

γ -谷氨酰转肽酶催化特性研究进展

廖剑洪^{1,2}, 杨娟^{1,2}, 曾晓房^{1,2}, 白卫东^{1,2}, 梁景龙^{1,2*}

¹仲恺农业工程学院 轻工食品学院 广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室 广州 510225

²仲恺农业工程学院 轻工食品学院 农业农村部岭南特色食品绿色加工与智能制造重点实验室 广州 510225)

摘要 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)广泛存在于自然界的多种生物中,具有转肽和水解活性,可根据不同底物条件合成 γ -谷氨酰氨基酸/多肽,这类物质因可作为风味增强剂或生物活性物而引起食品、医药合成等行业的关注。细菌中有丰富的 GGT 资源,本文综述 γ -谷氨酰转肽酶的结构特征、性质特点、催化反应特性和相关产物特性,旨在挖掘细菌 GGT 的潜力,为未来研究提供参考。

关键词 γ -谷氨酰胺转肽酶; 催化特性; γ -谷氨酰肽

文章编号 1009-7848(2023)11-0403-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.11.038

近年来,有研究称 γ -谷氨酰肽属于厚味肽^[1]。这种小肽既能增加食品的风味特征,也能增加化合物的溶解性、稳定性,在食品、医药领域有重要的应用价值。在食物中添加少量的厚味肽能增强或改善风味特征,如在食品体系中添加可增强基本味感的协调性、连续性和呈味强度^[2]。此外,有报道称氨基酸经 γ -谷氨酰化,水溶性优于原氨基酸,并且 γ -谷氨酰肽比一般的短肽稳定性好^[3]。

γ -谷氨酰转肽酶 (γ -Glutamyltranspeptidase, GGT)广泛存在于各种生物体内,能特异性地催化 γ -谷氨酰化合物中的 γ -谷氨酰键断裂,并将 γ -谷氨酰基团转移到氨基酸、短肽或水分子中^[4]。GGT 催化反应具有特异性强,不消耗能量等优点,已有广泛的应用研究,如改善食品体系的口感(茶氨酸、 γ -谷氨酰-苯丙氨酸等)或作为药物或药物前体 (γ -D-谷氨酰-L-色氨酸、 γ -谷氨酰-牛磺酸等)。

GGT 在合成多种食品和医药用 γ -谷氨酰基化合物方面有广泛的应用前景。然而,在使用该酶的酶促合成应用方面受多种因素制约:有限的酶促反应速率、供体底物的水解和自身转肽化的副

反应、酶的抗逆性以及稳定性等。细菌中有丰富的 GGT 资源,本文综述其结构与功能的关系,蛋白质工程在改造 GGT 性质方面的应用以及产物特点,旨在挖掘细菌 GGT 的潜力,为未来研究提供参考。

1 GGT 的来源与同源性分析

目前,人们已经从许多微生物中分离得到 GGT,包括大肠杆菌 GGT(*Escherichia coli* GGT, EcGGT)、肺炎链球菌 GGT(*Streptococcus pneumoniae* GGT, SpGGT)、枯草芽孢杆菌 GGT(*Bacillus subtilis* GGT, BsGGT)、地衣芽孢杆菌 GGT(*Bacillus licheniformis*, BlGGT)、解淀粉芽孢杆菌 GGT(*Bacillus amyloliquefaciens*, BaGGT)、奇异变形杆菌 GGT(*Proteus mirabilis*, PmGGT)、幽门螺杆菌 GGT(*Helicobacter pylori*, HpGGT)等。对多种不同生物体产生的 GGT 结构研究表明,它是结构不对称的一种由小亚基和大亚基组成的异二聚体酶。迄今已确定的 GGT 酶在一级结构上表现出一定程度的同源性。几种芽孢杆菌的 GGT 的小亚基氨基酸序列同源性超过 80%^[5];解淀粉芽孢杆菌的小亚基与枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、幽门螺杆菌、铜绿假单胞菌的同源性为 33%~78%之间,与相应的非微生物酶亚基(如牛、人和小鼠 GGT)的同源性在 25%~31%之间^[6]。将几种微生物的 GGT 一级结构序列进行比对,可以看出有较高的相似性(图 1)。

收稿日期: 2022-11-04

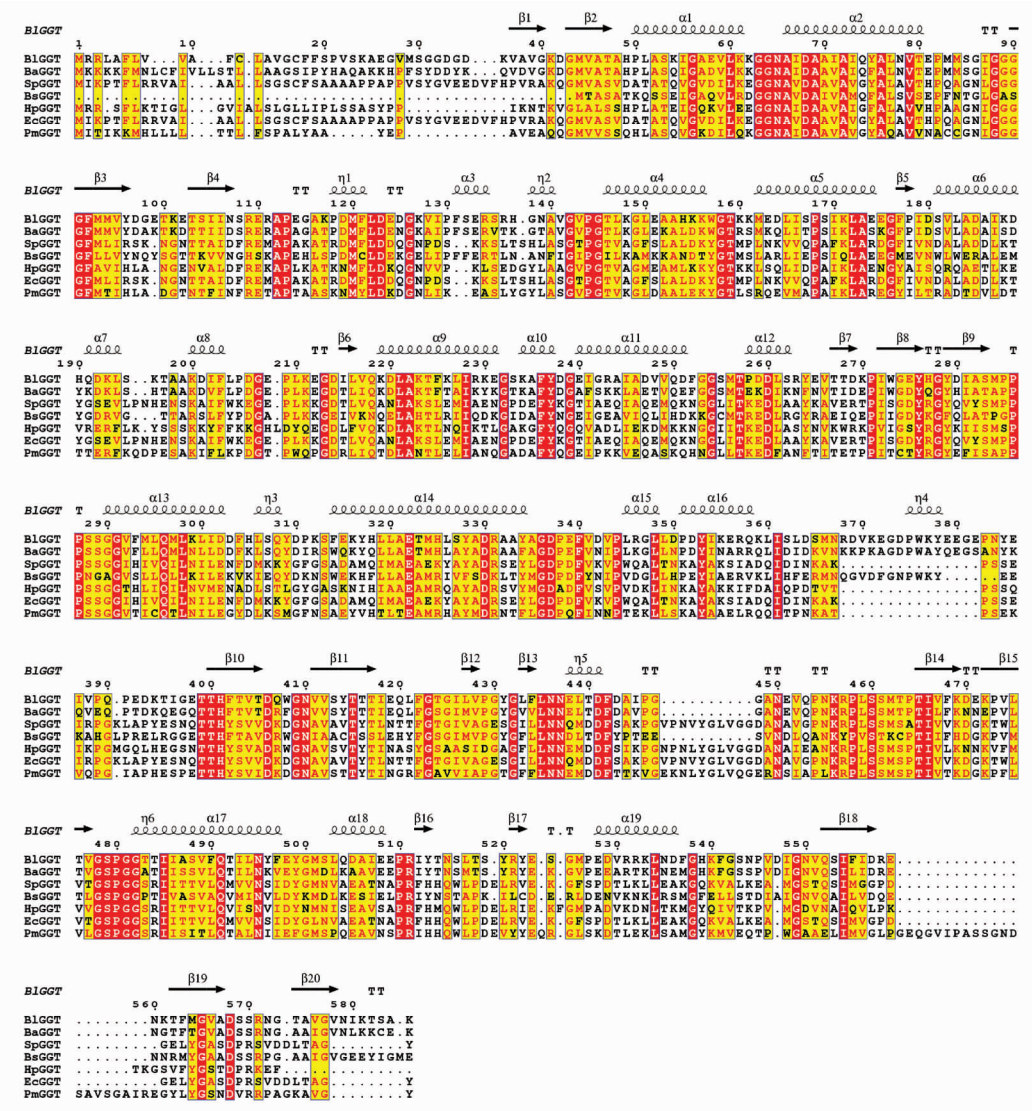
基金项目: 广东省企业科技特派员专项资助项目(GDK-TP2021036400); 广东省基础与应用基础研究基金(2023A1515010934)

第一作者: 廖剑洪,男,硕士生

通信作者: 梁景龙 E-mail: jinglong_liang@zhku.edu.cn

目前,已有许多研究通过蛋白质分子结晶技术深入理解了GGT的空间结构。在空间构象上,微生物产生的GGT通常由2个大小不相等的亚基组成,大亚基的分子质量一般约为40 ku,小亚基一般约为20 ku。GGT是一种酰胺键水解酶,小亚基的一侧被大亚基环绕。正确的空间折叠结构是GGT具有酶活性的关键^[7-8]。

基一般约为20 ku。GGT是一种酰胺键水解酶,小亚基的一侧被大亚基环绕。正确的空间折叠结构是GGT具有酶活性的关键^[7-8]。



注:红色代表该位置氨基酸残基完全保守,黄色代表该位置氨基酸残基相似;BIGGT NCBI编号AAU40268;BaGGT NCBI编号AGZ56610;SpGGT NCBI编号VTQ26531;BsGGT NCBI编号WP_158323929;HpGGT NCBI编号BCI59025;EcGGT NCBI编号CAD6000530;PmGGT NCBI编号QT009355。

图1 几种微生物的GGT序列对比
Fig.1 Sequence alignment of several microbial GGTs

2 GGT的催化反应特性

2.1 GGT的催化反应类型

γ-谷氨酰转肽酶催化分为2步反应:第1步称为酰化,Thr-391的活性氧原子攻击γ-谷氨酰基化合物的羰基碳原子,裂解γ-谷氨酰化合物如

谷胱甘肽和谷氨酰胺中存在的γ-谷氨酰键,随后供体底物的γ-谷氨酰基部分与酶结合,形成γ-谷氨酰基-酶复合物;第2步反应是脱酰胺化,受体底物接受中间体的γ-谷氨酰基部分,形成最终产物。Okada等^[9]对EcGGT的晶体观察,表明第2步

反应可能是限制酶促反应速率的关键环节。

根据受体分子的不同可以将 GGT 的催化反应分为 3 种类型(图 2):1)当受体分子是水时, γ -谷氨酰化合物水解;2)当受体分子是氨基酸或者短肽时,形成新的 γ -谷氨酰化合物;3)当受体分子与供体分子为同一物质时,称为自转肽反应。水

解反应和转肽反应的最适 pH 值不同,因此能通过调整反应体系的 pH 值调控反应进行方向。目前已报道的 GGT,酸性条件具有较高的水解反应活性,在碱性条件下(pH 8.0~11.0)催化转肽反应活力迅速攀升,同时水解反应被一定程度抑制。

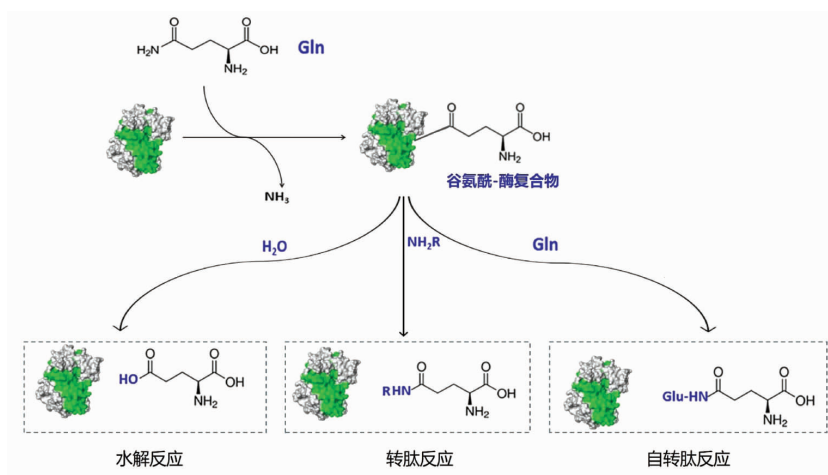


图 2 GGT 的催化反应类型(以谷氨酰胺为例)

Fig.2 Catalytic reaction type of GGT (Taking glutamine as an example)

2.2 GGT 的底物选择性

GGT 催化 γ -谷氨酰键断裂,特异性强,可以根据不同底物条件合成特定的目的产物。自然界中的蛋白质肽键通常是在 α -羧基和 α -氨基之间形成的,而 γ -谷氨酰肽的肽键是在 γ -羧基上形成,这被认为是其具有厚味活性的关键,因为同样序列的 α -谷氨酰肽没有呈现出厚味性质^[10]。供体和受体底物选择性方面,*L* 型或 *D* 型的 γ -谷氨酰化合物都能作为供体分子参与酶促反应,而多数 GGT 仅接受 *L*-氨基酸作为供体底物,而不能以 *D*-谷氨酸作为受体底物,目前仅发现少数的 GGT 同时能催化 *L* 型和 *D* 型氨基酸作为受体分子反应^[11]。相比酸性氨基酸,碱性氨基酸是更适合的受体氨基酸,氨基酸的侧链长短似乎也是影响酶活性的因素^[12-13]。

2.3 GGT 转肽反应条件的调控

由于 GGT 催化反应的特点,反应体系的水解、转肽、自转肽反应并存不利于底物转化率和产物分离纯化。调控 GGT 催化反应的方向,对其实际应用有重要意义。

在一般的酶促反应中,酶和底物量的是催化反应不可缺少的一员,影响着转化率,而 GGT 的反应特点决定了其反应特性与此迥异。由于 GGT 同时具有底物水解和合成 2 种反应,水解产物、转肽产物以及自转肽产物共存是 GGT 催化反应的共同特征,并且与所使用的受体的性质无关。基于 GGT 催化反应的特点,对 E_cGGT 的反应特点研究中表明,低浓度的酶不影响底物的转化率,而过高浓度的酶可能造成底物转化率的降低。另外,目前关于 GGT 催化反应的报道^[14]中,转肽反应和自转肽反应的产物主要在前期阶段生成,转肽产物浓度随时间延长而保持相对稳定,自转肽产物导致了复杂的产物体系,降低了底物的转化率。转肽产物的转化率被证实取决于供体与受体底物的浓度比例,而在反应过程中增加供体底物的浓度会促进自转肽反应的进行,而不是转肽反应。如表 1 所示,GGT 催化不同反应其最佳的反应条件有着明显的差异。

为了促进 GGT 的转肽反应,利用大多数 GGT 对底物的选择性,使用 *D*-谷氨酰化合物能够显著

提高产物合成产量并降低 γ -谷氨酰副产物。除此之外,基因工程手段被认为是一种控制GGT催化反应的重要方式,对某些保守氨基酸的突变,可以使GGT的转肽反应和水解反应的比值提高,是良

好的控制产物合成的方式^[6,15]。另外,根据GGT的结构与功能特点,在BsGGT中插入“盖-环”结构,水解反应被明显抑制^[16]。

表1 GGT的催化的最佳条件

Table 1 The optimal conditions for the catalysis of GGT

产物	酶来源	最佳酶浓度/ U·mL ⁻¹	最佳反应温度/ ℃	最佳反应pH值	供体/受体浓度比	参考文献
L-茶氨酸	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	0.06	37	10	1:2.5 (谷氨酰胺:乙胺)	[17]
γ -谷氨酰-缬氨酸	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	0.03	37	8	1:5 (谷氨酰胺:缬氨酸)	[18]
γ -谷氨酰-缬氨酸	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	0.06	37	10	1:15 (谷氨酰胺:缬氨酸)	[19]
γ -谷氨酰-苯丙氨酸-	地衣芽孢杆菌(<i>Bacillus licheniformis</i>)	2.00	50	9.0	1:5 (谷氨酰胺:苯丙氨酸)	[20]
γ -D-谷氨酰-L-色氨酸	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	0.20	37	9.0-9.5	1:1 (D-谷氨酰胺:L-色氨酸)	[21]
γ -D-谷氨酰-L-色氨酸	萎缩芽孢杆菌(<i>Bacillus atrophaeus</i>)	0.30	37	10	1:1 (D-谷氨酰胺:L-色氨酸)	[22]
γ -L-谷氨酰-牛磺酸	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	0.20	37	10	1:1 (L-谷氨酰胺:牛磺酸)	[23]
L-谷氨酰-S-烯丙基-L-半胱氨酸	地衣芽孢杆菌(<i>Bacillus licheniformis</i>)	1.00	60	9	1:1 (谷氨酰胺:S-烯丙基-L-半胱氨酸)	[24]

3 GGT结构的功能特性

酶的空间构象是决定酶催化性质的关键。通过比对不同物种的GGT的关键氨基酸和空间结构可以发现,不同来源的GGT在活性中心区域的空间构象存在差异,进而对底物的结合和酶促反应产生重要的影响。

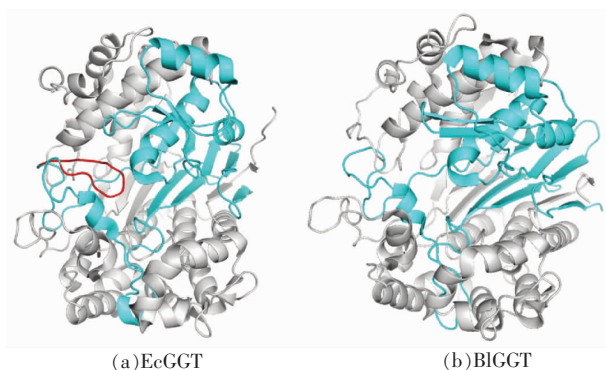
3.1 “盖-环”结构

EcGGT、HpGGT等会携带一个由12~16个残基组成的短序列,被称为“盖-环”结构(“Lid-Loop”)^[9],而在BsGGT、BIGGT和BaGGT的空间结构上是不具有这种结构。这两类GGT在催化性质方面呈现不同的特点。

“盖-环”结构有控制底物、产物进出活性中心的作用。哺乳动物和大肠杆菌等具有“盖环”结构的GGT对底物分子有筛选作用,表现为限制分子质量较大的 γ -谷氨酰化合物进入酶活性中心^[25-26]。

如:EcGGT的“盖-环”结构(Pro438-Gly449)中的芳香族残基酪氨酸(Tyr444)与保守残基Asn411形成氢键,限制水分子分子进入活性中心,并且具有调节底物进入活性中心的功能^[9]。HpGGT盖环的Tyr433与Asn400之间同样存在类似的氢键^[27]。因此,“盖-环”结构被认为能抑制水分子参与的水解反应。相反,枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等GGT能够结合长链的谷氨酰胺化合物^[28],尤其是利于聚合谷氨酰胺化合物的水解。Calvio等^[29]、Massone等^[16]的研究进一步佐证上述观点,将EcGGT上对应的“盖-环”的基因序列通过基因工程技术插入到BsGGT上,突变体GGT获得“盖环”结构后,优先催化小分子质量的底物分子,同时提升GGT酶转肽活性。

此外,在“盖-环”中心位置的有一个重要的保守芳香残基保护酶结构,这种芳香族氨基酸在



注:EcGGT 和 BIGGT 的蛋白质数据库(Protein Data Bank)编号分别为 5B5T、4OTT;红色为“盖-环”结构,小的和大的亚基分别用蓝绿色和灰色表示。

图 3 GGT 三维结构

Fig.3 Three-dimensional structure of GGT

EcGGT-中是酪氨酸(Tyr444),而在哺乳动物中相对应的芳香族残基则是苯丙氨酸^[9,27,30],这种差异也被认为决定 GGT 的活性大小^[31]。

3.2 自催化加工结构

GGT 是 N 末端亲核水解酶家族的一员,这种酶家族的特点是转录翻译产生的前体蛋白不具有酶活性,需要激活 N 端的 Ser 或者是 Thr 进行自催化裂解后才能具有酶活性。这种机制被称为自催化成熟机制^[32]。成熟的 GGT 的大小亚基都是经过前体蛋白自催化处理后产生的二聚体。GGT 自催化加工涉及一个保守残基-苏氨酸,自催化处理后,新产生的 C-末端和 N-末端分别形成大的和小的亚基;这个保守的苏氨酸作为小的亚基中的第一个氨基酸残基,同时这个保守的残基还是酶促反应的关键活性位点^[6]。成熟的 GGT 和前体蛋白的整体结构相比,虽没有显著的变化,但是在活性位点附近有显著的变化,从而解除了对限制底物结合空间位阻,而赋予了 GGT 酶活性。多个报道证明 GGT 分子的自催化加工需要多个氨基酸残基共同参与,小亚基上的保守残基苏氨酸对 GGT 的自催化加工是重要的,但不是必须的^[33-36]。

3.3 GGT 的底物结合位点

酶分子在一级结构的基础上经过盘绕折叠成特定的空间结构才能具有特定的催化功能,而酶的空间构象对底物结合的亲和能力影响着酶催化能力。在 GGT 的催化反应中,底物分子根据提供的基团不同,GGT 底物结合区域可以划分为 2 种:

供体结合部位和受体结合部位。

供体结合位点和供体分子中的 γ -谷氨酰氨基部分结合,而不同的受体分子的结合位点仍未完全表征清楚。Okada 等^[9]利用蛋白质结晶技术捕获了 EcGGT 与谷胱甘肽结合的酶中间体结构以及和谷氨酸结合的复合物结构,揭示了谷胱甘肽的 γ -谷氨酰基部分的 α -羧基和 α -氨基位于酶催化口袋的底部,通过氢键和盐桥保持在关键的空间位置。GGT 中参与供体分子的结合氨基酸主要分布在小亚基中,大亚基中仅有一个保守的 Arg 参与。研究表明^[6]BIGGT、EcGGT 和 BsGGT 中参与供体结合的氨基酸组成仅有 1~2 个氨基酸的区别,例如 BIGGT 的 Glu423、Glu442 和 EcGGT 的 N411、Q430^[7-8]。对大亚基上的参与底物结合的保守残基 Arg,在 BIGGT 中,带正电荷的残基赖氨酸取代参与底物结合的 Arg109 提高了转肽活性,而在同样的替换 EcGGT 和 BsGGT 中导致了酶活力的下降^[37-39]。Gly-Gly 是多数 GGT 良好的受体底物,PnGGT 的结构研究指出其结构口袋的芳香族氨基酸可能限制了 Gly-Gly 作为 γ -谷氨酰受体的活性^[40]。Takao^[40]证实了 Trp385、Phe417 和 Trp525 的芳香族侧链参与了受体底物的识别,根据这些残基的生化特性,设计水解活性降低,转肽酶活性显著升高的突变酶。GGT 和底物结合催化机制的具体影响仍然需要进一步的研究阐明,以便筛选不同种类的酶和改造出更优质的酶。

4 GGT 的稳定性研究

大多数酶在催化反应中需要温和的条件反应以进行正常的催化活性。酶蛋白在催化反应中抵抗各种因素的影响(高酸、高温、高盐等)是保证其生物活力的关键。研究 GGT 酶的稳定性对其基础理论研究有重要意义,对提高其反应和贮存稳定性,扩大酶的使用范围对实际应用是必不可少的。目前报道的微生物产生的 GGT 最适合 pH 值多为碱性范围(8.0~10.0),通常在 pH<5.0 的几乎检测不到酶活性,最适温度范围约为 37~60 °C,且对 pH 值的稳定性高于对温度的稳定性。当温度超过 60 °C 时,即使是短时间孵育(10 min),GGT 也会丧失 90% 的活性^[5,13,41]。对于 GGT 稳定性不足,突变改造是有效的提升方式。如彭清等^[42]将不同的氨

基酸取代 BsGGT 的 280 位 Tyr,改善了 pH 值耐受性问题。Hu 等^[43]将 BIGGT 结构和一种淀粉酶融合,虽提高了 GGT 的热稳定性,但活性有所降低。耐盐性是 GGT 的另一个突出特性,这使得其在酱油等加工行业中有重要的应用前景。目前已发现的多种 GGT 在高浓度 NaCl 存在和无 NaCl 存在时都有活性,表明 GGT 是耐盐的但不嗜盐,并在 1~5 mol/L NaCl 溶液中表现出极高的稳定性^[5,37,44-45]。

5 改造 GGT 的研究

天然酶稳定性差、易失活、酶活力差等是限制酶应用的主要原因。随着酶工程技术的发展,进行定向进化、定点突变或者其它稳定化技术处理,脆弱的天然酶能成为符合工业生产要求的、更加稳定的变异酶,使得生物催化技术极大地拓宽了应用价值。目前对 GGT 的酶学性质提升研究主要有克隆表达、定点突变、和固定化酶几方面。

近年来,诸多学者通过对基因工程技术,将 GGT 的基因进行异源表达,以期获得高酶活性、稳定性的 GGT。Lee 等^[13]将解淀粉芽孢杆菌 SMB469 中的 GGT 酶分别在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中表达,得到的重组 GGT 酶活力分别提高了 2 倍和 22.5 倍。Yang 等^[46]将短小芽孢杆菌 ML413 的 GGT 重组到枯草芽孢杆菌 168 中,提高了 GGT 的产量和活性。Cho 等^[44]把解淀粉芽孢杆菌 S0904 的 GGT 序列导入大肠杆菌中并表达,重组酶产量提高了 56.6 倍。

定点突变是通过对蛋白质中的氨基酸定点突变改变密码子偏性以提高表达水平,改变蛋白质活性、稳定性,改变酶的特异性等。Lin 等^[6]把地衣芽孢杆菌 GGTA_{sn450} 替换为 Ala 和 Asp,均提高了转肽活性,最高可达 3.6 倍。Bindal 等^[37]将地衣芽孢杆菌 GGT 的 109 位氨基酸 Arg 突变为 Lys,发现 Lys 的取代后 GGT 具有更高的转肽活性和催化效率。Li 等^[47]将解淀粉芽孢杆菌 GGT 结合口袋中 Ser437 替换为 Gly,改造后的酶茶氨酸产率从 58%上升到 83%。

固定化酶既能稳定酶结构,保持酶的活力;还便于酶和产物的分离。周治等^[48]以镍整合环氧载体作为载体将 GGT 进行共价固定化,固定化的酶

对温度和 pH 值的稳定性有明显提高。韦敏等^[49]针对 GGT 的 pH 值耐受性差问题,以硅烷化改性的介孔氧化钛晶须为载体对重组枯草芽孢杆菌 GGT 进行固定化,提高了酶的 pH 值耐受性和热稳定性。Lin 等^[50]把地衣芽孢杆菌的 GGT 固定在氧化石墨烯纳米片上,固定化后可重复使用 9 次,生物催化合成 γ -L-谷氨酰苯丙氨酸和 γ -L-谷氨酰亮氨酸的产率均在 31%以上。Bruni 等^[51]利用辛基乙氧基-琼脂糖固定了 γ -谷氨酰转肽酶,开发一种用于合成 γ -谷氨酰氨基酸的强效生物催化剂,在 γ -谷氨酰甲硫氨酸合成反应中,反应 6 d 后仍保持 95%以上的活性,而反应 6 个循环(18 d)后仍保持 85%的活性。

6 总结与展望

γ -谷氨酰转肽酶是原核生物和真核生物中普遍存在的一种酶,具有很高的序列相似性和进化保守性,这有利于通过合成生物学手段实现物种间的基因交换与蛋白质工程设计。GGT 独特的水解和转肽的催化反应,根据其最适的 pH 值不同,通过调节反应液的 pH 值,可以选择性的利用这两种催化反应中的一种,因此在食品工业中引起广泛的重视,例如利用转肽活性合成 γ -谷氨酰肽或利用水解活性在酱油发酵中产生谷氨酸。对于 GGT 结构与功能的研究已得到深入的了解,结合酶工程等手段改造 GGT 分子是提高其应用价值的重要手段。

虽然近年来 GGT 的研究取得了显著的进展,但是与其它能够规模化生产的酶相比进展缓慢。GGT 生产成本相对较高、活性、稳定性等是阻碍其工业化应用的主要缺点之一。深入探索生物多样性,以鉴定高产菌株是未来最有希望的替代方案之一。基因重组技术和定点突变已被证明是蛋白质工程中不可估量的工具,应把更多的重点放在探索酶的生产技术上,提高 GGT 的性能,以适应不同的工业需求。GGT 的结构分析,包括活性必须基团的鉴定和相互作用的阐明,将有助于建立不同来源的 γ -谷氨酰转肽酶的结构与功能关系,尤其是 GGT 涉及受体的结合残基仍然未完全明确。总的来说,现有研究水平尚停留在实验室研究阶段,为此需要通过筛选高酶活性、稳定性的酶来

源,以及结合酶工程改造等策略,提高 GGT 的 γ -谷氨酰肽合成能力。

参 考 文 献

- [1] SUZUKI H, NAKAFUJI Y, TAMURA T. New method to produce kokumi seasoning from protein hydrolysates using bacterial enzymes[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(48): 10514–10519.
- [2] TAKAKURA Y, ARAI S, KANAORI K, et al. Development of enzymatic synthesis of gamma-glutamylcarnosine and its effects on taste[J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(2): 592–597.
- [3] 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]. 2018, 96: 315–321.
- [4] LIN L L, LU B Y, CHI M C, et al. Activation and thermal stabilization of a recombinant gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis* ATCC 27811 by monovalent cations[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(5/6): 1991–2006.
- [5] LI Z, ZHU R, LIU Y, et al. gamma-Glutamyltranspeptidase from *Bacillus amyloliquefaciens*: Transpeptidation activity enhancement and *L*-theanine production[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 140: 109644.
- [6] LIN M G, CHI M C, CHEN Y Y, et al. Site-directed mutagenesis of a conserved Asn450 residue of *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyltranspeptidase[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 91: 416–425.
- [7] LIN L L, CHEN Y Y, CHI M C, et al. Low resolution X-ray structure of gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis*: Opened active site cleft and a cluster of acid residues potentially involved in the recognition of a metal ion[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844(9): 1523–1529.
- [8] 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 J*, 2010, 277(4): 1000–1009.
- [9] 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]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(17): 6471–6476.
- [10] TOELSTED S, HOFMANN T. Kokumi-active glutamyl peptides in cheeses and their biogenesis by *Penicillium roquefortii*[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(9): 3738–3748.
- [11] WU Q, XU H, ZHANG L, et al. Production, purification and properties of γ -glutamyltranspeptidase from a newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2[J]. 2006, 43(1–4): 113–117.
- [12] IMAOKA M, YANO S, OKUMURA M, et al. Molecular cloning and characterization of gamma-glutamyltranspeptidase from *Pseudomonas nitroreducens* IFO12694[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(9): 1936–1939.
- [13] LEE J M, LEE J, NAM G H, et al. Heterologous expression and enzymatic characterization of gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *J Microbiol*, 2017, 55(2): 147–152.
- [14] SOMMA V, CALVIO C, RABUFFETTI M, et al. An overall framework for the *E. coli* gamma-glutamyltransferase-catalyzed transpeptidation reactions[J]. *Bioorg Chem*, 2021, 115: 105217.
- [15] SANO C, ITOH T, PHUMSOMBAT P, et al. Mutagenesis and structure-based analysis of the role of Tryptophan525 of gamma-glutamyltranspeptidase from *Pseudomonas nitroreducens*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 286–291.
- [16] MASSONE M, CALVIO C, RABUFFETTI M, et al. Effect of the inserted active-site-covering lid loop on the catalytic activity of a mutant *B. subtilis* γ -glutamyltransferase (GGT)[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(60): 34699–34709.
- [17] SHUAI Y, ZHANG T, JIANG B, et al. Development of efficient enzymatic production of theanine by gamma-glutamyltranspeptidase from a newly isolated strain of *Bacillus subtilis*, SK11.004[J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90(15): 2563–2567.
- [18] FUKAO T, SUZUKI H. Enzymatic synthesis of gamma-glutamylvalylglycine using bacterial gamma-glutamyltranspeptidase[J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(27): 7675–7679.
- [19] SUZUKI H, KATO K, KUMAGAI H. Enzymatic

- synthesis of gamma-glutamylvaline to improve the bitter taste of valine[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(3): 577-580.
- [20] CHI M C, LO H F, LIN M G, et al. Application of *Bacillus licheniformis* γ -glutamyltranspeptidase to the biocatalytic synthesis of γ -glutamyl-phenylalanine[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2017, 10: 278-284.
- [21] SUZUKI H, KATO K, KUMAGAI H. Development of an efficient enzymatic production of gamma-D-glutamyl-L-tryptophan (SCV-07), a prospective medicine for tuberculosis, with bacterial gamma-glutamyltranspeptidase[J]. *J Biotechnol*, 2004, 111(3): 291-295.
- [22] SAINI M, BINDAL S, GUPTA R. Heterologous expression of gamma-glutamyl transpeptidase from *Bacillus atrophaeus* GS-16 and its application in the synthesis of gamma-D-glutamyl-L-tryptophan, a known immunomodulatory peptide[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2017, 99: 67-76.
- [23] HIDEYUKI S, SHUNSUKE I, HIROMICHI M, et al. Use of bacterial gamma-glutamyltranspeptidase for enzymatic synthesis of gamma-D-glutamyl compounds [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(11): 6399-6404
- [24] CHEN Y Y, LO H F, WANG T F, et al. Enzymatic synthesis of gamma-L-glutamyl-S-allyl-L-cysteine, a naturally occurring organosulfur compound from garlic, by *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyltranspeptidase[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2015, 75-76: 18-24.
- [25] WU R, RICHTER S, ZHANG R G, et al. Crystal structure of *Bacillus anthracis* transpeptidase enzyme CapD[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(36): 24406-24414.
- [26] OLIVA F, FLORES-CANALES J C, PIERACCINI S, et al. Simulating multiple substrate-binding events by gamma-glutamyltransferase using accelerated molecular dynamics[J]. *J Phys Chem B*, 2020, 124(45): 10104-10116.
- [27] 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.
- [28] HU X, LEGLER P M, KHAVRUTSKII I, et al. Probing the donor and acceptor substrate specificity of the gamma-glutamyl transpeptidase[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(6): 1199-1212.
- [29] 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 Microb Technol*, 2018, 114: 55-62.
- [30] WEST M B, CHEN Y, WICKHAM S, et al. Novel insights into eukaryotic γ -glutamyltranspeptidase 1 from the crystal structure of the glutamate-bound human enzyme[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(16): 31902-31913.
- [31] 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]. *Biol Chem*, 2017, 398(3): 341-357.
- [32] CHI M C, LIN M G, CHEN Y Y, et al. Functional role of the conserved glycine residues, Gly481 and Gly482, of the gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 109: 1182-1118.
- [33] BOANCA G, SAND A, OKADA T, et al. Autoprocessing of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase leads to the formation of a threonine-threonine catalytic dyad[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(1): 534-541.
- [34] LYU R C, HU H Y, KUO L Y, et al. Role of the conserved Thr399 and Thr417 residues of *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyltranspeptidase as evaluated by mutational analysis[J]. *Curr Microbiol*, 2009, 59(2): 101-106.
- [35] HSU W H, ONG P L, CHEN S C, et al. Contribution of Ser463 residue to the enzymatic and autoprocessing activities of *Escherichia coli* gamma-glutamyltranspeptidase [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2009, 46(4): 281-288.
- [36] CHI M C, CHEN Y Y, LO H F, et al. Experimental evidence for the involvement of amino acid residue Glu398 in the autocatalytic processing of *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyltranspeptidase [J]. *FEBS Open Bio*, 2012, 2: 298-304.
- [37] BINDAL S, SHARMA S, SINGH T P, et al. Evolving transpeptidase and hydrolytic variants of gamma-glutamyl transpeptidase from *Bacillus*

- licheniformis* by targeted mutations of conserved residue Arg109 and their biotechnological relevance [J]. *J Biotechnol*, 2017, 249: 82–90.
- [38] MINAMI H, SUZUKI H, KUMAGAI H. A mutant *Bacillus subtilis* gamma-glutamyltranspeptidase specialized in hydrolysis activity [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 224(2): 169–173.
- [39] ONG P L, YAO Y F, WENG Y M, et al. Residues Arg114 and Arg337 are critical for the proper function of *Escherichia coli* gamma-glutamyltranspeptidase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366(2): 294–300.
- [40] TAKAO H, MASASHI I, YOICHIRO S, et al. Crystal structure analysis and enzymatic characterization of gamma-glutamyltranspeptidase from *Pseudomonas nitroreducens*[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(2): 262–269.
- [41] SHUAI Y, ZHANG T, MU W, et al. Purification and characterization of gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* SK11.004 [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(11): 6233–6238.
- [42] 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.
- PENG Q, YAO Z, ZHOU Z, et al. Improving pH stability and catalytic activity of γ -glutamyltranspeptidase by site-directed mutation [J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese*, 2016, 30(1): 133–141.
- [43] HU H Y, YANG J C, CHEN J H, et al. Enzymatic characterization of *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyltranspeptidase fused with *N*-terminally truncated forms of *Bacillus* sp. TS-23 alpha-amylase [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2012, 51(2): 86–94.
- [44] CHO H B, AHN J H, YANG H G, et al. Effects of pH and NaCl on hydrolysis and transpeptidation activities of a salt-tolerant gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus amyloliquefaciens* S0904[J]. *Food Sci Biotechnol*, 2021, 30(6): 853–860.
- [45] PICA A, RUSSO KRAUSS I, CASTELLANO I, et al. Effect of NaCl on the conformational stability of the thermophilic gamma-glutamyltranspeptidase from *Geobacillus thermodenitrificans*: Implication for globular protein halotolerance[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1834(1): 149–157.
- [46] YANG T, IRENE K, LIU H, et al. Enhanced extracellular gamma glutamyl transpeptidase production by overexpressing of PrsA lipoproteins and improving its mRNA stability in *Bacillus subtilis* and application in biosynthesis of *L*-theanine[J]. *J Biotechnol*, 2019, 302: 85–91.
- [47] LI Q, LIU J, DE GOBBA C, et al. Production of taste enhancers from protein hydrolysates of porcine hemoglobin and meat using *Bacillus amyloliquefaciens* gamma-glutamyltranspeptidase[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(42): 11782–11789.
- [48] 周治, 姚忠, 徐虹, 等. 固定化 γ -谷氨酰转肽酶的催化特性研究[J]. *现代化工*, 2009, 29(S2): 147–149, 151.
- ZHOU Z, YAO Z, XU H, et al. Catalytic properties of immobilized γ -glutamyltranspeptidase from *B. subtilis* NX-2 [J]. *Modern Chemical Industry*, 2009, 29(S2): 147–149, 151.
- [49] 韦敏, 姚忠, 叶丽静, 等. 载体两性电解质修饰对固定化 γ -谷氨酰转肽酶 pH 耐受性和催化活性的影响[J]. *生物加工过程*, 2016, 14(4): 37–42.
- WEI M, YAO Z, YE L L, et al. Improving pH tolerance and catalytic peoperties of immobilized γ -glutamyltranspeptidase by coated with carrier ampholyte[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2016, 14(4): 37–42.
- [50] LIN L L, CHI M C, LAN Y J, et al. Facile immobilization of *Bacillus licheniformis* gamma-glutamyltranspeptidase onto graphene oxide nanosheets and its application to the biocatalytic synthesis of gamma-L-glutamyl peptides[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 117: 1326–33.
- [51] BRUNI M, ROBESCU D M S, UBIALI P D, et al. Immobilization of γ -glutamyl transpeptidase from equine kidney for the synthesis of kokumi compounds [J]. *J Chem Cat Chem*, 2020, 12(1): 210–218.

Research Progress on Catalytic Properties of γ -Glutamyl Transpeptidase

Liao Jianhong^{1,2}, Yang Juan^{1,2}, Zeng Xiaofang^{1,2}, Bai Weidong^{1,2}, Liang Jinglong^{1,2*}

(¹Guangdong Provincial Key Laboratory of Lingnan Specialty Food Science and Technology, College of Light Industry and Food, Zhongkai University of Agricultural Engineering, Guangzhou 510225

²Key Laboratory of Green Processing and Intelligent Manufacturing of Lingnan Characteristic Food, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Light Industry and Food, Zhongkai University of Agricultural Engineering, Guangzhou 510225)

Abstract γ -Glutamyl transpeptidase (GGT) widely exists in a variety of organisms in nature, has transpeptidation and hydrolysis activities, and can synthesize γ -glutamyl amino acids/polypeptides according to different substrate conditions. Substances have attracted the attention of the food industry, pharmaceutical synthesis and other industries because they can be used as flavor enhancers or biological actives. There are abundant GGT resources in bacteria. In this paper, the structural characteristics, properties, catalytic reaction characteristics and related product characteristics of γ -glutamyl transpeptidase were reviewed in order to explore the potential of bacterial GGT and provided reference for future research prospects.

Keywords γ -glutamyltranspeptidase; catalytic properties; γ -glutamyl peptide

新型物理改性技术改善植物蛋白加工特性研究进展

李闪闪¹, 刘哲¹, 职兰懿¹, 田艳杰^{1,3}, 刘红芝^{1,2,3}, 石爱民^{1,2*}, 王强^{1,2,3}

¹中国农业科学院农产品加工研究所 农业农村部农产品加工综合性重点实验室 北京 100193

²南京财经大学食品科学与工程学院 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心 南京 210023

³青岛农业大学食品科学与工程学院 山东青岛 266109)

摘要 植物蛋白相对于动物源性蛋白更加健康,并且更容易被人体消化和吸收,由此获得大量的市场需求。然而,植物蛋白较低的溶解性等加工特性,限制了其在食品中的应用。因具有更好功能特性的蛋白质的需求不断增加,故需应用不同热处理和非热处理的物理加工技术来修饰植物蛋白质。新型物理加工技术在植物蛋白质改性中可以替代低能效、高强度热处理的加工方法。本文综述新型物理改性方法用于植物蛋白质功能修饰的机理以及对蛋白质功能特性的影响,旨在为后续工业加工中提升植物蛋白附加值提供理论参考。

关键词 植物蛋白; 新型物理改性; 溶解性; 功能特性

文章编号 1009-7848(2023)11-0413-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.11.039

植物蛋白具可持续性、低成本、广泛可用性和消费者可接受性等优点,在食品和制药行业受到越来越多的关注。目前植物蛋白被用来替代肉类(肉类似物)、鸡蛋(绿豆蛋白分离物)和其它乳制品(素食奶酪)。然而,一些植物源性蛋白质由于其功能性(溶解性、乳化性、起泡性等)、消化率、生物活性较差等原因在食品领域中的应用有限^[1]。因此,通过对植物蛋白进行改性修饰来提高其功能特性,对植物蛋白的应用具有重要意义。

常用的蛋白改性方法主要有物理方法、化学方法和酶法改性。化学方法工艺相对复杂,并存在一定的不安全性。宋旻等^[2]使用微波辅助糖基化的方法改性大豆分离蛋白,虽然改性后的样品乳化性及乳化稳定性均得到提高,但是存在安全隐患,大部分化学改性还仅处于实验室阶段。酶法处理成本较高,较难实现产业化。Shi 等^[3]用酶法改性核桃分离蛋白的效果较好,然而酶价格昂贵,不适合工业化生产。相比之下,采用物理改性方法进行植

物蛋白修饰,既不会引入化学试剂也不需要较高的成本,适用于工业化生产。然而,传统的热处理、高速搅拌、挤压处理等用于修饰植物蛋白结构的物理方法,会导致植物蛋白永久变性或者聚集,丧失蛋白质的二、三级结构和功能,损害蛋白质的营养和感官特性^[4]。新型物理处理技术如超高压处理、超声波、高压微射流、微波、射频、低温等离子体、超微粉碎和脉冲电场等,被认为是“未来新兴的高潜力新型物理改性方法”^[5]。

本文综述新型物理处理技术的改性机理及其对蛋白功能特性的影响,以期为提高植物蛋白资源的高效利用和经济价值提供理论依据。

1 新型物理改性技术机理

新型物理改性技术由于其在最小化营养损失、食品安全和能源效率方面的优点,有望取代食品蛋白质改性领域中较低能源效率和强烈的热处理^[5-6]。这些新型物理处理技术通过破坏蛋白质分子之间的各种相互作用(疏水和静电相互作用、氢键、二硫键和盐桥)来改变蛋白质结构(二级、三级和四级),导致蛋白质发生功能性变化^[4,7]。

1.1 电磁辐射处理

利用电场和电磁波对蛋白质进行改性,蛋白质极性基团能够吸收能量产生自由基或引起蛋白质的聚集和解聚是其主要原理。因为自由基的存在可以破坏蛋白质分子之间的各种相互作用,如

收稿日期: 2022-11-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172149);中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2021-IFST-02);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2022QC11);自治区重点研发计划-厅厅联动专项(2022B02048)

第一作者: 李闪闪,女,硕士生

通信作者: 石爱民 E-mail: shiaimin@caas.cn