

γ -kokumi肽及其合成酶 γ -谷氨酰转肽酶的研究进展

伍圆明¹, 伍伦杰¹, 王 莉¹, 林 璐¹, 刘 义¹, 孙伟峰², 丁文武^{1,*}

(1.西华大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610039; 2.衡阳师范学院生命科学与环境学院, 湖南 衡阳 421008)

摘要: Kokumi是第6种基本味觉候选之一, 添加到食物中能增强味道的浓厚感、饱满感、持续性及协调性, 其相关增味产品具有巨大的开发价值和市场前景。Kokumi物质中重要的一类是具有kokumi味的 γ -谷氨酰肽, 称为 γ -kokumi肽, 由 γ -谷氨酰基及氨基酸/多肽两部分组成, 可通过具有转肽活性的 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, GGT)合成。因此, 本文对 γ -kokumi肽结构特征、食物来源、呈味评价方法、制备方法、GGT结构特征、催化机理及合成 γ -kokumi肽的生产应用等方面进行了综述, 以期为 γ -kokumi肽相关增味产品的开发以及GGT酶法合成提供一定的参考。

关键词: γ -kokumi肽; 结构特征; γ -谷氨酰转肽酶; 酶法合成

Recent Advances in γ -Kokumi Peptide and Its Synthetase γ -Glutamyl Transpeptidase

WU Yuanming¹, WU Lunjie¹, WANG Li¹, LIN Lu¹, LIU Yi¹, SUN Weifeng², DING Wenwu^{1,*}

(1. School of Food and Biotechnology, Xihua University, Chengdu 610039, China;

2. College of Life Science and Environment, Hengyang Normal University, Hengyang 421008, China)

Abstract: Kokumi is one of the sixth basic taste candidates, whose addition to food can enhance the thickness, mouthfulness, continuity and harmony of taste. As a result, kokumi-related flavor products have a great potential to be developed and marketed. γ -Glutamyl peptides with kokumi flavor are an important class of kokumi substances, also called γ -kokumi peptides, composed of γ -glutamyl and amino acid/polypeptide, which could be synthesized by γ -glutamyl transpeptidase (GGT). In this paper, the structural characteristics and food sources of γ -kokumi peptides and the methods used for their taste evaluation and preparation, as well as the structural characteristics, catalytic mechanism and application for the synthesis of γ -kokumi peptides of GGT are reviewed, which will provide a basis for the development of γ -kokumi peptide-related flavor products and their enzymatic synthesis with GGT.

Keywords: γ -kokumi peptides; structural characteristics; γ -glutamyl transpeptidase; enzymatic synthesis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190127-352

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2020) 05-0256-10

引文格式:

伍圆明, 伍伦杰, 王莉, 等. γ -kokumi肽及其合成酶 γ -谷氨酰转肽酶的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(5): 256-265.
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190127-352. <http://www.spkx.net.cn>

WU Yuanming, WU Lunjie, WANG Li, et al. Recent advances in γ -kokumi peptide and its synthetase γ -glutamyl transpeptidase[J]. Food Science, 2020, 41(5): 256-265. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190127-352. <http://www.spkx.net.cn>

随着生活质量水平的提高和个体饮食习惯的差异化发展, 食品的味道和质量受到了越来越多的关注, 人

们对食物味道的需求不再局限于单一的基本味觉体验, 还更多地追求丰富的味觉体验及幸福愉悦的味道, 而

收稿日期: 2019-01-27

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31601418); 四川省科技厅应用基础项目(2019YJ0390);

衡阳师范学院人才引进项目(18D14); 四川省教育厅项目(15ZB0126)

第一作者简介: 伍圆明(1994—)(ORCID: 0000-0001-9765-0381), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。

E-mail: 905291021@qq.com

*通信作者简介: 丁文武(1980—)(ORCID: 0000-0003-0527-0109), 男, 副教授, 博士, 研究方向为传统调味品发酵。

E-mail: swgc@mail.xhu.edu.cn

使人感到回味无穷、浓郁持久和极富层次感的浓厚味(kokumi)能极大程度地满足这一需求。因此,在食品调味品领域中,kokumi已然成为了一个研究热点。

Kokumi是继五大基本味觉酸、甜、苦、咸、鲜之后新提出的第6种基本味觉候选之一^[1],主要代表食物味道的浓厚感(thickness)、饱满感(mouthfulness)、持续性(continuity)及协调性(harmony of taste)^[2]。kokumi物质的特点是,当添加到基本的味道溶液或食物中时,它们会提升5种基本口味的协调性和呈味强度(特别是鲜味)。目前已报道的kokumi物质多数为短肽类^[3],而在多项关于kokumi肽鉴定的研究中发现,发酵食物中浓厚味的主要贡献者为 γ -谷氨酰多肽(γ -kokumi肽)^[4-11]并且与其他呈味分子,如寡糖、核苷酸等组合使用还能增强浓厚味、延长回味或提升鲜味强度,具有极大的开发价值和市场前景,因此,其生产应受到更多的关注。

γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, GGT, EC 2.3.2.2)具有将 γ -谷氨酰基转移至受体分子上的特异性催化功能^[12],可直接催化合成 γ -谷氨酰肽而受相关食品工业领域的广泛重视,并且GGT已经成功应用于L-茶氨酸等重要 γ -谷氨酰类化合物的生产中^[13-16],为 γ -kokumi肽的酶法生产提供了有力的参考。

因此,本文对 γ -kokumi肽结构特征、食物来源、呈味评价方法、制备方法及食品中的应用,以及GGT结构特征、转肽反应催化机理及合成 γ -kokumi肽的生产应用等方面进行了综述,加深对 γ -kokumi肽结构与呈味的关系、GGT结构与转肽活性的关系以及GGT合成 γ -kokumi肽的现状等科学和工程问题的认识,以期为新型 γ -kokumi肽的设计、 γ -kokumi肽大规模生产及相关肽类增味产品的开发提供一定的参考。

1 γ -kokumi肽概况

1.1 γ -kokumi肽的结构及特征

γ -kokumi肽是具有kokumi特征的 γ -谷氨酰肽,多为二肽或三肽。 γ -谷氨酰肽分子结构如图1a所示,谷氨酸在 α -C和 γ -C上都连接有一 COO^- 基团,当谷氨酸的 $\gamma\text{-COO}^-$ 与 γ -谷氨酰基受体(R基团)的 NH_3^+ 脱水缩合形成 γ 位肽键时,即产生了 γ -谷氨酰肽,其中R基团可以为多肽或者游离氨基酸。例如最常见的 γ -kokumi肽为谷胱甘肽(γ -Glu-Cys-Gly, GSH),其结构由 γ -谷氨酰基与二肽-Cys-Gly组成(图1b)。

γ -kokumi肽的结构与其浓厚味强度密切相关。 γ -kokumi肽N末端的 γ -谷氨酰基是其呈浓厚味的关键基团,Yusuke等^[18]筛选二肽库发现大多数 γ -谷氨酰基二肽(γ -Glu-X)具有浓厚味活性,而 α -Glu-X几乎都无浓厚

味活性,三肽中也有类似的结论。 γ -kokumi肽中间残基和C-末端同样对其浓厚味具有重要影响,当中间残基为中等大小的不带电、非极性脂肪族残基时(如Val、Leu等),表现出更高的浓厚味强度;C-末端残基的结构对呈味影响相对较小,但其优选为无侧链的Gly时,可进一步提升 γ -kokumi肽浓厚味^[18-19]。此外,残基的侧链中有含硫基团也有助于提升 γ -kokumi肽浓厚味强度^[19]。这些关于肽结构与呈味的关系的结论将为新型 γ -kokumi肽的设计提供新的思路。

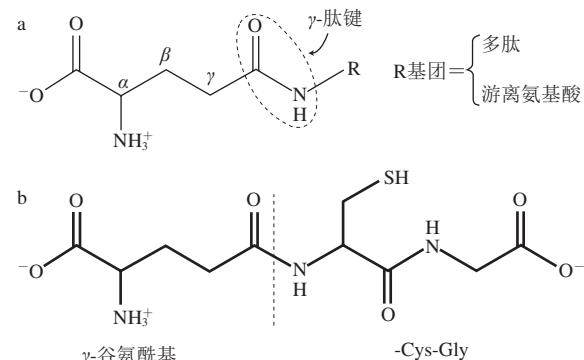


图1 γ -谷氨酰肽(a)及谷胱甘肽(b)^[17]分子结构式

Fig. 1 Molecular structures of γ -glutamyl peptides (a) and glutathione (b)^[17]

1.2 γ -kokumi肽的来源

目前,大多数的 γ -kokumi肽都是从常见的发酵食品、调味品或海鲜产品中分离鉴定获得(表1)。1990年,Ueda等^[20]从大蒜中分离获得赋予浓厚味的物质,鉴定结果表明大蒜中浓厚味的主要贡献者为 γ -谷氨酰肽,包括GSH和 γ -谷氨酰基-S-烯丙基-L-半胱氨酸(γ -Glu-S-allyl-Cys)等。随后,Ueda等^[21]又从洋葱中分离鉴定出新的浓厚味物质 γ -谷氨酰基-S-(1-丙烯基)-半胱氨酸亚砜。近年来,对菜豆^[4]、Gouda干酪^[22]等存在kokumi味道的成分分析发现, γ -kokumi肽物质是其主要的味道提供者。Kuroda^[6,23-24]和Miyamura^[7,25-26]等陆续在商业鱼酱、加工扇贝、酱油、酿造酒精饮料等食品中检测鉴定获得一种典型的 γ -kokumi肽—— γ -Glu-Val-Gly,并指出该肽对发酵食品感官品质具有显著影响^[27];后续的食品增味实验结果也表明, γ -Glu-Val-Gly添加到低脂食品或鸡肉清汤中能明显提升其味道的饱满感和持续性^[9,27]。Zhao等^[28]也在发酵的酸面团中鉴定出6种 γ -kokumi肽(表1),这些肽是面团浓厚感味的关键成分。最近,研究人员逐渐开始关注 γ -kokumi肽的酶法合成,Yang Juan等^[29-30]通过生物酶催化方法合成了多种系列的 γ -kokumi肽,分别有 γ -[Glu]_(n=1,2,3,4,5)-Phe、 γ -[Glu]_(n=2,3,4)-Val和 γ -[Glu]_(n=2,3,4)-Met,这些 γ -kokumi肽都展现出浓厚的味道,并且能有效增强酱油的鲜味和连续性,以及鸡肉清汤的浓厚感和饱满感。

越来越多的 γ -kokumi肽从不同的风味食物中被鉴定获得,并陆续地被验证能赋予食物浓厚感、饱满感、

持续性等口感特性，展现出非常强的增味能力；因此， γ -kokumi肽具有进一步开发成相关肽类食品风味增强剂的巨大潜力。

表 1 γ -kokumi肽的序列及来源
Table 1 Sequences and sources of γ -kokumi peptides

γ -kokumi肽	来源	参考文献
γ -Glu-Cys-Gly (GSH)	大蒜、洋葱、酵母提取物	Ueda等 ^[20-21]
γ -Glu-S-allyl-Cys	大蒜、酶合成	Ueda ^[20] 、Speranza ^[31] 等
γ -Glu-S-(1-propenyl)-cysteine sulfoxide	洋葱	Ueda等 ^[21]
γ -Glu-Val	菜豆、化学合成、发酵面团、酶合成	Dunkel ^[4] 、Ohsu ^[32] 、Zhao ^[28] 、Suzuki ^[33] 等
γ -Glu-Leu	菜豆、奶酪、发酵面团、酶合成	Dunkel ^[4] 、Toelstede ^[32] 、Zhao ^[28] 、Lee ^[34] 等
γ -Glu-Cys- β -Ala	菜豆	Dunkel等 ^[4]
γ -Glu-Glu	奶酪、发酵面团	Toelstede ^[22] 、Zhao ^[28] 等
γ -Glu-Gly	奶酪	Toelstede等 ^[22]
γ -Glu-Gln	奶酪	Toelstede等 ^[22]
γ -Glu-Met	奶酪、化学合成、发酵面团、酶合成	Toelstede ^[22] 、Ohsu ^[32] 、Zhao ^[28] 、Speranza ^[31] 等
γ -Glu-His	奶酪	Toelstede等 ^[22]
γ -Glu-Ile	发酵面团	Zhao等 ^[28]
γ -Glu-Tyr	大豆	Shibata等 ^[11]
γ -Glu-Phe	大豆、发酵面团、酶合成	Shibata ^[11] 、Zhao ^[28] 、Suzuki ^[33] 等
γ -Glu-Ala	化学合成	Ohsu等 ^[32]
γ -Glu-Cys	化学合成	Ohsu等 ^[32]
γ -Glu-Abu-Gly	化学合成	Ohsu等 ^[32]
γ -Glu-Cys-Gly	化学合成	Ohsu等 ^[32]
γ -Glu-Val-Gly	奶酪、鱼酱、扇贝、酱油、啤酒、清酒、化学合成	Kuroda ^[6,23-24] 、Miyamura ^[7,25] 、Speranza ^[31] 、Suzuki ^[33] 等
γ -[Glu] _(n=1,2,3,4,5) -Phe	酶合成	Yang Juan等 ^[29]
γ -[Glu] _(n=2,3,4) -Val	酶合成	Yang Juan等 ^[30]
γ -[Glu] _(n=2,3,4) -Met	酶合成	Yang Juan等 ^[30]

1.3 γ -kokumi肽的呈味评价方法

目前对 γ -kokumi肽的呈味评价方法通常为感官评价法和钙敏感受体（calcium-sensing receptor, CaSR）活性检测法。

感官评价法因简便、迅速、准确分析样品的优点，被广泛用作于呈味肽呈味效果的测定^[36]。 γ -kokumi肽的感官评价测定不同于基本味觉酸、甜、苦、咸、鲜肽的测定方式，原因在于自身的水溶液基本上不存在味道或者呈味效果较低，但是只需要少量添加至鲜味物质（如谷氨酰胺钠）中，即可显著降低其鲜味阈值并提升鲜味溶液的连续性和口感。因此在采用感官评价法评价 γ -kokumi肽的阈值时，将实验品按照一定浓度梯度稀释添加到基本的酸、甜、苦、咸、鲜的感官标准的单一溶液或者是混合液，按照一定标准进行打分，再根据统计学分析得出最终的感官评价结果。但是由于kokumi味物质的呈味的复杂性，使用感官评价法难以满足定量准确的检测，因此需要寻找更精确的检测方式。

近年来，CaSR活性检测法作为一种新型 γ -kokumi肽的检测方法逐渐受到学者的关注^[37-38]。CaSR作为

人体感知kokumi物质受体，与基本味觉的受体有味觉信号功能偶联性。Brennan等^[39]对kokumi类物质的信号传递做出以下猜想：CaSR在接收到kokumi物质受体时，接收刺激释放Ca²⁺增加胞内浓度，产生一系列的味觉信号传导，如增加ATP释放加强接收鲜味物质的信号，从而达到降低鲜味物质阈值的效果。Ohsu等^[38]合成一系列 γ -谷氨酰肽，采用CaSR结合感官评价检测法检测kokumi呈味效果，结果表明经过感官验证确定的 γ -kokumi肽均能激活CaSR，且呈味阈值的高低与激活CaSR的激活力密切相关。后来，Yusuke^[18]和Kuroda^[40]等进一步研究了CaSR的感应机制，检测了一系列人工合成的 γ -kokumi肽，结合感官评价验证，发现 γ -kokumi肽的阈值越低，刺激CaSR释放Ca²⁺的能力越强。由此表明CaSR活性检测法可作为一种新型 γ -kokumi肽的检测方式。但是CaSR方法检测存在一定局限性，因为CaSR易受到某些阳离子、碱性肽类和多胺类物质的刺激释放Ca²⁺导致检测结果的不准确性^[41-42]。因此CaSR活性检测法通常是与感官评价法共同使用对kokumi物质进行检测。

1.4 γ -kokumi肽的制备

尽管 γ -kokumi肽具有非常强的增味功能，但是市场上 γ -kokumi肽类食物增味剂非常少，仅有GSH或富含GSH的酵母提取物成功商业化并用于增强食物的浓厚味^[43-45]，其中最重要的一个原因是 γ -kokumi肽的大规模生产能力较低。目前制备 γ -kokumi肽方法主要有化学合成、微生物发酵和酶法合成。

化学合成法以简单底物作为原料进行合成 γ -kokumi肽，例如Yusuke等^[18]通过N- α -苯氧羰基保护 γ -谷氨酰基并逐个地将Glu、Val、Gly残基缩合到主链制备 γ -Glu-Val-Gly，最终得率为54%，但化学合成由于反应途径长、基团修饰操作复杂、成本高、化学物毒性等问题，不适用于 γ -kokumi肽的工业化水平大规模生产。由于当前大部分 γ -kokumi肽来源于发酵风味食品，传统的微生物发酵也是获得 γ -kokumi肽浓厚味物质有效选择之一。然而目前常见的发酵风味食品都是传统的固态发酵，存在时间长、产量低、纯化难，工业化难度较高等问题，仅有少许 γ -kokumi肽，如GSH通过液态发酵实现了大规模生产，且优化发酵工艺提高了其产量^[46]，但产物分离纯化难等问题亟待解决。酶法合成是通过生物酶催化合成 γ -kokumi肽。文献中已报道的酶主要有两种：1) 谷氨酰胺酶（EC 3.5.1.2）。该酶具有一定的 γ -谷氨酰基转移活性^[47-48]，有少数学者通过谷氨酰胺酶合成 γ -kokumi肽，用于提升食物风味^[29-30,49]。但谷氨酰胺酶受体的底物特异性较差， γ -谷氨酰基转移活性较低，难以用于 γ -kokumi肽的工业化生产。2) GGT。GGT属于转移酶而不是合成酶，它不需要ATP等能量来源，并且酶活力较高，具有大规模

生产 γ -kokumi肽的应用前景。关于GGT转肽催化生产重要 γ -谷氨酰类化合物如：*L*-茶氨酸、 γ -谷氨酰-多巴等^[13-15]的研究已经比较成熟，为GGT催化生产 γ -kokumi肽提供了强有力的参考。

综上所述，在 γ -kokumi肽的制备中，由于化学合成的步骤复杂、成本高以及传统发酵法的产量低、纯度低等缺点，酶法合成被视为一种有效的、低成本的生产手段。其中，GGT因具有较强的转肽活性而在 γ -谷氨酰类化合物的合成中备受重视，使用GGT生产 γ -kokumi肽将有效促进 γ -kokumi肽的生产及在食品调味中的应用。

2 γ -kokumi肽合成酶GGT

2.1 GGT的来源及结构分析

GGT也称“谷氨酰基转移酶”或“谷酰转肽酶”，从20世纪中叶开始，人们从细菌、植物、动物中相继发现GGT，如奇异变形杆菌（*Proteus mirabilis*, *Pm*）GGT^[50]、大肠杆菌（*Escherichia coli*, *Ec*）GGT^[51]、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*, *）GGT^[52]、幽门螺旋杆菌（*Helicobacter pylori*, *Hp*GGT）^[53]、地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*, *Bl*）GGT^[54]和解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*, *Ba*）GGT^[55]、洋葱和老鼠、牛、马、人（human GGT, *HGGT*）的肝、肾、胰提取物等^[50,56]。GGT在原核生物和真核生物的分布情况具有一定的差异性，真核生物中GGT定位于细胞膜，原核生物中则分布在周质空间或者被分泌到细胞外^[57-58]。正是由于这种分布的差异性，原核生物来源的GGT更便于提取和纯化，因此在工业生产中主要采用原核来源的GGT进行生产 γ -谷氨酰基化合物，如采用*Ec*GGT酶法合成 γ -谷氨酰类化合物茶氨酸^[51,59]，或将*Bs*GGT添加到“moromi”半固态发酵发酵液中可提升成品的醇厚滋味感^[60]。*

随着科学技术的发展，蛋白质结晶技术得到了全新的突破，蛋白质结构解析的分辨率越来越高，有助于深入理解蛋白结构和功能之间的关系。近年来，多个研究团队解析了不同来源的GGT晶体结构，以期从接近原子水平的精密结构解释其生化特性存在的差异性。对蛋白质结构数据库中的GGT序列比对（图2）和结构比对（图3）分析发现，根据活性中心区域空间构象的不同可以分成两类。

第一类为带有“活性开关装置”活性中心的GGT，如*HGGT*（PDB: 4Z9O）^[61]、*Hp*GGT（PDB: 2QM6）^[62]、*Ec*GGT（PDB: 2DBU）^[63]等。以*Ec*GGT活性中心结构为例（图3a），其活性中心是一个有“封口的口袋”，该结构的形成是由于：GGT自裂解催化过程中，位于活性中心的*Ec*GGT的大亚基C末端尾氨基酸（第375~390位）围绕Ile378发生偏转，并远离小亚基N端Thr 30Å以上。

空出来的区域形成一个能够接受 γ -谷氨酰化合物的活性口袋，并且活性口袋的上方存在大部分真核细胞中才会存在的“盖子-突环”结构（lid-loop）^[64]，该loop结构柔性较大，形成一个活性开关装置，控制着底物和产物进出的速率。第二类为“开放式”活性中心GGT，如*Bs*GGT（PDB: 3A75）^[64]和*B/GGT*（PDB: 4OTT）（图3b）^[65]等。与第一类GGT活性中心区别在于，这类GGT在自在酶自成熟的过程中大亚基的C末端尾在成熟前后没有发生偏移构象的改变，位于小亚基的N端附近，并且在活性中心上方不存在lid-loop结构，从而形成开放式活性中心结构。

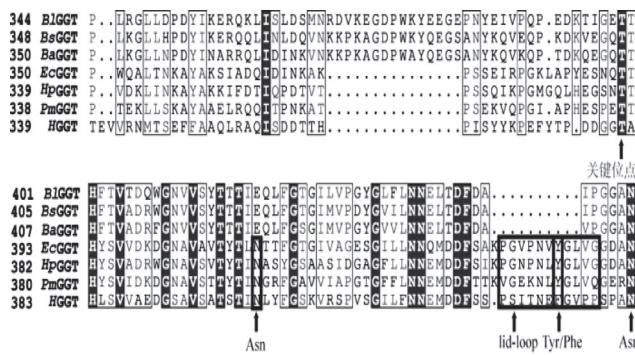


图2 不同来源GGT序列比对^[50-55,61]
Fig. 2 Alignment of GGT sequences from different sources^[50-55,61]

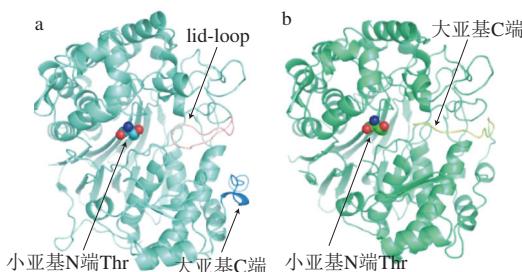


图3 *Ec*GGT (a) 和 *B/GGT* (b) 的三维结构差异

Fig. 3 Three-dimensional structural differences between
*Ec*GGT (a) and *B/GGT* (b)

对GGT活性中心及周边区域分析发现，存在活性中心上方的lid-loop结构起着隔离活性中心和外部环境的作用，在酶催化反应过程中作为底物和产物进出的开关^[62]。而控制lid-loop结构灵活的关键性氨基酸为盖环顶点处的芳香族氨基酸^[62,66]。原核生物以*Ec*GGT为例（图4a），lid-loop上保守的Tyr444上的酚羟基与保守的Asn411的侧链酰胺官能团形成氢键保持lid-loop的空间位置，从而起到保护活性中心的功能^[67]。而*HGGT*的酶活力高于原核生物来源的GGT，原因在于lid-loop中心处*Ec*GGT Tyr444所对应的氨基酸残基为Phe433，该残基不存在酚羟基，因此不能形成氢键（图4b），这样增加了lid-loop的灵活性，有利于底物的进入和产物的释放^[68]。

Terzyan等^[61]对HGGT进行结晶进一步证明HGGT不含上述可以固定lid-loop结构的氢键(图4b)，从而导致HGGT的lid-loop柔性较高，具有高迁移率。Calvio等^[69]也对lid-loop结构的作用进行进一步探究，将EcGGT上的lid-loop结构通过基因设计到BsGGT中，在突变体BsGGT催化反应过程中，lid-loop结构展现出优先允许小分子 γ -谷氨酰底物进入酶的活性中心而大分子后进入的调控功能，并且突变后BsGGT的酶活力和稳定性比原酶显著提升，酶稳定性增高的原因可能是lid-loop结构对活性中心有一定的保护作用。以上的研究发现有助于选择用于生产 γ -kokumi肽及其他 γ -谷氨酰化合物为目的产物的GGT，还为设计具有高酶活力的突变体GGT提供一定参考意见。

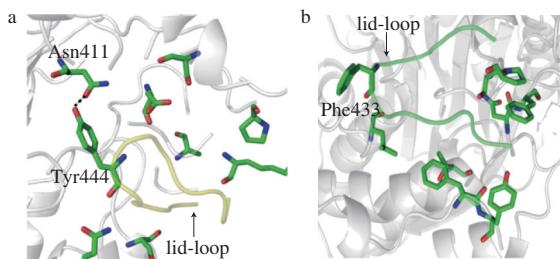


图4 EcGGT (a)^[63]和HGGT (b)^[61]的lid-loop结构差异
Fig. 4 Lid-loop structural differences between EcGGT (a)^[63] and HGGT (b)^[61]

2.2 GGT的成熟机制

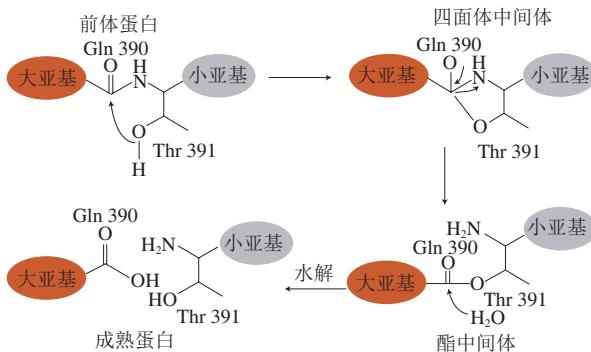


图5 EcGGT自催化剪切过程^[63]
Fig. 5 Autocatalytic cleavage process of EcGGT^[63]

GGT属于N末端亲核水解酶家族的成员之一，这类酶家族成员的共同特点是：转录翻译生成的前体蛋白没有酶活力，需要激活N端的Ser或者是Thr进行自催化裂解后才能产相应酶活力，称为自催化裂解成熟机制^[63,70-71]。在GGT的自催化裂解过程中，其关键氨基酸为小亚基N端高度保守的Thr^[63,72]。Okada等^[63,73]使用Ala将EcGGT小亚基N端Thr取代，获得的突变体T391A在形成二聚体过后没有酶活力，Pica^[74]、Murty^[75]、Kristin^[76]等采用类似的方法对B₁GGT、BsGGT等不同来源的GGT进行突变实验

证，也得到相同的结果。以上研究表明小亚基N端的Thr对GGT自催化裂解反应起着关键性的作用。GGT自催化裂解具体过程如图5所示，GGT基因首先通过转录翻译形成前体蛋白，小亚基N端的Thr作为亲核试剂进攻大亚基C端的羧基形成过渡状态的四面体中间体，Thr上的氨基通过质子化裂解C—N形成酯中间体，最后细胞基质中的水作为活性剂进攻中间体的羰基，前体蛋白裂解成为二聚体。二聚体的大亚基分子质量通常为38~72 kDa，小亚基的分子质量为20~66 kDa。

2.3 GGT的催化机理

小亚基N端高度保守的Thr不仅是GGT前体蛋白自催化裂解成熟的关键氨基酸，也是GGT催化反应中进攻底物的关键催化位点。GGT在催化反应属于乒乓反应机制，分为酰化反应和去酰反应两个步骤（图6）^[72,77-79]。酰化反应：首先是 γ -谷氨酰底物进入GGT的活性中心，GGT小亚基N端上的Thr羟基氧原子亲核进攻底物上 γ -谷氨酰的羧基肽，形成 γ -谷氨酰基-GGT中间体^[80]；去酰化反应^[12]：水、氨基酸或者多肽类（一般为二肽或者三肽）等作为亲核试剂物质进入GGT活性中心进攻 γ -谷氨酰基-GGT四面体中间体的羧基，中间体键断裂从而生成新的 γ -谷氨酰基化合物。根据去酰化亲和试剂的种类不同分为水解反应、转肽反应和自转肽反应。GGT反应类型与所处环境的pH值密切相关，水解反应在酸性或者中性条件下进行，而转肽反应在碱性条件下进行。

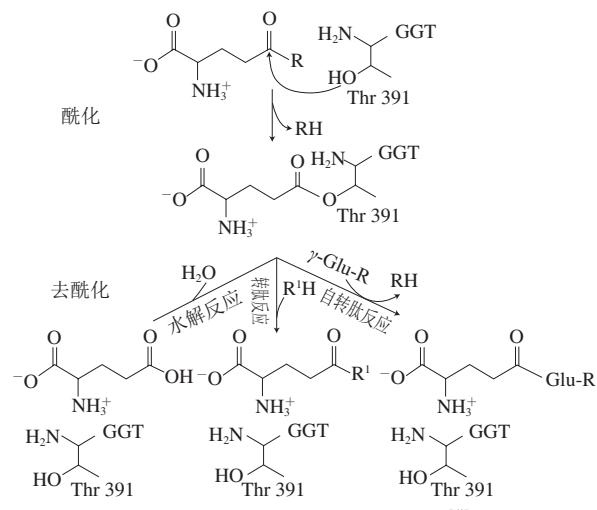


图6 GGT的催化机理及反应类型^[63]
Fig. 6 Catalytic mechanism and reaction type of GGT^[63]

2.4 GGT转肽反应的应用

目前已有报道表明，使用GGT可成功催化生产多种 γ -谷氨酰类化合物，如：*L*-茶氨酸、 γ -谷氨酰-多巴等^[13-15]，但是GGT在碱性条件下极易发生不可逆的变性失活，限制其在实际生产中的应用。彭清等^[15]发现GGT在高pH值下容易失活的原因是亚基解聚导致活性中心构象发生改变^[81]，为稳定GGT的亚基结构，在远离酶活性中心

的亚基表面选择合适的位点进行改造，增强亚基的疏水性能，最终得到稳定性较强的突变酶Y280V比原酶在高pH值下活力提高至58%以上。Keillor^[12]及Carlo^[82]等发现GGT在碱性条件下进行转肽反应时，自转肽反应也存在，这导致得到的产物产量和纯度较低。因此，在GGT工程化方面，如何降低自转肽反应的发生以及提高转肽反应效率从而提高产物量是当前亟待解决的重要问题。

最近，Lin Longliu^[65]、Lin Minguan^[83]等发现来源于地衣芽孢杆菌的*B/GGT*转肽酶活力较高，对其活性口袋中的关键位点和周围的氨基酸空间结构进行分析（图7），发现*B/GGT*活性中心结构由周围残基形成的氢键网络所固定，其中，构成氢键网络的保守残基Asn450对活性中心的稳定具有重要影响，对该点活性改造设计得到的突变体N450D不仅明显提高转肽反应的催化能力，还将转肽反应/水解反应比例从3.5最高提升到18。Bindal等^[84]对Arg109的定点突变研究发现，其带正电荷的侧链基团对底物的结合和自转肽催化至关重要，突变体R109K自转肽反应的活性降低，转肽反应合成茶氨酸效率得到了明显的提高。Pica^[74]、Nakajima^[85]和Chi Mengchun^[86]等则对Arg109在*B/GGT*活性中心的具体作用进行了研究，改造与活性中心Arg109侧链相互作用的Gly482和Gly482，酶的整体构象几乎没有发生改变，但是活性中心的Arg109空间位置发生较大偏移从而导致对酶活性产生了影响。由于GGT催化的相似性，其他来源的GGT可参考上述结果进行酶工程改造以提高转肽活性和降低自转肽反应活性，为生产 γ -kokumi肽提供良好的酶催化剂。

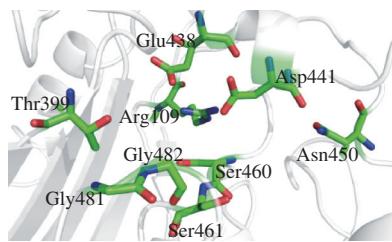


图7 *B/GGT*活性中心的关键残基^[65,74,83-84,86]

Fig. 7 Key residues in the active center of *B/GGT*^[65,74,83-84,86]

3 GGT合成 γ -kokumi肽的应用

3.1 GGT合成 γ -kokumi肽的优势

GGT具有独特转肽催化特性，对于 γ -谷氨酰类化合物特别是 γ -kokumi肽的工业化生产非常有意义。相较于其他合成方法，使用GGT作为生物酶催化剂生产 γ -kokumi肽具有多方面的优势^[87]：1) 和化学合成法相比，GGT催化合成无需对氨基酸或其他活性基团进行基团保护和去保护操作，酶仅同 γ -谷氨酰基供体和受体相

互作用，反应过程简单；2) GGT属于转移酶而不是合成酶，进行催化时不需要ATP、金属阳离子等能量物质或辅助因子；3) GGT对 γ -谷氨酰基受体的底物特异性非常广泛，添加不同的受体即可生成相应的 γ -谷氨酰类化合物；4) 细菌来源的GGT以未糖基化修饰的可溶性蛋白形式存在于细胞的周质空间或胞外，因此细菌来源的GGT比较容易获得；5) 不同于哺乳动物来源的GGT，细菌来源的GGT转肽催化时能使用较廉价的 γ -谷氨酰基供体，如谷氨酰胺等，可有效地降低生产成本。

3.2 GGT合成 γ -kokumi肽实际应用

在21世纪之前， γ -谷氨酰肽的kokumi味性质未被广泛了解，GGT曾作为一种风味改善酶进行研究，证实该酶可改善食物的整体风味并能减弱苦味氨基酸的苦味^[35,88-89]。近10年来，对于GGT合成 γ -kokumi肽并改善食品风味的可行性研究报道逐渐增多。2009年，Toelstede等^[5]研究证明青霉菌(*Penicillium roqueforti*)来源的GGT直接参与了蓝色脉纹奶酪中 γ -kokumi肽的合成，对奶酪的浓厚味具有重要的贡献作用。Hillmann等^[10]也证实牛奶原料中的GGT是帕玛森芝士成熟过程中浓厚味物质—— γ -kokumi二肽形成的关键因素。类似地，van Ho等^[60]在日本发酵豆酱中添加*BsGGT*合成 γ -kokumi肽以提升豆酱的浓厚感味，结果表明 γ -Glu-Val和 γ -Glu-Val-Gly两种 γ -kokumi肽浓度分别提高到70 $\mu\text{mol/L}$ 和16 $\mu\text{mol/L}$ ，同时提升了产品的鲜味，增强了豆酱的风味。

GGT催化合成 γ -kokumi肽的能力得到验证后，研究人员逐步开始通过添加特异性 γ -谷氨酰基受体的方式用GGT催化合成特定的 γ -kokumi肽。Suzuki等^[35]以细菌来源的GGT为生物催化剂合成 γ -Glu-Phe，在Gln和Phe浓度200 mmol/L、酶活力0.5 U/mL、pH 10.4及温度37 °C的条件下反应1.5 h，最终 γ -Glu-Phe的产率为70%，远高于化学合成；随后，Suzuki等^[33]按照同样的方法，优化反应条件后，GGT催化合成 γ -Glu-Val的产率高达88%。2012年，Speranza等^[31]通过添加不同受体的方式成功合成了 γ -Glu-S-allyl-Cys和 γ -Glu-Met及其衍生物，但 γ -kokumi肽的产率较低，可能的原因是该实验中GGT来源于马肾，转肽反应活性较低。近些年，Lee^[34]、Chi Mengchun^[86]、Chen Yiyu^[90]等使用*B/GGT*逐步合成了 γ -Glu-S-allyl-Cys、 γ -Glu-Phe和 γ -Glu-Leu 3种 γ -kokumi肽，并通过条件优化提高这些肽的产量；值得注意的是，该团队还研究了*B/GGT*的固定化催化应用^[91]，通过共价键或非共价键的方式将*B/GGT*固定在氧化石墨烯纳米片上催化合成 γ -Glu-Phe和 γ -Glu-Leu，最终产物收率都超过31%，其中共价固定的GGT在30 d的储存期间具有与游离酶相当的酶稳定性，可以循环催化9次，9次使用后其酶活力约为初始酶活力的45.3%。另外，Suzuki等^[92]创新性地将谷氨酰胺酶和GGT组成双酶合成系统，添加到麦麸和大豆蛋白后高

效进行 γ -谷氨酰物水解反应和转肽反应，最终生产获得浓厚味较强的增味剂。总地来说，由于GGT具有以上诸多优点，利用GGT催化是合成 γ -kokumi肽的一种有效的、低成本的生产手段，并且结合酶工程改造、酶固定化催化及双酶合成系统等工程化策略能有效提高GGT生产能力，并降低生产成本，有助于酶法合成 γ -kokumi肽的工业化生产。

4 结语

前期关于 γ -kokumi肽结构特征、调味应用及酶法合成的研究取得了很多的进步，但仍然有许多科学及工程等方面的问题值得进一步研究。1) γ -kokumi肽的稳定性和安全性。由于 γ -kokumi肽的目标是开发相关肽类增味剂，在产品贮藏、消费以及食用过程中其稳定性和安全性应得到高度重视，相配套的食品准入门槛和定性、定量分析检测标准也需同步进行探索和研究。2) γ -kokumi肽的三维构象特征。关于 γ -kokumi肽二级结构与呈味的关系研究已经取得了较大的进展，但更为重要的三维构象特征未被清楚认识，而 γ -kokumi肽正是因为特殊的三维构象才能激活kokumi受体并传递信号，产生浓厚味；因此，应加强基于kokumi受体的 γ -kokumi肽三维结构特征分析，从分子层面理解 γ -kokumi肽呈味机制，也为新型 γ -kokumi肽的设计和挖掘提供参考。3) GGT合成 γ -kokumi肽的效率和产量还有待提高。目前文献已报道的GGT催化合成 γ -kokumi肽几乎都处于实验室级生产水平，还未找到同时满足高转化率、高产量、高强度的GGT，后续的研究可以通过筛选高活性的GGT和GGT酶工程改造，或结合液态发酵、固定化酶等工程化策略提高 γ -kokumi肽的合成效率和强度，同时加强生产工艺的研究提高其产量，为 γ -kokumi肽低成本、高产量的工业化生产提供基础。

虽然国内对于 γ -kokumi肽的研究起步较晚，但也有多个优秀的研究团队在开展相关工作，随着多方面问题的深入研究，会有更多的浓厚味增味剂出现在餐桌上，为我们创造更绿色、健康、美味的幸福生活。

参考文献：

- [1] 佚名. Kokumi味, 继传统五味后的第六味[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 341.
- [2] KURODA M, YAMANAKA T, MIYAMURA N. Change in taste and flavor of food during the aging with heating process. Generation of “Kokumi” flavor during the heating of beef soup and beef extract[J]. Japanese Journal of Taste and Smell Research, 2004, 11: 175-180. DOI:10.18965/tasteandsmell.11.2_175.
- [3] 曾贞, 江洪. 浓厚感物质的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 297-301. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201519054.
- [4] DUNKEL A, KSTER J, HOFMANN T. Molecular and sensory characterization of γ -glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(16): 6712-6719. DOI:10.1021/jf071276u.
- [5] TOELSTEDE S, HOFMANN T. Kokumi-active glutamyl peptides in cheeses and their biogeneration by *Penicillium roquefortii*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(9): 3738-3748. DOI:10.1021/jf900280j.
- [6] KURODA M, KATO Y, YAMAZAKI J, et al. Determination and quantification of the kokumi peptide, gamma-glutamyl-valyl-glycine, in commercial soy sauces[J]. Food Chemistry, 2013, 141(2): 823-828. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.03.070.
- [7] MIYAMURA N, KURODA M, KATO Y, et al. Determination and quantification of a kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine, in fermented shrimp paste condiments[J]. Food Science and Technology Research, 2014, 20(3): 699-703. DOI:10.3136/fstr.20.699.
- [8] LIU J, SONG H, LIU Y, et al. Discovery of kokumi peptide from yeast extract by LC-Q-TOF-MS/MS and sensomics approach[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(15): 3183-3194. DOI:10.1002/jsfa.7058.
- [9] MIYAKI T, KAWASAKI H, KURODA M, et al. Effect of a kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine, on the sensory characteristics of chicken consommé[J]. Flavour, 2015, 4(1): 17. DOI:10.1186/2044-7248-4-17.
- [10] HILLMANN H, BEHR J, EHRMANN M A, et al. Formation of kokumi-enhancing γ -glutamyl dipeptides in parmesan cheese by means of γ -glutamyltransferase activity and stable isotope double-labeling studies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(8): 1784-1793. DOI:10.1021/acs.jafc.6b00113.
- [11] SHIBATA M, HIROTSUKA M, MIZUTANI Y, et al. Isolation and characterization of key contributors to the “kokumi” taste in soybean seeds[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017, 81(11): 2168-2177. DOI:10.1080/09168451.2017.1372179.
- [12] KEILLOR J W, CASTONGUAY R, LHERBET C. Gamma-glutamyl transpeptidase substrate specificity and catalytic mechanism[J]. Methods in Enzymology, 2005, 401(8): 449-467. DOI:10.1016/S0076-6879(05)01027-X.
- [13] SUZUKI H, IZUKA S, MINAMI H, et al. Use of bacterial γ -glutamyltranspeptidase for enzymatic synthesis of γ -D-glutamyl compounds[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(11): 6399-6404. DOI:10.1128/AEM.69.11.6399-6404.2003.
- [14] 黄锋. *E. coli*与*B. subtilis* γ -谷氨酰基转移酶的重组表达及其催化合成L-茶氨酸的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016: 39-79.
- [15] 彭清, 姚忠, 周治, 等. 定点突变提高 γ -谷氨酰转肽酶的pH耐受性及催化活性[J]. 高校化学工程学报, 2016, 30(1): 133-141. DOI:10.3969/j.issn.1003-9015.2015.00.039.
- [16] KUMAGAI H, ECHIGO T, SUZUKI H, et al. Synthesis of γ -glutamyl-DOPA from *L*-glutamine and *L*-DOPA by γ -glutamyltranspeptidase of *Escherichia coli* K-12[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, 52(7): 1741-1745. DOI:10.1271/bbb1961.52.1741.
- [17] UEDA Y, YONEMITSU M, TSUBUKU T, et al. Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997, 61(12): 1977-1980. DOI:10.1271/bbb.61.1977.
- [18] YUSUKE A, MASAKAZU N, KANEKO M, et al. Structure-CaSR-activity relation of kokumi γ -glutamyl peptides[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2016, 64(8): 1181-1189. DOI:10.1248/cpb. c16-00293.
- [19] AMINO Y, WAKABAYASHI H, AKASHI S, et al. Structural analysis and taste evaluation of γ -glutamyl peptides comprising sulfur-containing

- amino acids[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2018, 82(3): 383-394. DOI:10.1080/09168451.2018.1436433.
- [20] UEDA Y, SAKAGUCHI M, HIRAYAMA K, et al. Characteristic flavor constituents in water extract of garlic[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1990, 54(1): 163-169. DOI:10.1080/00021369.1990.10869909.
- [21] UEDA Y, TSUBUKU T, MIYAJIMA R. Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994, 58(1): 108-110. DOI:10.1271/bbb.58.108.
- [22] TOELSTEDE S, DUNKEL A, HOFMANN T. A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured Gouda cheese[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(4): 1440-1448. DOI:10.1021/jf803376d.
- [23] KURODA M, KATO Y, YAMAZAKI J, et al. Determination and quantification of gamma-glutamyl-valyl-glycine in commercial fish sauces[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(29): 7291-7296. DOI:10.1021/jf301293z.
- [24] KURODA M, KATO Y, YAMAZAKI J, et al. Determination of gamma-glutamyl-valyl-glycine in raw scallop and processed scallop products using high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2012, 134(3): 1640-1644. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.03.048.
- [25] MIYAMURA N, IIDA Y, KURODA M, et al. Determination and quantification of kokumi peptide, gamma-glutamyl-valyl-glycine, in brewed alcoholic beverages[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 120(3): 311-314. DOI:10.1016/j.jbiosc.2015.01.018.
- [26] MIYAMURA N, KURODA M, KATO Y, et al. Quantitative analysis of gamma-glutamyl-valyl-glycine in fish sauces fermented with *Koji* by LC/MS/MS[J]. Chromatography, 2016, 37(1): 37-40. DOI:10.15583/jpcrom.2015.034.
- [27] MIYAMURA N, JO S, KURODA M, et al. Flavour improvement of reduced-fat peanut butter by addition of a kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine[J]. Flavour, 2015, 4(1): 16. DOI:10.1186/2044-7248-4-16.
- [28] ZHAO C J, GÄNZLE M G. Synthesis of taste-active γ -glutamyl dipeptides during sourdough fermentation by *Lactobacillus reuteri*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(40): 7561-7568. DOI:10.1021/acs.jafc.6b02298.
- [29] YANG Juan, SUN Dongxiao, CUI Chun, et al. Synthesis and sensory characteristics of kokumi γ -[Glu]_n-Phe in the presence of glutamine and phenylalanine: glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens* or *Aspergillus oryzae* as the catalyst[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(39): 8696-8703. DOI:10.1021/acs.jafc.7b03419.
- [30] YANG Juan, SUN Dongxiao, XIE Jin, et al. Comparison of kokumi γ -[Glu]_(n>1)-Val and γ -[Glu]_(n>1)-Met synthesized through transpeptidation catalyzed by glutaminase from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Food Chemistry, 2018, 247: 89-97. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.11.096.
- [31] SPERANZA G, MORELLI C F. γ -Glutamyl transpeptidase-catalyzed synthesis of naturally occurring flavor enhancers[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2012, 84: 65-71. DOI:10.1016/j.molcatb.2012.03.014.
- [32] OHSU T, TAKESHITA S, ETO Y, et al. Kokumi-imparting agent: US9395376[P/OL]. 2016-07-19[2019-01-07]. <http://www.derwentinnovation.com>.
- [33] SUZUKI H, KATO K, KUMAGAI H. Enzymatic synthesis of γ -glutamylvaline to improve the bitter taste of valine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(3): 577-580. DOI:10.1021/jf0347564.
- [34] LEE Y C, CHI M C, LIN M G, et al. Biocatalytic synthesis of γ -glutamyl-L-leucine, a kokumi-imparting dipeptide, by *Bacillus licheniformis* γ -glutamyltranspeptidase[J]. Food Biotechnology, 2018, 32(2): 130-147. DOI:10.1080/08905436.2018.1444636.
- [35] SUZUKI H, KAJIMOTO Y, KUMAGAI H. Improvement of the bitter taste of amino acids through the transpeptidation reaction of bacterial γ -glutamyltranspeptidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(2): 313-318. DOI:10.1021/jf010726u.
- [36] 王永华, 戚坚. 食品风味化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2015: 11-23.
- [37] MARUYAMA Y, YASUDA R, KURODA M, et al. Kokumi substances, enhancers of basic tastes, induce responses in calcium-sensing receptor expressing taste cells[J]. PLoS ONE, 2012, 7(4): e34489. DOI:10.1371/journal.pone.0034489.
- [38] OHSU T, AMINO Y, NAGASAKI H, et al. Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(2): 1016-1022. DOI:10.1074/jbc.M109.029165.
- [39] BRENNAN S C, DAVIES T S, SCHEPELMANN M, et al. Emerging roles of the extracellular calcium-sensing receptor in nutrient sensing: control of taste modulation and intestinal hormone secretion[J]. British Journal of Nutrition, 2014, 111(Suppl 1): S16-S22. DOI:10.1017/s0007114513002250.
- [40] KURODA M, MIYAMURA N. Mechanism of the perception of "kokumi" substances and the sensory characteristics of the "kokumi" peptide, γ -Glutamyl-Gly[Glu]-Gly[J]. Flavour, 2015, 4(1): 11. DOI:10.1186/2044-7248-4-11.
- [41] YOUNG S H, REY O, SINNETT-SMITH J, et al. Intracellular Ca^{2+} oscillations generated via the Ca^{2+} -sensing receptor are mediated by negative feedback by PKCalpha at Thr888[J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2014, 306(3): C298-C306. DOI:10.1152/ajpcell.00194.2013.
- [42] MUN H C, FRANKS A H, CULVERSTON E L, et al. The venus fly trap domain of the extracellular Ca^{2+} -sensing receptor is required for L-amino acid sensing[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(50): 51739-51744. DOI:10.1074/jbc.M406164/200.
- [43] 刘宜锋, 曹新志. 新型食品添加剂: 谷胱甘肽[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2002(增刊1): 714-717. DOI:10.3969/j.issn.1000-2243.2002.z1.017.
- [44] 贾贞, 王丹, 游松. 谷胱甘肽的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(3): 238-242. DOI:10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2009.03.013.
- [45] 郭辉, 安琪. 浓厚味YE促进酱料产业发展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 42-43.
- [46] 汤亚杰, 徐小玲, 李冬生. 发酵法生产谷胱甘肽的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(1): 75-79. DOI:10.3321/j.issn:0253-990X.2007.01.021.
- [47] TOMITA K, YANO T, KITAGATA T, et al. Formation of γ -glutamyl peptides by glutaminase of *Aspergillus oryzae*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(7): 1995-1996. DOI:10.1271/bbb.1961.53.1995.
- [48] TACHIKI T, YAMADA T, MIZUNO K, et al. γ -Glutamyl transfer reactions by glutaminase from *pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 and their application for the syntheses of theanine and γ -glutamylmethionamide[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1998, 62(7): 1279-1283. DOI:10.1271/bbb.62.1279.
- [49] YANG J, SUN-WATERHOUSE D, CUI C, et al. Gamma-glutamylation of the white particulates of sufu and simultaneous synthesis of multiple acceptor amino acids-containing γ -glutamyl peptides: favorable catalytic actions of glutaminase[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 96: 315-321. DOI:10.1016/j.lwt.2018.05.055.
- [50] NAKAYAMA R, KUMAGAI H, TOCHIKURA T. Purification and properties of gamma-glutamyltranspeptidase from *Proteus mirabilis*[J].

- Journal of Bacteriology, 1984, 160(1): 341-346. DOI:10.1111/j.1365-2672.1984.tb01383.x.
- [51] SUZUKI H, KUMAGAI H, TOCHIKURA T. Gamma-glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12: formation and localization[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 168(3): 1332-1335. DOI:10.1128/jb.168.3.1332-1335.1986.
- [52] OGAWA Y, HOSOYAMA H, HAMANO M, et al. Purification and properties of gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* (natto)[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(12): 2971-2977. DOI:10.1271/bbb1961.55.2971.
- [53] CHEVALIER C, THIBERGE J M, FERRERO R L, et al. Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice[J]. Molecular Microbiology, 2010, 31(5): 1359-1372. DOI:10.1046/j.1365-2958.1999.01271.x.
- [54] HUNG C P, YANG J C, CHEN J H, et al. Unfolding analysis of the mature and unprocessed forms of *Bacillus licheniformis* γ -glutamyltranspeptidase[J]. Journal of Biological Physics, 2011, 37(4): 463-475. DOI:10.1007/s10867-011-9228-6.
- [55] LEE J M, LEE J, NAM G H, et al. Heterologous expression and enzymatic characterization of γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Journal of Microbiology, 2017, 55(2): 147-152. DOI:10.1007/s12275-017-6638-6.
- [56] SHAW M L, PITHER-JOYCE M D, MCCALLUM J A. Purification and cloning of a gamma-glutamyl transpeptidase from onion (*Allium cepa*)[J]. Phytochemistry, 2005, 66(5): 515-522. DOI:10.1016/j.phytochem.2005.01.017.
- [57] MINAMI H, SUZUKI H, KUMAGAI H. Salt-tolerant γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* 168 with glutaminase activity[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(3): 431-438. DOI:10.1016/S0141-0229(02)00314-9.
- [58] 孟佩佩, 刘冬英, 蒋敏丽, 等. γ -谷氨酰转肽酶的性质及其应用进展[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 105-110. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2009.09.040.
- [59] 贾晓鹤. 大肠杆菌ggt的克隆、表达以及利用重组GGT合成L-茶氨酸的研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2008. 75-82.
- [60] VAN HO T, SUZUKI H. Increase of "Umami" and "Kokumi" compounds in miso, fermented soybeans, by the addition of bacterial γ -glutamyltranspeptidase[J]. International Journal of Food Studies, 2013, 2(1): 39-47. DOI:10.7455/ijfs.2.1.2013.a3.
- [61] TERZYAN S S, BURGETT A W G, ANNIE H, et al. Human γ -glutamyl transpeptidase 1: structures of the free enzyme, inhibitor-bound tetrahedral transition states, and glutamate-bound enzyme reveal novel movement within the active site during catalysis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(28): 17576-17586. DOI:10.1074/jbc.M115.659680.
- [62] MORROW A L, WILLIAMS K, SAND A, et al. Characterization of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase reveals the molecular basis for substrate specificity and a critical role for the tyrosine 433-containing loop in catalysis[J]. Biochemistry, 2007, 46(46): 13407-13414. DOI:10.1021/bi701599e.
- [63] OKADA T, SUZUKI H, WADA K, et al. Crystal structures of gamma-glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(17): 6471-6476. DOI:10.1073/pnas.0511020103.
- [64] WADA K, IRIE M, SUZUKI H, et al. Crystal structure of the halotolerant gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* in complex with glutamate reveals a unique architecture of the solvent-exposed catalytic pocket[J]. FEBS Journal, 2010, 277(4): 1000-1009. DOI:10.1111/j.1742-4658.2009.07543.x.
- [65] LIN Longliu, CHEN Yiyu, CHI Mengchun, et al. Low resolution X-ray structure of γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis*: opened active site cleft and a cluster of acid residues potentially involved in the recognition of a metal ion[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2014, 1844(9): 1523-1529. DOI:10.1016/j.bbapap.2014.04.016.
- [66] WEST M B, CHEN Y, WICKHAM S, et al. Novel insights into eukaryotic gamma-glutamyltranspeptidase 1 from the crystal structure of the glutamate-bound human enzyme[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(44): 31902-31913. DOI:10.1074/jbc.M113.498139.
- [67] BOLZ C, BACH N C, MEYER H, et al. Comparison of enzymatic properties and small molecule inhibition of gamma-glutamyltranspeptidases from pathogenic and commensal bacteria[J]. Biological Chemistry, 2017, 398(3): 341-357. DOI:10.1515/hsz-2016-0198.
- [68] HU X, LEGLER P M, KHAVRUTSKII I, et al. Probing the donor and acceptor substrate specificity of the γ -glutamyl transpeptidase[J]. Biochemistry, 2012, 51(6): 1199-1212. DOI:10.1021/bi200987b.
- [69] CALVIO C, ROMAGNUOLO F, VULCANO F, et al. Evidences on the role of the lid loop of gamma-glutamyltransferases (GGT) in substrate selection[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2018, 114: 55-62. DOI:10.1016/j.enzmictec.2018.04.001.
- [70] BOANCA G, SAND A, BARYCKI J J. Uncoupling the enzymatic and autoprocessing activities of *Helicobacter pylori* γ -glutamyltranspeptidase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(28): 19029-19037. DOI:10.1074/jbc.M603381200.
- [71] WEST M B, STEPHANIE W, QUINALTY L M, et al. Autocatalytic cleavage of human gamma-glutamyl transpeptidase is highly dependent on N-glycosylation at asparagine 95[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(33): 28876-28888. DOI:10.1074/jbc.M111.248823.
- [72] CASTELLANO I, MERLINO A. Gamma-glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012, 69(20): 3381-3394. DOI:10.1007/s00018-012-0988-3.
- [73] OKADA T, SUZUKI H, WADA K, et al. Crystal structure of the gamma-glutamyltranspeptidase precursor protein from *Escherichia coli*. Structural changes upon autocatalytic processing and implications for the maturation mechanism[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(4): 2433-2439. DOI:10.1074/jbc.M607490200.
- [74] PICA A, CHI M C, CHEN Y Y, et al. The maturation mechanism of gamma-glutamyl transpeptidases: insights from the crystal structure of a precursor mimic of the enzyme from *Bacillus licheniformis* and from site-directed mutagenesis studies[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2016, 1864(2): 195-203. DOI:10.1016/j.bbapap.2015.10.006.
- [75] MURTY N A R, TIWARY E, SHARMA R, et al. γ -Glutamyl transpeptidase from *Bacillus pumilus* KS 12: decoupling autoprocessing from catalysis and molecular characterization of N-terminal region[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 50(3): 159-164. DOI:10.1016/j.enzmictec.2011.08.005.
- [76] KRISTIN W, SIERRA C, AARON S, et al. Crystal structure of acivicin-inhibited gamma-glutamyltranspeptidase reveals critical roles for its C-terminus in autoprocessing and catalysis[J]. Biochemistry, 2009, 48(11): 2459-2467. DOI:10.1021/bi8014955.
- [77] TANIGUCHI N, IKEDA Y. Gamma-glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression[J]. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 1998, 72(1): 239-278. DOI:10.1002/9780470123188.ch7.

- [78] SHLEIKIN A G, DANILOV N P. Evolutionary-biological peculiarities of transglutaminase. Structure, physiological functions, application[J]. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2011, 47(1): 1-14. DOI:10.1134/S0022093011010014.
- [79] ALLISON R D. Gamma-glutamyl transpeptidase: kinetics and mechanism[J]. *Methods in Enzymology*, 1985, 113: 419-437. DOI:10.1016/S0076-6879(85)13054-5.
- [80] IMMACOLATA C, ANTONELLO M. γ -Glutamyltranspeptidases: sequence, structure, biochemical properties, and biotechnological applications[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012, 69(20): 3381-3394. DOI:10.1007/s00018-012-0988-3.
- [81] FERNANDEZ-LAFUENTE R. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 45(6): 405-418. DOI:10.1016/j.enzmictec.2009.08.009.
- [82] CARLO F M, CINZIA C, MARCO B, et al. pH-dependent hydrolase, glutaminase, transpeptidase and autotranspeptidase activities of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltransferase[J]. *FEBS Journal*, 2014, 281(1): 232-245. DOI:10.1111/febs.12591.
- [83] LIN Minguan, CHI Mengchun, CHEN Yuyi, et al. Site-directed mutagenesis of a conserved Asn450 residue of *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyltranspeptidase[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 91: 416-425. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.05.101.
- [84] BINDAL S, SHARMA S, SINGH T P, et al. Evolving transpeptidase and hydrolytic variants of γ -glutamyl transpeptidase from *Bacillus licheniformis* by targeted mutations of conserved residue Arg109 and their biotechnological relevance[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 249: 82-90. DOI:10.1016/j.jbiotec.2017.03.034.
- [85] NAKAJIMA M, WATANABE B, HAN L, et al. Glutathione-analogous peptidyl phosphorus esters as mechanism-based inhibitors of gamma-glutamyl transpeptidase for probing cysteinyl-glycine binding site[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2014, 22(3): 1176-1194. DOI:10.1016/j.bmc.2013.12.034.
- [86] CHI Mengchun, LIN Minguan, CHEN Yuyi, et al. Functional role of the conserved glycine residues, Gly481 and Gly482, of the γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 109: 1182-1188. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.116.
- [87] SUZUKI H, KUMAGAI H. Application of bacterial γ -glutamyl-transpeptidase to improve the taste of food[J]. *Challenges in Taste Chemistry and Biology*, 2003, 867: 223-237. DOI:10.1021/bk-2003-0867.ch015.
- [88] HANUM T, SINHA N K, GUYER D E, et al. Pyruvate and flavor development in macerated onions (*Allium cepa* L.) by γ -glutamyl transpeptidase and exogenous CS lyase[J]. *Food Chemistry*, 1995, 54(2): 183-188. DOI:10.1016/j.jbiotec.2017.03.034.
- [89] KIJIMA K, SUZUKI H. Improving the umami taste of soy sauce by the addition of bacterial γ -glutamyltranspeptidase as a glutaminase to the fermentation mixture[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(1/2): 80-84. DOI:10.1016/j.enzmictec.2006.12.004.
- [90] CHEN Yiyu, LO H F, WANG T F, et al. Enzymatic synthesis of γ -L-glutamyl-S-allyl-L-cysteine, a naturally occurring organosulfur compound from garlic, by *Bacillus licheniformis* γ -glutamyltranspeptidase[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2015, 75: 18-24. DOI:10.1016/j.enzmictec.2015.04.011.
- [91] LIN L L, CHI M C, LAN Y J, et al. Facile immobilization of *Bacillus licheniformis* γ -glutamyltranspeptidase onto graphene oxide nanosheets and its application to the biocatalytic synthesis of γ -L-glutamyl peptides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 1326-1333. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.11.153.
- [92] SUZUKI H, NAKAFUJI Y, TAMURA T. New method to produce kokumi seasoning from protein hydrolysates using bacterial enzymes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(48): 10514-10519. DOI:10.1021/acs.jafc.7b03690.