,等.橘色梅泽氏菌新型角质酶的发掘、性质及在合成短链脂肪酸酯中的应用[J].现代食品科技,2026,42(10):10-18.

CHEN Yan, HU Zhiyi, JIANG Zhengqiang, et al. Characterization of a novel cutinase from *Umezawaea tangerine* and its application in short-chain aliphatic esters synthesis [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(10): 10-18.

角质酶（EC 3.1.1.74）属于 *α*/*β* 水解酶超家族，广泛存在于植物花粉和多种微生物中[1]，它不仅能够水解角质[2]，还可以催化酯化和酯交换反应，以及降解各种聚酯、可溶性酯和不溶性甘油三酯[3]。角质酶具有开放的底物结合通道和经典的催化三联体（Ser-His-Asp/Glu）[4]，与脂肪酶不同的是角质酶无需界面活化即可催化疏水性底物，这使其在非水相催化体系中具有独特价值[5]。作为一种多功能酶，角质酶广泛应用于食品加工、化工合成和环境保护等领域[6]。在食品工业中，角质酶可用于风味酯的合成及牛奶脂肪的水解[7]；在化工行业中，角质酶能够生产生物柴油、酚类物质及表面活性剂等[8]；在环境保护方面，角质酶具有降解聚酯和残留农药的能力[9]。

短链脂肪酸酯通常被认为是碳链长度小于 10 的短链酸和醇构成的酯，它被广泛应用于食品、饮料和化妆品等行业的人造香精香料中[11]。例如，丁酸丁酯具有菠萝、苹果和香蕉的果香味，可用作糖果、布丁和烘焙食品的调味剂[12]。己酸乙酯也具有菠萝和香蕉等水果香味，可用作饮料、甜点和口香糖的增味剂，同时它也是浓香型白酒的主体香味成分，味甜爽口且具有白酒窖香感[13]。短链脂肪酸酯可以从蔬菜、水果等天然物中提取获得，然而提取获得的天然香味是由不同风味化合物组成的混合物，它们在天然物中的浓度低且提取效率低，这导致天然香气的价格昂贵[14]。短链脂肪酸酯也可以通过在强酸或强碱催化下化学合成获得，该方法成本低廉，但高温反应过程中易产生副产物，且由于使用了腐蚀性化学催化剂，合成的酯类通常被认为不属于天然产物[15]。相比之下，酶法合成短链脂肪酸酯具有反应条件温和、效率高且产品纯度高等优点，满足当今社会对环保工艺和绿色技术的需求，并且所得酯类物质通常被归为天然产物[16]。

目前，已经报道多种微生物来源的角质酶可用于短链脂肪酸酯的合成。在异辛烷反应体系中反应 30 h，伯克霍尔德菌角质酶催化合成己酸乙酯和己酸丁酯的得率分别为 65% 和 73%[12]。腐皮镰刀菌（*Fusarium solani*）角质酶在加酶量为 240 U·mL^{-1} 时反应 6 h，催化合成丁酸乙酯的得率为 84%[17]。太瑞斯梭孢壳霉（*Thielavia terrestris*）角质酶 TtCutopt 在加酶量为 550 U·mL^{-1} 时反应 8 h，合成丁酸丁酯的酯化率为 99.2%[18]。目前酶法合成短链脂肪酸酯大多存在催化效率低且酯化率不高等问题[6]，因此继续挖掘具有高效合成短链脂肪酸酯的角质酶具有重要意义。本研究从橘色梅泽氏菌（*Umezawaea tangerina*）中发掘了角质酶基因（*UtCut*）并在大肠杆菌（*Escherichia coli*）BL21（DE3）中异源表达，研究其酶学性质，进一步将该酶用于短链脂肪酸酯的高效合成。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌 DH5*α*、BL21（DE3）感受态细胞，北京 TransGen 公司；异丙基-*β*-D-硫代半乳糖苷（IPTG），美国 Sigma 公司；乙酸对硝基苯酯（*p*NPA）、丁酸对硝基苯酯（*p*NPB）、己酸对硝基苯酯（*p*NPH）、辛酸对硝基苯酯（*p*NPC）、癸酸对硝基苯酯（*p*NPD）、月桂酸对硝基苯酯（*p*NPL）、肉豆蔻酸对硝基苯酯（*p*NPM）、棕榈酸对硝基苯酯（*p*NPP），美国 Sigma 公司；三乙酸甘油酯、三丁酸甘油酯、三己酸甘油酯、三辛酸甘油酯、三癸酸甘油酯、三月桂酸甘油酯、三肉豆蔻酸甘油酯、三棕榈酸甘油酯，日本 TCI 公司。其他试剂若无特殊说明均为分析纯。

JY92-IIDN 型超声波细胞粉碎机，宁波 SCIENTZ 公司；GelPro 凝胶成像系统，北京 CBIO 公司；Ni-NTA 亲和层析柱，美国 GE Healthcare 公司；Aglient 6890 GC 气相色谱仪，美国安捷伦公司。

1.2 实验方法

1.2.1 角质酶UtCut的序列分析

角质酶基因从 NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）上获取，由北京擎科生物科技股份有限公司合成。利用 BLAST（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）进行序列同源性比对。利用 ExPASy ProtParam

（https://web.expasy.org/protparam/）预测蛋白质的分子量和等电点。使用 SignalP 6.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignallP/）预测信号肽。使用 DNAMAN 进行多序列比对分析并绘图。

1.2.2 角质酶UtCut的重组表达和纯化

将橘色梅泽氏菌角质酶基因（GenkBank 号为 PRY41751.1）连接至 pET-32a(+) 载体，得到重组质粒 pET-32a-UtCut。将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞中，涂布于 LB 平板培养基（含 100 μg·mL^{-1} 氨苄青霉素），挑取单菌落至 LB 液体培养基（含 100 μg·mL^{-1} 氨苄青霉素）中，37 ℃培养 8 h 得到种子液，取 3 mL 种子液于 300 mL 上述培养基中继续培养，当 OD_{600} 达到 0.6~0.8 时加入 IPTG（终浓度为 1 mmol·L^{-1}），16 ℃诱导培养 12 h 以上。12 000 r·min^{-1} 离心 5 min 收集菌体，用缓冲液 A（20 mmol·L^{-1} Tris-HCl，500 mmol·L^{-1} NaCl，20 mmol·L^{-1} 咪唑，pH 值 8.0）重悬菌体，超声破壁后 12 000 r·min^{-1} 离心 5 min 得到粗酶液。

使用 Ni-NTA 亲和层析柱对角质酶 UtCut 进行纯化。层析柱预先用缓冲液 A 平衡，然后将粗酶液以 0.5 mL·min^{-1} 的流速上样，先用缓冲液 A 洗脱未结合蛋白，再用缓冲液 B（20 mmol·L^{-1} Tris-HCl，500 mmol·L^{-1} NaCl，100 mmol·L^{-1} 咪唑，pH 值 8.0）洗脱目的蛋白，洗脱时流速为 1.0 mL·min^{-1}。收集有酶活力的组分，用 SDS-PAGE 分析蛋白纯度。

1.2.3 酶活力和蛋白含量的测定

以丁酸对硝基苯酯（*p*NPB，C_4）为底物测定角质酶的酶活力[19]：在 400 μL 50 mmol·L^{-1} pH 值 8.0 HEPES 缓冲液中加入 50 μL 适当稀释的酶液，在 35 ℃水浴锅中保温 2 min，加入 50 μL 10 mmol·L^{-1} *p*NPB 的异丙醇溶液，反应 10 min 后加入 500 μL 终止剂［含有 5%（*m*/*V*）SDS 的 300 mmol·L^{-1}、pH 值 7.0 磷酸盐缓冲液］，于 410 nm 波长处测定吸光值。酶活力单位（U）定义为在以上条件下，每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量。

蛋白含量的测定参照 Lowry 等方法[20]，以牛血清白蛋白（BSA）为标准蛋白。

1.2.4 角质酶UtCut酶学性质的测定

最适 pH 值和 pH 值稳定性的测定：在 35 ℃、50 mmol·L^{-1} 不同缓冲液条件下测定纯酶的酶活力以确定最适 pH 值，所使用的缓冲液包括柠檬酸－柠檬酸钠（Citrate，pH 值 3.0~6.0）、2- 吗啉乙磺酸（MES，pH 值 5.0~7.0）、4- 羟乙基哌嗪乙磺酸（HEPES，pH 值 6.0~8.5）、三羟甲基氨基甲烷－盐酸盐（Tris-HCl，pH 值 7.0~8.5）、2- 环己胺基乙磺酸（CHES，pH 值 8.0~10.0）和 3- 环己胺-1- 丙磺酸（CAPS，pH 值 10.0~11.0）。pH 值稳定性的测定为酶液在上述缓冲液中 35 ℃保温 30 min，最适条件下测定残余酶活力。

最适温度和温度稳定性的测定：用 50 mmol·L^{-1} pH 值 8.0 HEPES 缓冲液适当稀释酶液，分别在不同温度下（20~60 ℃）测定酶活力以确定最适温度。温度稳定性的测定为酶液在 50 mmol·L^{-1} pH 值 8.0 HEPES 缓冲液中于不同温度下（20~55 ℃）保温 30 min，最适条件下测定残余酶活力。

半衰期的测定：酶液在 50 mmol·L^{-1} pH 值 8.0 HEPES 缓冲液中分别于 30、35 和 40 ℃保温 6 h，定时取样后最适条件下测定残余酶活力。

1.2.5 金属离子及化合物对角质酶UtCut酶活力的影响

将金属离子（终浓度为 1 mmol·L^{-1}）及化合物（终体积分数为 30%）分别与酶液在 35 ℃保温 60 min，最适条件下测定残余酶活力。

1.2.6 角质酶UtCut的底物特异性

参照 Xiang 等[21]的方法，在 35 ℃、50 mmol·L^{-1} pH 值 8.0 HEPES 缓冲液中分别测定 UtCut 以对硝基苯酯和甘油三酯为底物时的酶活力。

1.2.7 角质酶UtCut合成短链脂肪酸酯

参照 Duan 等[22]的方法，5mL 异辛烷中加入 0.1 mol·L^{-1} 有机酸和 0.2 mol·L^{-1} 醇，向混合体系中加入冻干角质酶酶粉和 40 mg·mL^{-1} 的 4Å 分子筛，以不加角质酶 UtCut 的反应体系为对照组，于 35 ℃、200 r·min^{-1} 的水浴摇床中反应 16 h，定时取样进行气相色谱检测，考察酸链长度（C_2~C_{12}）、加酶量（15~100 U·mL^{-1}）和反应温度（30~60 ℃）对 UtCut 催化合成短链脂肪酸酯的影响。

气相色谱检测条件[19]：色谱柱为 HP-INNOWax，载气为高纯氮气；进样口和检测器温度为 230 ℃；柱温箱升温程序为 50 ℃保持 3 min，15 ℃·min^{-1} 升至 220 ℃，保持 2 min；进样体积为 1 μL，分流比为 20:1。

1.3 数据处理

使用 Origin 2024 进行数据统计和图片处理，每组数据设 3 次平行。

2 结果与讨论

2.1 角质酶UtCut的序列分析

该基因全长为 921 bp，共编码 306 个氨基酸，

N 端存在一个由 44 个氨基酸组成的信号肽，成熟蛋白的预测分子量和理论等电点分别为 27.74 ku 和 8.01。蛋白序列比对表明，UtCut 与地中海拟无枝酸菌（*Amycolatopsis mediterranei*）来源的角质酶（P0DX29.1）相似性最高，为 74.90%，与嗜热纤维素分解菌（*Thermobifida cellulosilytica*，E9LVH8.1）、嗜热裂孢菌（*Thermobifida fusca*，Q47RJ6.1）和高温双岐菌（*Thermobifida alba*，D4Q9N1.2）来源的角质酶相似性分别为 67.82%、67.66% 和 67.05%（图 1），说明该酶是一个新型角质酶。

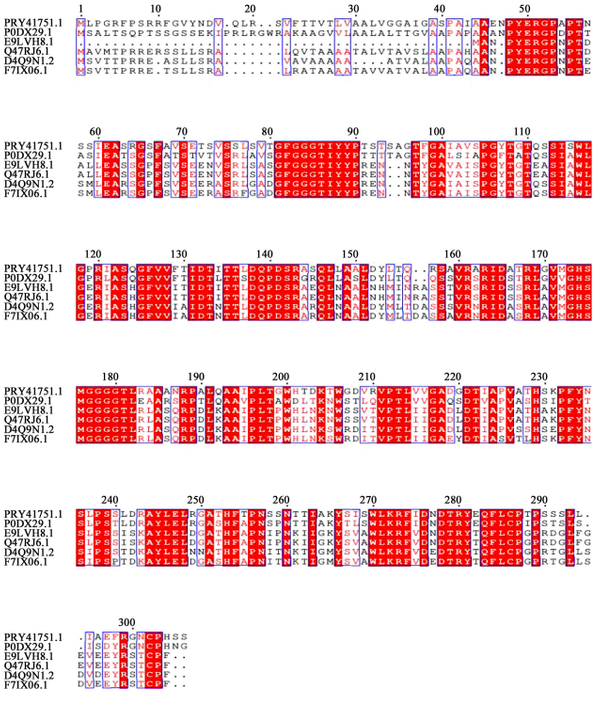


图 1 角质酶 UtCut 与其他来源角质酶序列比对分析

Fig.1 Multiple amino acid sequence alignment of UtCut and other cutinases

注：相同残基在红色背景显示为白色，保守残基在白色背景显示为红色。

2.2 角质酶UtCut的重组表达和纯化

UtCut 成功在大肠杆菌 BL21（DE3）中可溶表达，粗酶液经过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化得到电泳级纯酶。SDS-PAGE 表明在约 46 ku 处显示为单一条带，与预测分子量一致（图 2）。酶活力回收率为 84.13%，比酶活力由 75.98 U·mg^{-1} 提升至 279.29 U·mg^{-1}，纯化倍数为 3.68（表 1）。角质酶 UtCut 的比酶活力高于多数其他大肠杆菌表达的角质酶，如腐皮镰刀菌（14.4 U·mg^{-1}）[23]和嗜热裂孢菌（223.1 U·mg^{-1}）[24]等来源的角质酶。

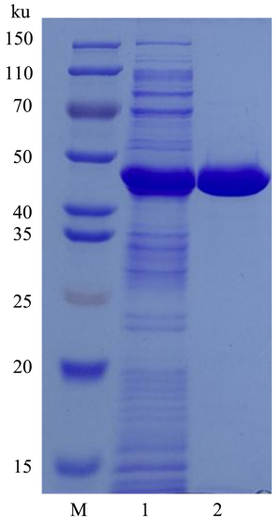


图 2 重组角质酶 UtCut SDS-PAGE 纯化电泳图

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the purified UtCut

注：M：高分子量标准蛋白；1：粗酶液；2：纯化酶。

表 1 重组角质酶UtCut纯化表

Table 1 Purification summary of UtCut

纯化步骤	总酶活力/U	总蛋白/mg	比酶活力/(U·mg^{-1})	纯化倍数	回收率/%
粗酶液	7 412.34	97.56	75.98	1.00	100.00
亲和层析	6 236.34	22.33	279.29	3.68	84.13

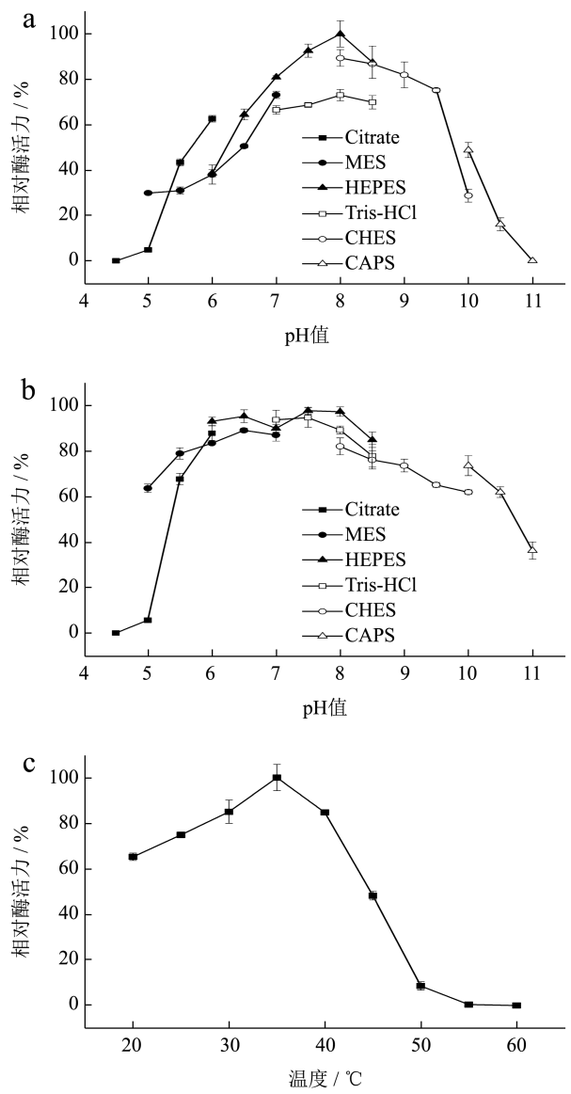
2.3 角质酶UtCut的酶学性质

UtCut 的最适 pH 值为 8.0（图 3a），在 pH 值 6.0~8.5 范围内的缓冲液中处理 30 min，残余酶活力大于 80%（图 3b）。该酶的最适温度为 35 ℃（图 3c），在 35 ℃以下处理 30 min 后相对酶活力大于 90%，当温度高于 40 ℃时酶活力急剧下降（图 3d）。UtCut 在 30、35 和 40 ℃下的半衰期分别为 1 360.20、309.27 和 22.36 min（图 3e）。

大多数角质酶的最适 pH 值偏碱性（pH 值 8.0~10.0）[6]。UtCut 的最适 pH 值为 8.0（图 3a），与腐皮镰刀菌[23]、轮状镰刀菌（*Fusarium verticillioides*）[25]和罗氏念珠菌（*Moniliophthora roreri*）[26]等来源的角质酶最适 pH 值相同，高于一些酸性角质酶的最适 pH 值，如来源于太瑞斯梭孢壳霉（pH 值 4.0）[18]、泪珠状坂口氏酵母（*Sakaguchia* sp.）（pH 值 4.0）[27]和黑曲霉（*Aspertillus niger*）（pH 值 5.0~6.0）[28]的角质酶。多数碱性角质酶在中性或碱性条件下保持稳定[6]。UtCut 在 pH 值 6.0~8.5 范围内稳定性较好（图 3b），与烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）（pH 值 6.0~9.5）[9]和嗜热裂孢菌（pH 值 6.5~9.0）[29]来源的角质酶 pH 值稳定范围相近。UtCut 在碱性条件下活性较高，使其在洗涤剂和

纺织行业具有潜在的应用价值[15]。

细菌角质酶的最适温度（40~60 ℃）一般高于真菌角质酶（30~40 ℃）[18]。UtCut 的最适温度为 35 ℃（图 3c），与泪珠状坂口氏酵母[27]和轮状镰刀菌[25]来源的角质酶最适温度相同，低于多数细菌角质酶的最适温度，如海洋分枝杆菌（*Mycobacterium marinum*）（45 ℃）[30]、嗜热纤维素分解菌（50 ℃）[31]和嗜热裂孢菌（55 ℃）[29]等来源的角质酶。该酶在 35 ℃以下保持稳定，在 20 ℃时相对酶活力仍大于 60%，而当温度超过 40 ℃时酶活力急剧下降（图 3d），与太瑞斯梭孢壳霉[6]和南极红球菌（*Antarctic Rhodococcus* sp.）[32]来源的适冷性角质酶热稳定性相似，易热失活。UtCut 对温度变化敏感，具有低温下保持稳定，中高温时易变性失活的适冷特性[6]，是一个新型适冷性角质酶。UtCut 可以在常温下进行酶促反应，该特性可以减少实际应用中的能源消耗[6]。



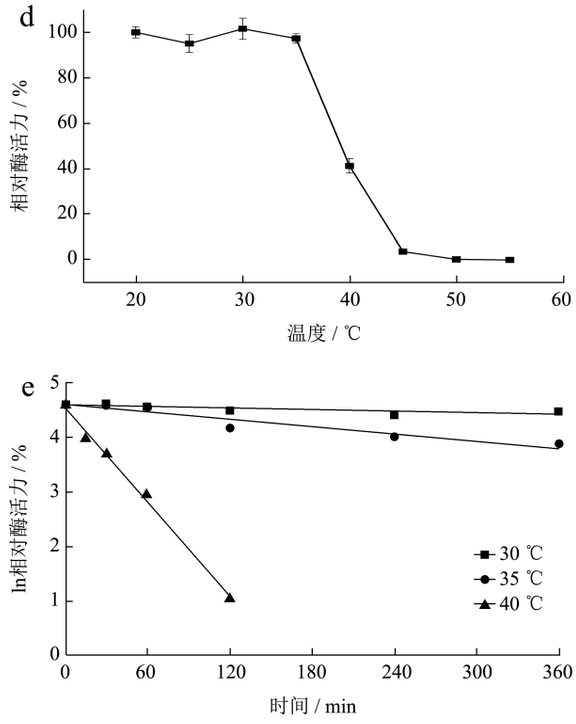


图 3 角质酶 UtCut 的酶学性质

Fig.3 Enzymatic properties of UtCut

注：（a）UtCut 的最适 pH 值；（b）UtCut 的 pH 值稳定性；（c）UtCut 的最适温度；（d）UtCut 的温度稳定性；（e）UtCut 的半衰期。

表 2 金属离子对重组角质酶UtCut酶活力的影响

Table 2 Effect of metal ions on the enzyme activity of UtCut

金属离子/(1 mmol·L^{-1})	比酶活力/(U·mg^{-1})	相对酶活力/%
对照	224.50 ± 9.53	100.00 ± 4.25
Na^{+}	193.51 ± 6.04	86.19 ± 2.69
K^{+}	178.17 ± 4.62	79.36 ± 2.06
Ag^{+}	260.97 ± 8.42	116.25 ± 3.75
Mg^{2+}	184.74 ± 1.88	82.29 ± 0.84
Ca^{2+}	248.60 ± 7.06	110.74 ± 3.15
Cu^{2+}	1.54 ± 0.08	0.69 ± 0.04
Ni^{2+}	58.89 ± 4.26	26.23 ± 1.90
Mn^{2+}	249.54 ± 10.97	111.16 ± 4.88
Ba^{2+}	274.43 ± 14.84	122.24 ± 6.61
Co^{2+}	145.14 ± 4.36	64.65 ± 1.94
Zn^{2+}	210.41 ± 6.25	93.72 ± 2.79
Fe^{2+}	252.99 ± 10.08	112.69 ± 4.49
Fe^{3+}	224.97 ± 6.57	100.21 ± 2.93
Cr^{3+}	262.69 ± 4.63	117.01 ± 2.06

2.4 金属离子及化合物对角质酶UtCut酶活力的影响

金属离子对 UtCut 的影响呈现多样性，Ni^{2+} 和 Co^{2+} 对 UtCut 有较强的抑制作用，Cu^{2+} 几乎完全抑制其活性，酶活力下降了 99.31%，而 Ag^{+}、Ba^{2+}、Fe^{2+} 和 Cr^{3+} 对该酶活性有一定的激活作用（表 2）。角质酶常在有机体系中催化合成反应，因此考察了有机试剂和表面活性剂对 UtCut 酶活力的影响。短链酸和醇对 UtCut 有不同程度的抑制作用，乙醇、正丙醇和正丁醇的抑制作用明显，丁酸完全抑制其活性，而正己烷和异辛烷对该酶有较强的激活作用，酶活力分别提高了 27.49% 和 25.21%。吐温 20 和吐温 60 对 UtCut 有较强的抑制作用，而吐温 40 对其有激活作用，曲拉通 X-100 对该酶激活作用最大，酶活力提高了 99.58%（表 3）。

表 3 有机试剂和表面活性剂对重组角质酶UtCut酶活力的影响

Table 3 Effect of organic solvents and surfactants on the enzyme activity of UtCut

试剂（30%）	比酶活力/(U·mg^{-1})	相对酶活力/%
对照	224.50 ± 9.53	100.00 ± 4.25
甲醇	32.68 ± 1.26	14.56 ± 0.56
乙醇	4.45 ± 0.20	1.98 ± 0.09
异丙醇	22.63 ± 3.12	10.08 ± 1.39
正丙醇	0.25 ± 0.01	0.11 ± 0.00
正丁醇	2.84 ± 0.07	1.27 ± 0.03
乙酸	89.39 ± 2.41	39.82 ± 1.07
丁酸	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
正己烷	286.20 ± 13.25	127.49 ± 5.90
异辛烷	281.09 ± 11.74	125.21 ± 5.23
丙酮	80.23 ± 3.25	35.74 ± 1.45
二甲基亚砜	204.93 ± 12.78	91.28 ± 5.69
吐温 20	0.76 ± 0.03	0.34 ± 0.01
吐温 40	239.56 ± 8.21	106.71 ± 3.66
吐温 60	0.67 ± 0.02	0.30 ± 0.01
吐温 80	205.75 ± 4.73	91.65 ± 2.11
曲拉通 X-100	448.06 ± 37.76	199.58 ± 16.82

2.5 角质酶UtCut的底物特异性

考察了角质酶 UtCut 对人工合成底物和天然底物的底物特异性。以人工合成底物对硝基苯酯为底物时，UtCut 对 *p*NPH（C_6）水解活性最高，其次是 *p*NPB（C_4，97.81%），对 *p*NPA（C_2）水解能力较弱，相对酶活力为 32.35%。以天然底物甘油三酯为底物时，UtCut 对三丁酸甘油酯水解活性最高，随着脂肪酸的碳链长度由 8 增加至 16 时，角质酶活力急剧下降（表 4）。

表 4 角质酶UtCut的底物特异性

Table 4 Substrate specificity of UtCut

	底物	比酶活力/(U·mg^{-1})	相对酶活力/%
对硝基苯酯	*p*NPA（C_2）	79.50 ± 4.36	32.35 ± 1.77
	*p*NPB（C_4）	240.38 ± 15.58	97.81 ± 6.34
	*p*NPH（C_6）	245.75 ± 13.64	100.00 ± 5.55
	*p*NPC（C_8）	218.11 ± 9.97	88.75 ± 4.06
	*p*NPD（C_{10}）	220.61 ± 8.85	89.77 ± 3.60
	*p*NPL（C_{12}）	192.40 ± 1.52	78.29 ± 0.62
	*p*NPM（C_{14}）	115.24 ± 9.84	46.89 ± 4.01
	*p*NPP（C_{16}）	105.41 ± 4.68	42.89 ± 1.90
甘油三酯	三乙酸甘油酯（C_2）	104.88 ± 17.48	34.62 ± 5.77
	三丁酸甘油酯（C_4）	302.98 ± 20.18	100.00 ± 6.66
	三己酸甘油酯（C_6）	250.54 ± 10.09	82.69 ± 3.33
	三辛酸甘油酯（C_8）	192.27 ± 17.48	63.46 ± 5.77
	三癸酸甘油酯（C_{10}）	64.09 ± 17.48	21.15 ± 5.77
	三月桂酸甘油酯（C_{12}）	81.57 ± 10.09	26.92 ± 3.33
	三肉豆蔻酸甘油酯(C_{14})	64.09 ± 10.09	21.15 ± 3.33
	三棕榈酸甘油酯（C_{16}）	20.39 ± 10.09	6.73 ± 3.33

UtCut 底物特异性广泛，不仅可以水解对硝基苯酯，还可以水解甘油三酯，该酶对 *p*NPH（C_6）和三丁酸甘油酯水解活性最高（表 4）。目前文献报道的角质酶大多对 *p*NPB（C_4）具有更高的催化能力，如轮状镰刀菌[33]、特异腐质霉（*Humicola insolens*）[34]和太瑞斯梭孢壳霉[18]来源的角质酶。此外，有些角质酶对 *p*NPA（C_2）水解活性较高，如担子菌（*Coprinus cinereus*）[35]和细球菌（*Sirococcus conigenus*）[36]来源的角质酶。还有些角质酶与 UtCut 一样对中长链的底物催化效率更高，如酵母菌（*Arxula adeninivorans*）[37]来源的角质酶对 *p*NPH（C_6）水解活性更高，围小丛壳菌（*Glomerella cingulata*）角质酶[38]对 *p*NPL（C_{12}）的催化活力最高。

2.6 角质酶UtCut合成短链脂肪酸酯

在 35 ℃、加酶量 25 U·mL^{-1} 的条件下，考察了酸链长度对角质酶 UtCut 催化合成脂肪酸乙酯的影响。角质酶 UtCut 对链长为 4~8 的脂肪酸乙酯催化效率较高，酯化率超过 93%，其中己酸乙酯的酯化率最高（100%）。该酶对脂肪酸链更短和更长的脂肪酸乙酯催化效率较低，如乙酸乙酯（19.22%）、癸酸乙酯（22.55%）和月桂酸乙酯（7.74%）（图 4）。

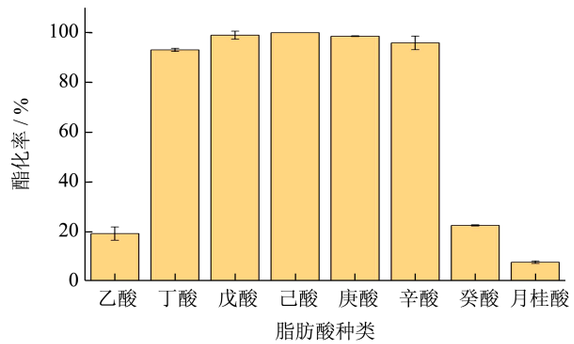


图 4 酸链长度对角质酶 UtCut 催化合成脂肪酸乙酯的影响

Fig.4 Effect of acid chain lengths on the synthesis of ethyl esters by UtCut

注：催化反应在 35 ℃进行，加酶量为 25 U·mL^{-1}，反应时间 16 h。

考察了加酶量对角质酶 UtCut 催化合成己酸乙酯的影响。当加酶量为 15 U·mL^{-1} 时，反应 16 h，己酸乙酯的酯化率为 89.26%；当加酶量为 25 U·mL^{-1} 时，反应 12 h，酯化率为 100%。随着加酶量的增加，该酶 100% 合成己酸乙酯的周期变短，当加酶量为 100 U·mL^{-1} 时，反应 6 h 己酸乙酯的酯化率就已达到 100%（图 5）。

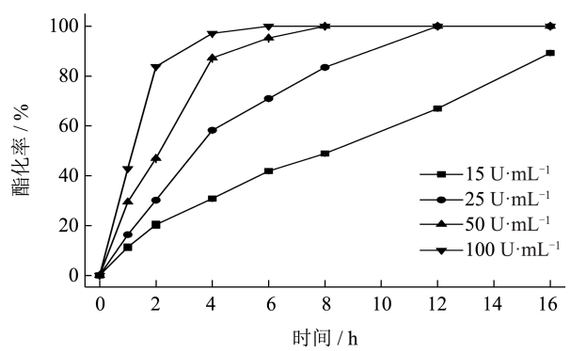


图 5 加酶量对角质酶 UtCut 催化合成己酸乙酯的影响

Fig.5 Effect of enzyme dosage on the synthesis of ethyl caproate by UtCut

注：催化反应在 35 ℃进行。

进一步考察了反应温度对角质酶 UtCut 催化合成己酸乙酯的影响。角质酶 UtCut 的最适温度为 35 ℃，当温度为 30~35 ℃时，UtCut 合成己酸乙酯的酯化率为 100%，当温度大于 40 ℃时，己酸乙酯的酯化率降低（图 6）。

短链脂肪酸酯因其独特的果香味而广泛应用于食品和香料行业[16]。角质酶对短链底物具有偏好性，因此该酶在合成短链脂肪酸酯方面具有优势[18]。UtCut 对脂肪酸链长为 4~8 的乙酯催化效率较高，酯化率大于 93%，而对更长和更短链长的脂肪酸乙酯催化效率相对较低（图 4）。该结果与嗜热裂孢菌[11]来源的角质酶相似，比轮状镰刀菌角质酶[39]和伯克霍尔德菌（*Burkholderia cepacia*）角质酶[12]的底物选择范围更宽。己酸乙酯是一种具有强烈果香的特色风味化合物，同时它对白酒的品质和风味具有重要作用[13]。UtCut 对己酸乙酯有显著的合成效果，在 35 ℃、加酶量 25 U·mL^{-1} 的条件下己酸乙酯的酯化率达到了 100%（图 5），高于嗜热裂孢菌[11]和伯克霍尔德菌[12]来源的角质酶合成效果。本研究中 UtCut 合成己酸乙酯的加酶量（25 U·mL^{-1}）远低于太瑞斯梭孢壳霉（440 U·mL^{-1}）[18]和腐皮镰刀菌（480 U·mL^{-1}）[17]等来源的角质酶，是目前报道的加酶量最少，且催化合成己酸乙酯得率最高的角质酶。此外，UtCut 催化合成己酸乙酯的效率与化学合成法（93.5%）相当，但化学合成存在反应条件极端（573 K，＞1 atm）和产物纯度低（易发生皂化反应）等问题[40]，因此本研究的方法具有显著优势。UtCut 催化合成己酸乙酯的最佳温度为 30~35 ℃，较高的温度会导致己酸乙酯的酯化率降低（图 6）。在太瑞斯梭孢壳霉[6]和红球菌[7]来源的角质酶中也出现了类似结果，这主要是由于 UtCut 是一个适冷酶，在温度较高时热稳定性降低。本研究中角质酶 UtCut 能高效合成短链脂肪酸酯，在风味酯生产行业具有很大的应用潜力。

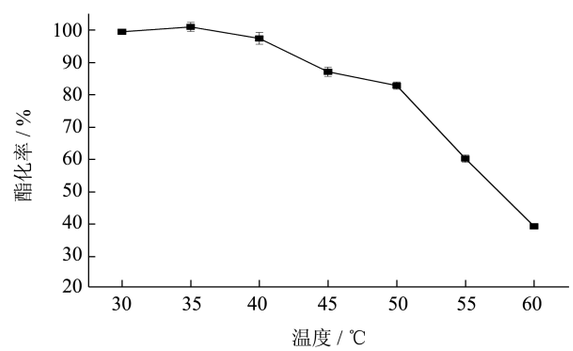


图 6 反应温度对角质酶 UtCut 催化合成己酸乙酯的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the synthesis of ethyl caproate by UtCut

注：催化反应加酶量为 25 U·mL^{-1}，反应时间 16 h。

3 结论

本研究从橘色梅泽氏菌中发掘了一个新型的角质酶基因并在大肠杆菌中成功表达。重组角质酶 UtCut 是一个新型适冷酶，其最适 pH 值和最适温度分别为 pH 值 8.0 和 35 ℃，该酶在 pH 值 6.0~8.5 和 35 ℃以下保持稳定。在最佳条件下，即反应温度 35 ℃、加酶量 25 U·mL^{-1}，UtCut 催化合成己酸乙酯的酯化率为 100%，对链长为 4~8 的脂肪酸乙酯合成效果大于

93%。本研究有望为角质酶在合成风味酯中的应用提供一定的理论基础和应用指导。

参考文献

[1] LIANG X H, ZOU H B. Biotechnological application of cutinase: A powerful tool in synthetic biology [J]. SynBio, 2023, 1(1): 54-64.

[2] LU M Y, LIANG F, LIU L J, et al. Functional characterization of cutinase genes NsCut1-NsCut4 in *Neostagonosporella sichuanensis* and their effects on fishscale bamboo [J]. Frontiers in Plant Science, 2025, 16: 1564651.

[3] JEON H R, MOON S H, YANG Y J. Enhanced thermal and catalytic properties of modified *Thielavia terrestris* cutinase for plastic biodegradation [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2025(11): 13.

[4] OLIVERIA C T D, ASSIS M A D, ANTONIO M M. Production of recombinant cutinases and their potential applications in polymer hydrolysis: The current status [J]. Process Biochemistry, 2023, 134(P2): 30-46.

[5] REZAEI Z, MOGHIMI H, KUKOL A. Comparison of polyethylene terephthalate (PET) degrading cutinases from bacteria and fungi: Structural characterization and molecular docking analysis [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2025, 197(9): 1-21.

[6] XU H B, YAN Q J, DUAN X J, et al. Characterization of an acidic cold-adapted cutinase from *Thielavia terrestris* and its application in flavor ester synthesis [J]. Food Chemistry, 2015, 188: 439-445.

[7] JEON W Y, SONG M H, LEE Y K, et al. Synthesis of isoamyl fatty acid ester, a flavor compound, by immobilized *Rhodococcus* cutinase [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 34(6): 1-9.

[8] PASHA M K, DAI L M, LIU D H, et al. Biodiesel production with enzymatic technology: Progress and perspectives [J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2021, 15(5): 1526-1548.

[9] WANG H Z, ZHANG T R, CHEN K X, et al. Biochemical characterization and polyester-binding/degrading capability of two cutinases from *Aspergillus fumigatus* [J]. Microorganisms, 2025, 13(5): 1121.

[10] MUAZU A S, COBELLI P, WANGSOMBOONDEE T. Optimization of *Metarhizium koreanum* MN031-Mt 46: Nutritional supplementation to improve conidia and cuticle-degrading enzyme production by solid-state fermentation [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2025, 35: e2412079.

[11] SU L Q, HONG R Y, GUO X J, et al. Short-chain aliphatic ester synthesis using *Thermobifida fusca* cutinase [J]. Food Chemistry, 2016, 206: 131-136.

[12] DUTTA K, DASU V V. Synthesis of short chain alkyl esters using cutinase from *Burkholderia cepacia* NRRL B2320 [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 72(3): 150-156.

[13] WANG J B, LIU Z W, WANG X, et al. Optimizing Baijiu fermentation with high-yield ethyl caproate-producing *Candida parapsilosis* strain [J]. LWT, 2024, 203: 116347.

[14] SEOKJAE W, HAN J Y, KWOUN H K. Synthesis of short-chain alkyl butyrate through esterification reaction using immobilized *Rhodococcus* cutinase and analysis of substrate specificity through molecular docking [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 33(2): 1-9.

[15] ALEJANDRO M, SERGI M. Cutinases: Characteristics and insights in industrial production [J]. Catalysts, 2021, 11(10): 1194.

[16] BIAN Y R, ZHANG Y, WANG T S, et al. Insights into the enzymatic synthesis of alcoholic flavor esters with molecular docking analysis [J]. LWT, 2024, 200: 116206.

[17] DE BARROS D P C, FONSECA L P, FERNANDES P, et al. Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 60(3): 178-185.

[18] DUAN X J, JIANG Z Q, LIU Y, et al. High-level expression of codon-optimized *Thielavia terrestris* cutinase suitable for ester biosynthesis and biodegradation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 768-775.

[19] 段晓杰.太瑞斯梭孢壳霉和樟绒枝霉酯酶的高效表达、性质及应用研究[D].北京:中国农业大学,2018.

[20] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.

[21] XIANG M, WANG L, YAN Q J, et al. Heterologous expression and biochemical characterization of a cold-active lipase from *Rhizopus microsporus* suitable for oleate synthesis and bread making [J]. Biotechnology Letters, 2021, 43(9): 1-12.

[22] DUAN X J, LIU Y, YOU X, et al. High-level expression and characterization of a novel cutinase from *Malbranchea cinnamomea* suitable for butyl butyrate production [J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10(1): 223.

[23] SANTOS-BENEIT F, CHEN LM, BORDEL S, et al. Screening enzymes that can depolymerize commercial biodegradable polymers: Heterologous expression of *Fusarium solani* cutinase in *Escherichia coli* [J]. Microorganisms, 2023, 11(2): 328.

[24] CHEN S, TONG X, WOODARD R W, et al. Identification and characterization of bacterial cutinase [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(38): 25854-25862.

[25] OLIVEIRA C T D, ASSIS M A D, CAIRO J P L F, et al. Functional characterization and structural insights of three cutinases from the ascomycete *Fusarium verticillioides* [J]. Protein Expression and Purification, 2023, 216: 106415.

[26] LAURA V, MARÍA R O, ARTURO G, et al. Expression of a cutinase of *Moniliophthora roreri* with polyester and PET-plastic residues degradation activity [J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(3): e0097621.

[27] HUANG T, ZHANG J Y, DONG X N, et al. Discovery of two novel cutinases from a gut yeast of plastic-eating mealworm for polyester depolymerization [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(4): e0256224.

[28] AL-TAMMAR A K, OMAR O, MURAD A M A, et al. Expression and characterization of a cutinase (AnCUT2) from *Aspergillus niger* [J]. Open Life Sciences, 2016, 11(1): 29-38.

[29] HEGDE K, VEERANKI V D. Production optimization and characterization of recombinant cutinases from *Thermobifida fusca* sp. NRRL B-8184 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(3): 654-675.

[30] RAVI J, PONNURAJ K, RAGUNATHAN P. Enzymatic biodegradation of Poly(ε-Caprolactone) (PCL) by a thermostable cutinase from a mesophilic bacteria *Mycobacterium marinum* [J]. Science of the Total Environment, 2025, 972: 179066.

[31] SCHELL K, GÖBBELS S, PASTOR L, et al. Cutinases for biocatalytic polycarbonate hydrolysis: Empowering circular economy [J]. ChemSusChem, 2025, 18(17): e202500944.

[32] WON S J, YIM J H, KIM H K. Functional production, characterization, and immobilization of a cold-adapted cutinase from *Antarctic Rhodococcus* sp. [J]. Protein Expression and Purification, 2022, 195-196: 106077.

[33] GU S F, LIU C J, ZHANG W J, et al. Characteristics of a recombinant *Fusarium verticillioides* cutinase and its effects on enzymatic hydrolysis of rice straw [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 171: 382-388.

[34] HONG R Y, SUN Y R, SU L Q, et al. High-level expression of *Humicola insolens* cutinase in *Pichia pastoris* without carbon starvation and its use in cotton fabric bioscouring [J]. Journal of Biotechnology, 2019, 304: 10-15.

[35] KONTKANEN H, WESTERHOLM-PARVINEN A, SALOHEIMO M, et al. Novel *Coprinopsis cinerea* polyesterase that hydrolyzes cutin and suberin [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(7): 2148-2157.

[36] NYYSSÖLÄ A, PIHLAJANIEMI V, HÄKKINEN M, et al. Cloning and characterization of a novel acidic cutinase from *Sirococcus conigenus* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(8): 3639-3650.

[37] BISCHOFF F, LITWIŃSKA K, CORDES A, et al. Three new cutinases from the yeast *Arxula adeninivorans* that are suitable for biotechnological applications [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(16): 5497-5510.

[38] SEMAN W M, BAKAR S A, BUKHARI N A, et al. High level expression of *Glomerella cingulata* cutinase in dense cultures of *Pichia pastoris* grown under fed-batch conditions [J]. Journal of Biotechnology, 2014, 184: 219-228.

[39] PARMARS A S, RAHIK D K, RANA A. Purification and characterization of cutinase from *Fusarium verticillioides* and its application in butyl valerate ester synthesis [J]. ChemistrySelect, 2025, 10(9): e202405624.

[40] D'AMBROSIO V, MARTINEZ G, JONES E, et al. Ethyl hexanoate rich stream from grape pomace: A viable route to obtain fine chemicals from agro by-products [J]. Separation and Purification Technology, 2023, 309: 123100.