史冠莹, 高文雨, 张乐, 等. 地衣芽孢杆菌 γ-谷氨酰转肽酶的性质及其在 γ-谷氨酰-S-烯丙基-L-半胱氨酸合成中的应用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(18): 163−171. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070361

SHI Guanying, GAO Wenyu, ZHANG Le, et al. Enzymatic Properties of γ-Glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis* and Its Application in the Synthesis of γ-Glutamyl-S-allyl-L-cysteine[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(18): 163−171. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070361

· 食品微生物与生物制造 ·

地衣芽孢杆菌 γ-谷氨酰转肽酶的性质及其在 γ-谷氨酰-S-烯丙基-L-半胱氨酸合成中的应用

史冠莹[1], 高文雨[2], 张　乐[1], 蒋鹏飞[1], 赵丽丽[1], 史宇婷[1], 肖作兵[1,3], 王赵改[1,*]

（1.河南省农业科学院农副产品加工研究中心, 河南郑州 450002;
2.郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南郑州 450000;
3.上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240）

摘　要: 为实现 γ-谷氨酰-S-烯丙基-L-半胱氨酸（γ-Glutamyl-S-allyl-L-cysteine，GSAC）的酶法合成，本研究通过地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）发酵、硫酸铵沉淀初步纯化得到 γ-谷氨酰转肽酶（BlGGT），并对其酶学性质进行了表征。接着以 L-谷氨酰胺（L-Gln）为供体、S-烯丙基-L-半胱氨酸（S-allyl-L-cysteine，SAC）为受体，通过单因素及正交试验对 BlGGT 催化合成 GSAC 的工艺进行了优化。结果表明，BlGGT 的转肽和水解活性最适温度均为 55 ℃，转肽反应最适 pH 为 9.0，水解反应最适 pH 为 7.0，金属离子 Zn^{2+}对 BlGGT 的转肽和水解活性均有显著的增强作用（$P<0.05$），Mg^{2+}和 Ca^{2+}也可显著增强 BlGGT 的转肽活性（$P<0.05$），而 Cu^{2+}、Fe^{3+}和 Mn^{2+}则对 BlGGT 的转肽和水解活性具有明显抑制作用。确定催化合成 GSAC 的最佳反应条件为：酶浓度 1 mg/mL，供体 L-Gln 与受体SAC摩尔比 1∶3，反应温度 60 ℃，反应 pH 为 10.0，反应时间 6 h。在该优化条件下，GSAC 的转化率达到 19.10%±0.11%。本研究明确了 BlGGT 的酶学特性，并建立了 GSAC 的生物酶法合成工艺，为 GSAC 的高效合成提供了理论依据和技术支撑。

关键词: γ-谷氨酰转肽酶, 酶学性质, γ-谷氨酰-S-烯丙基-L-半胱氨酸, 酶促合成, 正交试验

中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)18−0163−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070361

本文网刊:

Enzymatic Properties of γ-Glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis* and Its Application in the Synthesis of γ-Glutamyl-S-allyl-L-cysteine

SHI Guanying[1], GAO Wenyu[2], ZHANG Le[1], JIANG Pengfei[1], ZHAO Lili[1], SHI Yuting[1], XIAO Zuobing[1,3], WANG Zhaogai[1,*]

（1.Agricultural Products Processing Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;
2.College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450000, China;
3.School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China）

Abstract: To achieve the enzymatic synthesis of γ-glutamyl-S-allyl-L-cysteine (GSAC), γ-glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis* (BlGGT) was obtained through fermentation followed by ammonium sulfate precipitation, and its enzymatic properties were characterized. Using L-glutamine (L-Gln) as the γ-glutamyl donor and S-allyl-L-cysteine (SAC) as the acceptor, the reaction conditions for BlGGT-catalyzed synthesis of GSAC were optimized via single-factor and orthogonal experiments. The results showed that the optimal temperature for both transpeptidation and hydrolytic activities

收稿日期: 2025−07−30

基金项目: 河南省重点研发专项（241111111100）; 河南省农业科学院新兴学科发展专项（2025XK04）。

作者简介: 史冠莹（1984−）, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: 250487127@qq.com。

*** 通信作者:** 王赵改（1980−）, 女, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品贮藏与加工, E-mail: zgwang1999@126.com。

of BlGGT was 55 ℃. The optimal pH for the transpeptidation reaction was 9.0, whereas that for the hydrolysis reaction was 7.0. The metal ions Zn^{2+} significantly enhanced both the transpeptidation and hydrolytic activities of BlGGT (P<0.05), Mg^{2+} and Ca^{2+} also significantly promoted transpeptidation activity (P<0.05), while Cu^{2+}, Fe^{3+} and Mn^{2+} exhibited significant inhibitory effects on both activities (P<0.05). The optimal reaction conditions for GSAC synthesis were determined as follows: BlGGT concentration of 1 mg/mL, molar ratio of L-Gln to SAC of 1∶3, reaction temperature of 60 ℃, pH10.0, and reaction time of 6 h. Under these optimized conditions, the conversion yield of GSAC reached 19.10%±0.11%. The present study elucidated the enzymatic characteristics of BlGGT and established an efficient enzymatic process for GSAC synthesis, providing a theoretical foundation and technical support for the high-yield production of GSAC.

Key words: γ-glutamyltranspeptidase; enzymatic properties; γ-glutamyl-S-allyl-L-cysteine; enzymatic synthesis; orthogonal experiments

γ-谷氨酰转肽酶(γ-glutamyl transpeptidase, GGT, E.C.2.3.2.2)是一类重要的转移酶, 能够特异性催化 γ-谷氨酰肽中 γ-谷氨酰键的水解, 并将 γ-谷氨酰基团转移到氨基酸、肽或水分子等受体上[1]。该酶广泛分布在细菌、植物和哺乳动物等生物体中, 在谷胱甘肽(Glutathione, GSH)代谢中发挥关键作用。相较于植物或哺乳动物来源的 GGT, 细菌源 GGT 是可溶性非糖基化蛋白, 更易于在原核表达系统中实现高效表达与分离纯化, 同时对 γ-谷氨酰受体表现出更广泛的底物选择性[2−3], 因此, 近年来细菌源 GGT 已被国内外研究者广泛作为生物催化剂, 通过转肽反应合成各种高附加值的 γ-谷氨酰基化合物, 如茶氨酸、γ-D-谷氨酰-L-色氨酸以及 γ-谷氨酰苯丙氨酸等功能性化合物[4−6]。

尽管 GGT 在 γ-谷氨酰基类化合物的合成中展现出巨大潜力, 但其在含硫氨基酸, 尤其是 S-取代半胱氨酸类化合物的催化研究仍处于初步探索阶段。目前, 关于 GGT 催化合成 γ-谷氨酰-S-烯丙基-L-半胱氨酸(GSAC)的报道极为有限。GSAC 是大蒜中主要的含硫化合物之一, 占其干重的 0.4%~2.5%[7]。具有抗氧化[8]、抗糖基化[9], 以及抑制肝星状细胞增殖[10] 等多种生物活性。GSAC 作为 S-烯丙基-L-半胱氨酸(SAC)和 S-烯丙基-L-半胱氨酸亚砜(ACSO, 即蒜氨酸)的前体物质, 在大蒜次级代谢过程中可经蒜氨酸酶催化迅速转化为具有强烈生理活性的大蒜素(Allicin), 因此 GSAC 对大蒜特征风味形成、生物活性及加工品质具有重要作用。然而大蒜中的 GSAC 含量受品种、生长环境以及贮藏加工条件等因素的影响较大, 且从植物中提取 GSAC 工艺复杂、得率低、成本高。化学合成虽可实现 GSAC 的制备, 但往往伴随多种异构体副产物的生成, 增加了后续纯化难度, 难以满足食品与医药领域的需求[11]。相比之下, 利用 GGT 催化的转肽反应合成 GSAC, 可在温和条件下实现高效合成, 避免了异构体的生成, 是实现 GSAC 绿色合成制备的理想途径。

本研究以地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)来源的 γ-谷氨酰转肽酶(BlGGT)为研究对象, 系统考察其酶学性质及在 GSAC 生物合成中的应用潜力。首先测定了不同反应温度、pH 以及金属离子等因素对 BlGGT 转肽和水解活性的影响, 并分析了该酶对不同底物的催化特异性。进一步采用高效液相色谱法(HPLC)定量检测反应体系中 SAC 和 GSAC 的含量变化, 通过单因素和正交试验对 BlGGT 催化合成 GSAC 的工艺条件进行优化, 系统考察酶浓度、反应温度、pH、供体与受体摩尔比以及反应时间等对 GSAC 转化率的影响, 以提高 GSAC 转化率。本研究不仅阐明了 BlGGT 的酶学催化特性, 还建立了高效、稳定的 GSAC 酶法合成体系, 为高附加值的大蒜含硫化合物的绿色酶法制造提供了新的技术方案。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) 中国农业微生物菌种保藏管理中心(保藏号: ACCC 06149); 种子液培养基 葡萄糖 20 g/L, 酵母膏 15 g/L, $MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, pH 调至 7.0; 发酵液培养基 乳糖 8 g/L, 胰蛋白胨与黄豆粉(1∶1 混合)15 g/L, $MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, pH 调至 7.5; L-γ-谷氨酰-对硝基苯胺水合物(标准品)、对硝基苯胺(分析纯) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 双甘氨肽(Gly-Gly, 分子生物学级)、三羟基甲烷(Tris, 分子生物学级)、透析袋(MD25) 北京索莱宝科技有限公司; S-烯丙基-L-半胱氨酸(SAC, 标准品) 上海麦克林生化科技股份有限公司; S-谷氨酰-烯丙基-L-半胱氨酸(GSAC, 标准品) 上海融禾医药科技发展有限公司; 葡萄糖、乳糖、牛肉粉、酵母浸粉、酵母膏、硫酸铵、L-甲硫氨酸(L-Met)、L-赖氨酸(L-Lys)、L-苯丙氨酸(L-Phe)、甘氨酸(Gly)、L-脯氨酸(L-Pro)、L-半胱氨酸(L-Cys)、DL-丙氨酸(DL-Ala)、L-谷氨酸(L-Glu)、L-谷氨酰胺(L-Gln)、谷胱甘肽(GSH)等试剂 均为国产生物或分析纯试剂。

YXQ-LS-70A 立式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司; SJ-CJ-2FD 双面净化工作台 苏州洁净化工设备有限公司; GHP-9160 隔水式恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司; GENESYS10S 紫外可见分光光度计 赛默飞世尔科技公司; Agilent 1260 Infinity Ⅱ液相色谱 美国安捷伦公司。

1.2　实验方法

1.2.1　粗酶液的提取　采用无菌接种环刮取实验室活化平板上的地衣芽孢杆菌，接种至种子液培养基中（50 mL 种子液/250 mL 三角瓶），于 37 ℃、180 r/min 的恒温摇床中培养 24 h。然后按照 5% 的接种量将种子液转移至发酵培养基（50 mL 发酵液/250 mL 三角瓶）中，在相同条件下继续培养 24 h。培养结束后将发酵菌液以 8000 r/min 在 4 ℃ 条件下离心 10 min，收集上清液，得到 BlGGT 粗酶液。

1.2.2　酶的分离纯化　采用硫酸铵沉淀法[12] 分离纯化 BlGGT，在 4 ℃ 的层析柜中，取一定体积的粗酶液，缓慢加入硫酸铵固体粉末，同时对其进行磁力搅拌直至完全溶解，使其达到一定的饱和度（20%~80%）。将混合后的溶液在层析柜中静置过夜后收集沉淀。将沉淀用 Tris-HCl 缓冲液（50 mmol/L，pH8.0）溶解，测定沉淀复溶物的酶活性及蛋白质含量。

选择截留分子量为 8~14 kDa 的透析袋（MD25）进行透析除盐[13]，使用 Tris-HCl 缓冲液（50 mmol/L，pH8.0）作为透析液，在 4 ℃ 条件下每 2 h 更换一次透析液。当透析液无颜色时，取 1 mL 透析后的液体加入 10% $BaCl_2$ 检测，若无沉淀产生，则透析结束。将透析后的酶液进行冷冻干燥，得到 BlGGT 酶冻干粉保存备用。

1.2.3　酶活性及蛋白质含量的测定

1.2.3.1　GGT 酶活测定方法　以 L-γ-谷氨酰-对硝基苯胺为供体、双甘氨肽（Gly-Gly）为受体进行反应，通过测定反应产物对硝基苯胺的浓度计算酶活[3]。具体操作为取 2.5 mL 工作液（含 0.1 mol/L Tris-HCl 1.3 mL，0.1 mol/L Gly-Gly 0.6 mL，5 mmol/L L-γ-谷氨酰-对硝基苯胺 0.6 mL，现配现用）于具塞试管中，加入 0.5 mL 适当稀释的 BlGGT 酶液，充分混匀，于 37 ℃ 恒温水浴中反应 30 min 后，立即加入 2 mL 2 mol/L 的乙酸，以终止转肽反应。冷却至室温后，通过紫外-可见分光度计测定 410 nm 处的吸光值，根据标准曲线计算样品的 GGT 转肽酶活。GGT 水解酶活测定方法同上述测定步骤，但在工作液中不添加 Gly-Gly 受体底物，其余操作一致[14]。

1.2.3.2　GGT 酶活计算　在 37 ℃、pH 为 8.0 的反应条件下，每分钟催化生成 1 μmol 对硝基苯胺所需的酶量定义为 1 个酶活力单位（U），以此作为酶活测定的标准。

$$U = \frac{C \times V \times n}{T} \times f$$

其中，C 为反应体系中对硝基苯胺浓度（μmol/mL）；V 为反应体积（mL）；n 为总酶液与所用酶液的体积比；T 为反应时间（min）；f 为样品加入反应体系前的稀释倍数。

蛋白含量测定：根据牛血清白蛋白标准曲线，采用 Bradford 蛋白测定试剂盒（PC0010）测定蛋白质含量。

1.2.4　酶学性质的测定

1.2.4.1　最适反应温度　在 pH 为 8 的条件下，分别选择 25、30、35、40、45、50、55、60 ℃ 温度下，测定 BlGGT 的转肽和水解活性。以最高酶活力为 100%，计算其他温度条件下的相对酶活力，测定结果通过最大酶活的百分比表示。

1.2.4.2　最适反应 pH　在温度 55 ℃ 的条件下，分别测定 BlGGT 在不同 pH（4.0~10.0）反应缓冲液中的转肽和水解活性。以最高酶活力为 100%，计算其他 pH 条件下的相对酶活力，测定结果通过最大酶活的百分比表示。

1.2.4.3　金属离子对酶活性的影响　在最适反应温度和 pH 的条件下，分别测定 BlGGT 在 10 mmol/L 的 Ba^{2+}、Zn^{2+}、Mg^{2+}、K^{+}、Na^{+}、Ca^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+}、Mn^{2+}金属离子存在下的转肽和水解活性，以不添加金属离子时的酶活力为 100%，计算各金属离子存在条件下的相对酶活力。

1.2.4.4　底物特异性研究　在最适反应温度和 pH 的条件下，分别测定 BlGGT 对不同底物受体 SAC、L-Met、L-Lys、L-Phe、Gly、L-Pro、L-Cys、DL-Ala、L-Glu 的转肽酶活性，以酶活测定中 Gly-Gly 作为受体时的转肽酶活力为 100%，其他受体测得的转肽酶活与之对比后所得百分比表示为相对酶活力。

1.2.5　反应体系中 SAC 和 GSAC 含量的检测方法　采用高效液相色谱（HPLC）法同时测定反应体系中 SAC 和 GSAC 的含量[15]，色谱柱为安捷伦 ZORBAX SB-C18（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为含 0.1% 磷酸水溶液-甲醇（70∶30，v/v），流速为 0.8 mL/min，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL，检测波长为 205 nm，分析时间 10 min。分别精密称取 SAC 和 GSAC 标准品各 2.0 mg，用 30% 甲醇溶解并定容至 10 mL，得到 200 μg/mL 的单标储备液。取等体积两种单标液混合，配制成 SAC 和 GSAC 质量浓度均为 100 μg/mL 的混合标准储备液。再用 30% 甲醇逐级稀释，得到 20.0、40.0、60.0、80.0 和 100.0 μg/mL 的系列混合标准工作溶液。按上述色谱条件进行分析，以各物质的质量浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，分别绘制标准曲线。供试样品反应液冷却至室温后，经 0.45 μm 尼龙微孔滤膜过滤，用 30% 甲醇稀释至标准曲线线性范围内，按相同色谱条件进行测定，采用外标法计算 SAC 和 GSAC 含量。

GSAC 的转化率表示为：

$$\text{GSAC转化率}(\%) = \frac{C2}{C1} \times 100$$

其中，C1 为反应底物 SAC 的摩尔数（mmol）；C2 为反应产物 GSAC 的摩尔数（mmol）。

1.2.6　BlGGT 催化合成 GSAC 的反应条件优化

1.2.6.1　酶浓度对 GSAC 转化率的影响　在 100 mmol/L 的 SAC 和 100 mmol/L 的 L-Gln 各 200 μL 的反

应体系中，分别加入 0.5、1、5、10、15 mg/mL 不同浓度的 BlGGT 酶液 200 μL，在37 ℃、pH8.0 的条件下恒温水浴反应 30 min，沸水浴 10 min 终止反应，通过 HPLC 对反应底物 SAC及产物 GSAC 浓度进行检测分析。

1.2.6.2 反应温度对 GSAC 转化率的影响 在 100 mmol/L 的 SAC 和 100 mmol/L 的 L-Gln 各 200 μL 的反应体系中，添加 1 mg/mL 的 BlGGT 酶液 200 μL，pH 调至 8.0，分别在 25、30、40、50、60 ℃温度下恒温水浴反应 30 min，沸水浴 10 min 终止反应，通过 HPLC 对反应底物 SAC 及产物 GSAC 浓度进行检测分析。

1.2.6.3 反应 pH 对 GSAC 转化率的影响 在 100 mmol/L 的 SAC 和 100 mmol/L 的 L-Gln 各 200 μL 的反应体系中，添加 1 mg/mL 的 BlGGT 酶液 200 μL，pH 分别调至 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0，于 50 ℃ 恒温水浴反应 30 min，沸水浴 10 min 终止反应，通过 HPLC 对反应底物 SAC 及产物 GSAC 浓度进行检测分析。

1.2.6.4 供体-受体摩尔比对 GSAC 转化率的影响 在供体(L-Gln)/受体(SAC)摩尔比分别为 1∶1、1∶2、1∶3、1∶4、1∶5 的反应体系中，添加 1 mg/mL 的 BlGGT 酶液 200 μL，在 50 ℃、pH10.0 的条件下恒温水浴反应 30 min，沸水浴 10 min 终止反应，通过 HPLC 对反应底物 SAC 及产物 GSAC 浓度进行检测分析。

1.2.6.5 反应时间对 GSAC 转化率的影响 在供体(L-Gln)/受体(SAC)摩尔比 1∶1 的反应体系中，添加 1 mg/mL 的 BlGGT 酶液 200 μL，pH 调至 10.0，在 50℃ 下恒温水浴反应 0.5、1、2、4、6、8、10 h 后定时取样，沸水浴 10 min 终止反应，通过 HPLC 对反应底物 SAC 及产物 GSAC 浓度进行检测分析。

1.2.6.6 GSAC 转化率正交试验设计 在单因素实验基础上，为优化 GSAC 合成的工艺条件，将 GSAC 转化率作为指标，以 A-供受体摩尔比，B-反应时间，C-反应温度作为影响因素，选用 $L_9(3^4)$正交设计，进行 9 次实验，正交试验因素与水平见表 1。

表 1 正交试验因素及水平

Table 1 Orthogonal test factors and levels

水平/因素	A供受体摩尔比	B反应时间(h)	C反应温度(℃)
1	1∶1	2	40
2	1∶2	4	50
3	1∶3	6	60

1.3 数据处理

所有实验均独立重复 3 次，实验结果以平均值±标准差表示。采用 SPSS 26.0 软件中的单因素方差分析(One-way ANOVA)进行差异显著性分析，不同小写字母表示样品差异显著(P<0.05)。采用 Origin 2022 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 酶的分离纯化

硫酸铵在水中的溶解度高，能形成高浓度盐溶液，有利于蛋白质的分级沉淀，且操作简便，价格较低，可通过透析从蛋白质溶液中去除，此外硫酸铵在一定浓度下对蛋白质的结构影响较小，可防止蛋白质的变性[16]。各种蛋白质的溶解度不同，因而可利用不同饱和度的硫酸铵使杂蛋白析出，从而实现粗酶的纯化。

如图 1 粗酶液的硫酸铵沉淀曲线所示，当硫酸铵饱和度在 20%~30% 阶段时，虽有部分蛋白析出，但比酶活较低。当硫酸铵饱和度升至 30%~50% 时，比酶活呈快速上升趋势，且在硫酸铵饱和度为 50% 时达到最高 4.26 U/mg。随后继续升高硫酸铵饱和度至 50%~80%，比酶活则迅速下降。因此选择 30%~50% 硫酸铵饱和度作为 BlGGT 粗酶液分离纯化的分级沉淀条件，即先采用硫酸铵饱和度 30% 作为一级沉淀，除去部分杂蛋白，再将硫酸铵饱和度升至 50% 进行二级沉淀，从而获得较高比酶活的目标 GGT 蛋白。

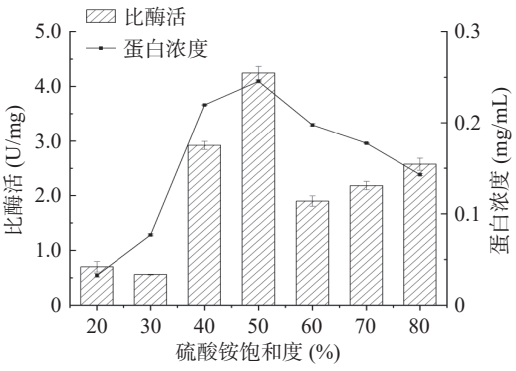


图 1 硫酸铵沉淀曲线

Fig.1 Ammonium sulphate precipitation curve

采用硫酸铵沉淀法分离蛋白时沉淀中会含有大量的硫酸铵，因此，需要对得到的沉淀物进行除盐。以 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)作为透析液，截留分子量为 8~14 kDa 的透析袋，在 4 ℃ 的条件下对盐析得到的沉淀复溶液进行透析脱盐处理，最后将处理后的酶液进行冷冻干燥保存。

2.2 酶学性质的测定

2.2.1 最适反应温度 反应温度是影响酶催化效率与蛋白质构象稳定性的关键因素之一。据报道，GGT 活性的较适宜温度范围在 37~60 ℃ 之间[3]。本试验结果如图 2 所示，BlGGT 的转肽和水解活性均随着温度上升呈现出先升高再降低的变化趋势，并在 55 ℃ 时达到最高。这是因为在温度升高初期，酶与底物分子的热运动加剧，平均动能增大，分子间有效碰撞频率提高，从而加快了反应速率，使酶活力持续提升。然而当温度超过 55 ℃ 后，酶蛋白的三维空间结构因热能开始受到破坏，尤其是催化活性中心的构象发生改变，从而导致底物结合能力与催化效能迅

速下降，酶活性也随之降低[17]。值得注意的是，BlGGT 在 45~60 ℃ 均能维持 50% 以上的相对酶活力，显示出该酶具有一定的热稳定性，这一特性对其在工业催化应用中受到温度波动仍保持高效而稳定的催化效率至关重要。

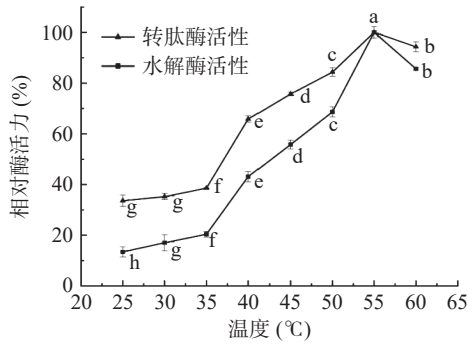


图 2　反应温度对酶活的影响

Fig.2　Effect of reaction temperature on enzyme activity

注：不同小写字母表示样品组间差异显著（P<0.05）；图 3~图 5、图 7~图 11。

2.2.2　最适反应 pH　大多数酶的活性受 pH 影响较大，如图 3 所示，在 pH4.0~10.0 范围内，BlGGT 的转肽和水解活性均随 pH 升高呈现先上升再下降的趋势，但二者的最适 pH 显著不同。其转肽活性在 pH 为 9.0 时达到最高，而水解活性在 pH 为 7.0 时最高。这一差异主要源于 pH 变化对酶活性中心关键氨基酸残基及底物分子的解离状态的调控作用[18]。在酸性条件下（pH<7），GGT 活性中心的碱性氨基酸残基质子化而带正电荷，与同样带正电的氨基酸底物之间产生排斥，阻碍了转肽反应的进行。此时不带电荷的水分子更易接近活性中心，因而水解反应占主导。当 pH>7 的碱性条件时，GGT 活性中心碱性氨基酸残基去质子化转为中性或带负电荷，有利于结合带正电的氨基酸底物，使转肽反应速率远高于水解反应，因此转肽活性显著升高。基于以上结果，在实际应用中，可通过调节反应体系的 pH，使 BlGGT 选择性地催化转肽或水解反应，满足不同生产需求[19]。

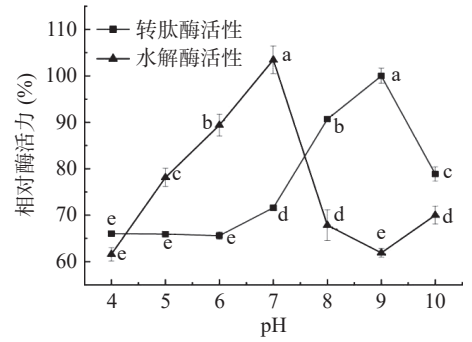


图 3　反应 pH 对酶活的影响

Fig.3　Effect of reaction pH on enzyme activity

2.2.3　金属离子对酶活的影响　金属离子可通过改变溶液离子强度影响氨基酸残基的电离状态，或与酶活性位点结合从而改变其空间构象，进而影响酶活性[20]。如图 4 所示，不同金属离子对 BlGGT 转肽与水解活性的影响存在明显差异。金属离子 Mg^{2+}、$Zn^{2+}$$Ba^{2+}$和 Ca^{2+}对 BlGGT 的转肽活性均表现出显著增强作用（P<0.05），相对酶活力分别提高至 110.83%、105.67%、104.93%、103.94%。此外，金属离子 Zn^{2+}也可显著提高 BlGGT 的水解活性（P<0.05），相对酶活力达到 106.07%。而 Cu^{2+}、Fe^{3+}、Mn^{2+}等金属离子则对 BlGGT 的转肽和水解活性表现出显著的抑制作用（P<0.05），尤其是添加 Mn^{2+}对 BlGGT 的水解活性抑制最强，导致其相对酶活力下降至 43.80%。

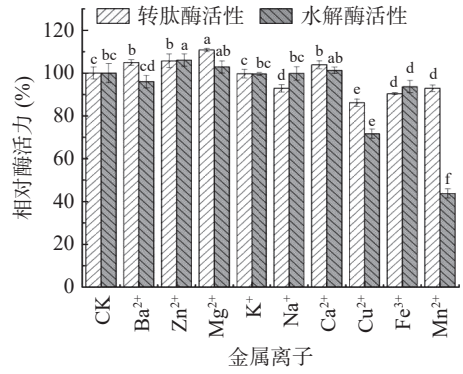


图 4　金属离子对酶活的影响

Fig.4　Effect of metal ions on enzyme activity

2.2.4　底物特异性研究　酶的活性中心具有高度的专一性，它们仅作用于特定的化合物或化学键，GGT 酶对 γ-谷氨酰基供体和各种氨基酸及肽受体表现出明显的选择性[21]。γ-谷氨酰基供体的主要功能是提供 γ-谷氨酰基，工业上通常会选择成本较低的化合物作为供体，而受体氨基酸或肽的性质，如电荷差异、侧链结构和空间位阻等，决定了生成的新型谷氨酰化合物的特性[22]。因此，以 L-γ-谷氨酰-对硝基苯胺作为供体，不同底物作为受体，测定 BlGGT 的催化活性。试验结果如图 5 所示，BlGGT 以 SAC 为受体时，相对酶活力为 85.47%，仍处于较高水平。相关研究表明，S-取代的半胱氨酸如 S-甲基和 S-烯丙基半胱氨酸也被证明是 GGT 的良好受体[23]。BlGGT 以碱性氨基酸（L-Lys）和芳香族氨基酸（L-Met、L-

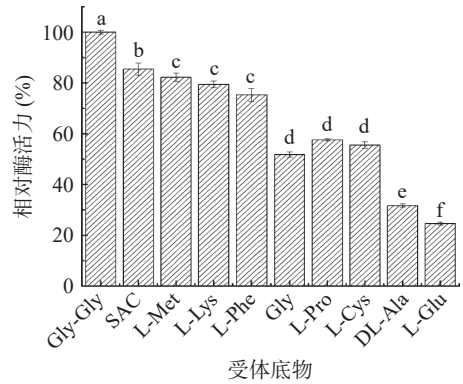


图 5　BlGGT 的受体底物特异性

Fig.5　Receptor substrate specificity of BlGGT

Phe)为受体时, 相对酶活力在 74.60%~79.00%; 以非极性氨基酸(Gly、L-Pro)和含硫氨基酸(L-Cys)为受体时, 相对酶活力在 54.90%~56.70%; 以非极性氨基酸(DL-Ala)为受体时, 相对酶活力为 31.73%; 以酸性氨基酸(L-Glu)为受体时, 相对酶活力仅为 23.50%。由此可见, BlGGT 能够接受多种底物作为 γ-谷氨酰基的受体, 进而催化形成多种不同的 γ-谷氨酰衍生物, 但其酶活力会受到空间位阻以及氨基酸的酸碱性的影响。

2.3 BlGGT 催化合成 GSAC 的反应条件优化

2.3.1 反应体系 SAC 和 GSAC 含量测定 按照 1.2.5 方法进行 HPLC 检测, 得到混合标准溶液的色谱图(图 6), SAC 出峰时间为 3.82 min, GSAC 出峰时间为 5.96 min。由表 2 可知, SAC 和 GSAC 标准曲线在 20.0~100.0 μg/mL 范围内线性关系良好, 决定系数 R^2 均大于 0.999, 满足检测要求。

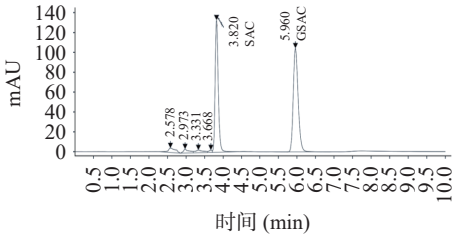


图 6 混合标准溶液的高效液相色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of the the mixed standards

表 2 线性回归结果

Table 2 Linear regression analysis

标准品	线性范围(μg/mL)	线性回归方程	决定系数R^2
SAC	20.0~100.0	y=9.8703x−11.9345	0.9991
GSAC	20.0~100.0	y=12.5094x−24.9710	0.9996

2.3.2 酶浓度对 GSAC 转化率的影响 催化反应产物的生成量会随着酶添加浓度变化而变化, 为了在实际工业生产中尽可能合成更多的目标产物, 且最大程度降低生产成本, 需要将催化反应体系中的酶浓度控制在适宜的水平[24]。如图 7 所示, 当反应体系中 BlGGT 浓度为 0.5 mg/mL 时, 底物 GSAC 的转化率较低为 1.32%, 随着反应体系中 BlGGT 浓度达到 1 mg/mL, GSAC 的转化率达到最高为 6.83%。当酶浓度高于 1 mg/mL 时, GSAC 的转化率持续下降, 这可能是因为当酶浓度过高时, 会发生自转肽反应, 生成其他副产物, 影响目标产物 GSAC 的合成。刘栓英等[6] 利用枯草芽孢杆菌 GGT 合成 γ-Glu-Phe 的研究中, 当酶量在 1 U/mL 左右时, 产物产量达到最高, 当 GGT 浓度过高时, 会发生自转肽反应, 从而生成谷氨酸等副产物, 导致产物产率大幅度下降。

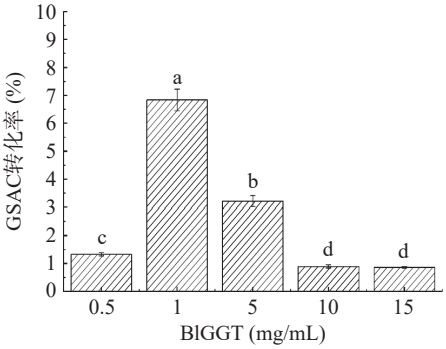


图 7 酶浓度对催化合成 GSAC 的影响

Fig.7 Effect of BlGGT concentration on GSAC synthesis

2.3.3 反应温度对 GSAC 转化率的影响 温度可以影响酶促反应速率, 从而影响催化合成产物的积累。在一定温度范围内, 随着温度的上升, 底物分子的动能显著增强, 使得更多底物分子达到活化所需的能量状态, 进而提高了分子间的有效碰撞频率, 从而加速反应的进行; 当超出酶的生理允许温度以上, 会加快酶的热失活速率, 减弱催化效果[25]。试验结果如图 8 所示, 在反应温度 25~60 ℃ 范围内, 随着反应温度的升高, 由于 BlGGT 酶的转肽活性不断增加, GSAC 转化率也逐渐升高, 在 50 ℃ 时, GSAC 转化率达到最高 7.72%。随后当温度继续升高到 60℃ 时, 由于高温使酶变得不稳定, 转肽活性下降, 导致产物 GSAC 的转化率有所下降。

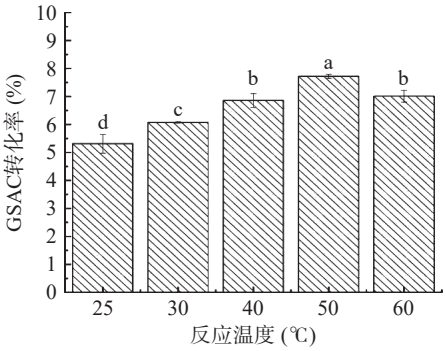


图 8 反应温度对催化合成 GSAC 的影响

Fig.8 Effect of reaction temperature on GSAC synthesis

2.3.4 反应 pH 对 GSAC 转化率的影响 由于 GGT 的催化机制是亲核取代, 而反应体系的 pH 通过影响蛋白质的空间构象、稳定性以及酶活性中心关键氨基酸残基的质子化状态, 从而影响 BlGGT 与供体底物 L-Gln 及受体底物 SAC 的结合。试验结果如图 9 所示, 随着反应体系 pH 的升高, 产物 GSAC 的

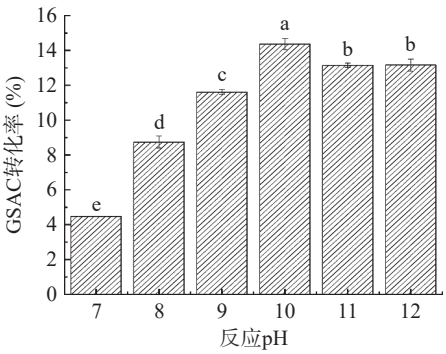


图 9 反应 pH 对催化合成 GSAC 的影响

Fig.9 Effect of reaction pH on GSAC synthesis

转化率呈现先升高后略有下降趋势，在 pH 为 10.0 时，GSAC 的转化率达到最高 14.37%。这与酶学性质测定中最适 pH 的单因素试验结果相一致，在 pH<10.0 时 BlGGT 表现出一定的水解活性，导致一部分底物 L-Gln 发生水解，GSAC 转化率处于较低水平。当 pH 为 10.0 时，BlGGT 的水解活性受到抑制，而转肽活性达到最高，因而 GSAC 的转化率显著提高。随后当 pH>10.0 时，BlGGT 的稳定性受到影响，导致转肽活性降低，GSAC 转化率有所下降。Suzuki 等[26] 以支链氨基酸、碱性氨基酸和芳香链氨基酸为受体，通过大肠杆菌 GGT 合成了多种 γ-谷氨酰肽，其合成的最佳条件 pH 为 10.0，本实验研究结果与之一致。

2.3.5　供体-受体摩尔比对 GSAC 转化率的影响　以 BlGGT 作为酶催化剂，作用于受体底物 SAC 和供体底物 L-Gln，催化合成 GSAC 是一个转肽化反应。已有研究表明，在 GGT 介导的转肽反应中，速率控制步骤是酰胺化-酶中间体向受体转移 γ-谷氨酰基团的过程[27]，因此，过量的供体底物 L-Gln 并不会显著提升 GSAC 的合成速率，这一结论在本研究的预试验中也得到了验证。值得注意的是，GGT 在催化转肽反应的同时，还可能发生水解或自转肽等副反应，有研究显示通过提高受体底物摩尔比有助于抑制 GGT 水解副反应，从而提高转肽反应产物得率[28]。然而本试验结果却呈现出相反趋势(图 10)，当反应体系中供体 L-Gln 与受体 SAC 的摩尔比为 1∶1 时，GSAC 的转化率最高为 14.82%，继续提高受体 SAC 摩尔比，反而导致产物 GSAC 的转化率急剧下降。推测该现象的原因可能是，随着反应进行，产物 GSAC 不断积累，理论上可作为 BlGGT 催化的 γ-谷氨酰供体，成为供体 L-Gln 的竞争性底物，不仅消耗目标产物，还干扰主反应动力学，反应体系的组成变得异常复杂，最终表现为 GSAC 的转化率下降[29]。汪前等[30] 的研究中也显示出类似的规律，当供/受体浓度过高时，GGT 催化转肽反应的产物收率反而降低。

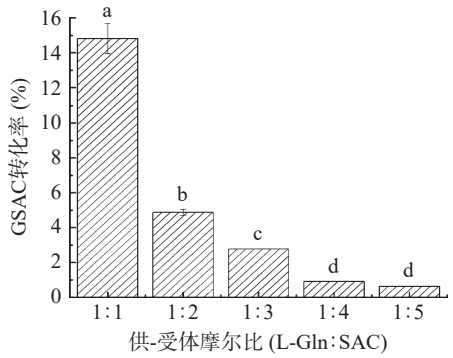


图 10　供体-受体摩尔比对催化合成 GSAC 的影响

Fig.10　Effect of donor-acceptor molar ratio on GSAC synthesis

2.3.6　反应时间对 GSAC 转化率的影响　由图 11 可以看出，随着反应时间的增加，反应产物 GSAC 的转化率呈现先升高后降低变化趋势，而受体底物 SAC 浓度则呈现先降低后升高变化趋势。在 0.5~4 h 内，随着反应体系中受体底物 SAC 的不断消耗，BlGGT 催化合成产物 GSAC，其转化率在 4 h 时达到最高 17.07%。而随着反应时间的不断延长，受体底物浓度持续降低，同时产物 GSAC 的积累浓度升高，从而抑制了催化反应向正反向进行，导致催化效率降低，GSAC 的转化率也随之降低。蔡爱丽等[31] 研究了反应时间对酶促酰化反应的影响，酰化率同样呈现先升高后降低的趋势，分析其原因与底物浓度在催化反应前期阶段较高，后期阶段逐渐减少有关。

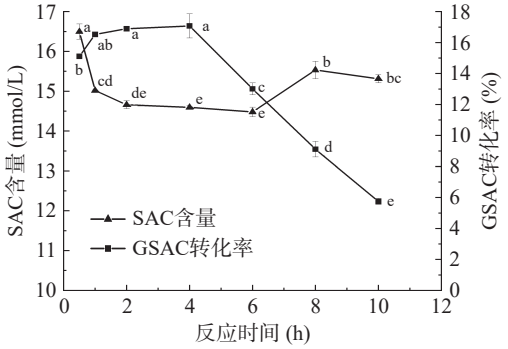


图 11　反应时间对催化合成 GSAC 的影响

Fig.11　Effect of reaction time on GSAC synthesis

2.3.7　GSAC 转化率正交试验结果　由表 3 中的极差分析可知，各因素对 GSAC 转化率影响的主次顺序为 A>C>B，即供受体摩尔比>反应温度>反应时间。通过 K 值分析得出最优组合为 $A_3B_3C_3$，即供受体摩尔比 1∶3，反应时间 6 h，反应温度 60 ℃。在此优化条件下，进行了三组平行验证试验，测得 GSAC 的平均产率为 19.10%±0.11%，与正交试验结果相近。值得注意的是，经正交试验优化后的反应温度与 pH 均高于该酶的最适温度(55 ℃)和最适 pH (9.0)。此差异主要是由于反应体系中所采用的受体

表 3　GSAC 合成条件优化正交试验结果

Table 3　Orthogonal test results of optimization of GSAC synthesis conditions

实验号	A供受体摩尔比	B反应时间 (h)	C反应温度 (℃)	GSAC转化率 (%)
1	1	1	1	12.27
2	2	2	2	13.56
3	3	3	3	19.00
4	1	2	3	11.04
5	2	3	1	12.73
6	3	1	2	15.70
7	1	3	2	10.67
8	2	1	3	14.32
9	3	2	1	14.20
均值k_1	11.36	14.13	13.10	
均值k_2	13.54	12.93	13.31	
均值k_3	16.30	14.14	14.79	
极差R	4.94	1.20	1.69	

与供体底物，与标准酶活测定体系完全不同，特定的底物可能通过影响酶蛋白的特定构象，或改变水解与转肽反应之间的平衡，最终导致其最适反应条件发生了偏移。

由表 4 方差分析得 A 供受体摩尔比对 GSAC 的转化率有显著影响（P<0.05），这是由于适当调整供受体比可以有效控制反应的平衡点，最大化产物的产量，酶促反应中酶的活性和底物结合亲和力受到供受体比例的影响[32]。

表 4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

因素	偏差平方和S	自由度f	F比	F临界值	显著性
A供受体摩尔比	36.79	2.00	7.40	5.14	显著
B反应时间	2.87	2.00	0.58	5.14	
C反应温度	5.07	2.00	1.02	5.14	
误差	14.92	6.00			

3 结论

本研究通过硫酸铵分级沉淀（30%~50% 饱和度）从地衣芽孢杆菌发酵液中成功分离纯化出 γ-谷氨酰转肽酶（BlGGT），酶学性质研究表明，该酶的转肽活性与水解活性具有相同的最适温度（55 ℃），但最适 pH 存在显著差异（分别为 9.0 和 7.0），此特性为通过调节反应体系 pH，引导 BlGGT 催化方向提供了理论依据。进一步研究表明，金属离子对 BlGGT 活性具有特异性调节作用，其中 Mg^{2+}、Zn^{2+}、和 Ca^{2+}均可显著（P<0.05）提高其转肽活性，Zn^{2+}对水解活性具有显著增强作用（P<0.05）。而 Cu^{2+}、Fe^{3+} 和 Mn^{2+}等则对 BlGGT 的转肽和水解活性表现出显著（P<0.05）的抑制作用。底物特异性分析显示，BlGGT 对 S-烯丙基-L-半胱氨酸（SAC）具有较高的催化效率，相对酶活力为 85.47%，显示出催化合成 GSAC 的良好潜力。基于此，通过单因素和正交试验，对 BlGGT 催化 SAC 合成 GSAC 反应进行了工艺优化，最终获得 GSAC 的最高转化率为 19.10%±0.11%。值得关注的是，研究中发现该反应体系优化得到的最优反应条件（60 ℃，pH10.0）与初始酶学性质表征的最适条件（55 ℃，pH9.0）存在一定的差异。同时，较高的 pH（10.0）环境可提高 GSAC 的转化率。本研究为利用微生物源 BlGGT 生物酶法合成大蒜风味前体 GSAC 提供了可行途径，但产物转化率仍有提升空间。后续研究将致力于通过蛋白质工程手段改造 BlGGT，增强其对 SAC 等特定底物的亲和力与催化效率，并稳定其在特定条件下的构象，以期获得更适合工业生产的高效酶制剂。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] CHI Mengchun, HUANG Yufen, LU Boyuan, et al. Magnetic cross-linked enzyme aggregates of a transpeptidase-specialized variant (N450D) of *Bacillus licheniformis* γ-glutamyl transpeptidase: An efficient and stable biocatalyst for l-theanine synthesis[J]. Catalysts, 2021, 11(2): 243.

[2] SAINI M, KASHYAP A, BINDAL S, et al. Bacterial gamma-glutamyl transpeptidase, an emerging biocatalyst: Insights into structure–function relationship and its biotechnological applications[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 641251.

[3] 张柯铭, 罗茜, 魏夏森, 等. γ-谷氨酰转肽酶的催化特性及其在食品领域应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(3): 304−313. [ZHANG K M, LUO X, WEI X S, et al. Research progress on catalytic properties of γ-glutamyl transpeptidase and its application in food industry[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(3): 304−313.]

[4] LI Zelong, ZHU Runtao, LIU Yongqi, et al. γ-Glutamyltranspeptidase from *Bacillus amyloliquefaciens*: Transpeptidation activity enhancement and L-theanine production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 140: 109644.

[5] SAINI M, BINDAL S, GUPTA R. Heterologous expression of γ-glutamyl transpeptidase from *Bacillus atrophaeus* GS-16 and its application in the synthesis of γ-d-glutamyl-l-tryptophan, a known immunomodulatory peptide[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2017, 99: 67−76.

[6] 刘栓英, 刘会灵, 龙梦飞, 等. γ-谷氨酰转肽酶高效表达及其催化合成 γ-谷氨酰苯丙氨酸[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(18): 23−29. [LIU S Y, LIU H L, LONG M F, et al. Optimized expression of γ-glutamyltranspeptidase for efficient biosynthesis of γ-glutamylphenylalanine[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 23−29.]

[7] LIU Pingxiang, WENG Rui, SHENG Xiaojing, et al. Profiling of organosulfur compounds and amino acids in garlic from different regions of China[J]. Food Chemistry, 2020, 305: 125499.

[8] 刘玲, 陈琅璐, 张瑶, 等. 大蒜烯丙基硫化物的分离鉴定及抗氧化性[J]. 农业工程学报, 2015, 31(12): 268−274. [LIU L, CHEN X L, ZHANG Y, et al. Isolation determination of garlic allyl sulfides and their antioxidant activity[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2015, 31(12): 268−274.]

[9] TAN Dehong, ZHANG Yao, CHEN Lulu, et al. Decreased glycation and structural protection properties of γ-glutamyl-S-allyl-cysteine peptide isolated from fresh garlic scales (*Allium sativum* L.)[J]. Natural Product Research, 2015, 29(23): 2219−2222.

[10] ZHANG Bimi, TAN Dehong, BAI Bing, et al. γ-Glutamyl-S-allyl-cysteine inhibits hepatic stellate cell proliferation and collagen secretion via a proapoptotic mechanism[J]. European Food Research and Technology, 2015, 240(6): 1271−1280.

[11] 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.

[12] 赵飞, 乔旭光. 大蒜 γ-谷氨酰转肽酶的分离纯化和部分酶学性质研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 41−45. [ZHAO F, QIAO X G. Isolation and purification of garlic γ-glutamyl transpeptidase and some enzymatic properties[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(1): 41−45.]

[13] SHUAI Yuying, ZHANG Tao, MU Wanmeng, et al. Purification and characterization of γ-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* $SK_{11.004}$[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(11): 6233−6238.

[14] SHI Guanying, GAO Wenyu, XIAO Zuobing, et al. Purification and characterization of γ-glutamyl transpeptidase from *Toona*

*sinensis*and its function on formation of sulfur-containing volatiles [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(47): 26376−26383.

[15] 卢连登, 周御, 黄振荣, 等. 高效液相色谱法同时测定黑蒜中蒜氨酸、脱氧蒜氨酸及 γ-谷氨酰半胱氨酸含量[J]. 东北农业大学学报, 2020, 51(7): 36−43. [LU L D, ZHOU Y, HUANG Z R, et al. Simultaneous determination of allicin, deoxyallicin and γ-glutamyl-L-cysteine in Black garlic by HPLC[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2020, 51(7): 36−43.]

[16] 赵小莉, 付洋, 赵强, 等. 硫酸铵沉淀分离富硒大豆蛋白的初步研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(13): 92−95,100. [ZHAO X L, FU Y, ZHAO Q, et al. Preliminary study on ammonium sulfate precipitation of selenium-enriched soybean protein isolate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(13): 92−95,100.]

[17] EISENTHAL R, PETERSON M E, DANIEL R M, DANSON M J. The thermal behaviour of enzyme activity: implications for biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24(7): 289−292.

[18] SUZUKI H, FUKUYAMA K, KUMAGAI H. Bacterial γ-glutamyltranspeptidases, physiological function, structure, catalytic mechanism and application[J]. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 2020, 96(9): 440−469.

[19] 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 Universities, 2016, 30(1): 133−141.]

[20] FORERO N, LIU Chengsong, SABBAH S G, et al. Assay development for metal-dependent enzymes─influence of reaction buffers on activities and kinetic characteristics[J]. ACS Omega, 2023, 8(43): 40119−40127.

[21] 忻寅强, 鲁昌燕, 王期, 等. 生物酶法合成 L-茶氨酸和聚谷氨酸的高效同步分离纯化[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2011, 34(2): 90−93,99. [XIN Y Q, LU C Y, WANG Q, et al. Effective simultaneous separation and purification of L-theanine and poly-γ-glutamic acid from enzyme-catalyzed synthesized[J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition), 2011, 34(2): 90−93,99.]

[22] WICKHAM S, WEST M B, COOK P F, et al. Gamma-glutamyl compounds: Substrate specificity of gamma-glutamyl transpeptidase enzymes[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 414(2): 208−214.

[23] 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.

[24] 王文豪, 闻鹏飞, 许孔亮, 等. 工业环境下酶蛋白的催化行为与适应性改造研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(10): 1857−1869. [WANG W H, WEN P F, XU K L, et al. Catalysis of enzymes under industrial environments and their adaptive modifications: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(10): 1857−1869.]

[25] 肖彦羚, 周治, 姚忠, 等. WRK 对枯草芽孢杆菌 NX-2 产出的 γ-谷氨酰转肽酶的不可逆抑制动力学[J]. 高校化学工程学报, 2010, 24(1): 87−92. [XIAO Y L, ZHOU Z, YAO Z, et al. Kinetic of irreversible inactivation of γ-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* NX-2 by Woodward's reagent K[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2010, 24(1): 87−92.]

[26] 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.

[27] ALLISON R D. Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds[M]. Amsterdam: Elsevier, 1985: 419-437.

[28] SHUAI Yuying, ZHANG Tao, JIANG Bo, et al. An efficient method for the high-yield production of l-theanine using a newly isolated glutaminase-producing organism[J]. Food Bioscience, 2019, 28: 164−169.

[29] CHEN Y Y, 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, 75−76: 18−24.

[30] 汪前, 姚忠, 吴明刚, 等. 酶法制备 γ-D-glutamyl-L-tryptophan 的动力学模型[J]. 化工学报, 2008, 59(2): 431−436. [WANG Q, YAO Z, WU M G, et al. Kinetic model of enzymatic synthesis of γ-D-glutamyl-L-tryptophan[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2008, 59(2): 431−436.]

[31] 蔡爱丽, 黄名勇, 王政, 等. 刺葡萄锦葵色素酶促酰化反应条件的优化[J]. 食品工业科技, 2022, 43(14): 171−177. [CAI A L, HUANG M Y, WANG Z, et al. Optimization of the enzymatic acylation reaction conditions of *Vvitis davidii* malvidin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(14): 171−177.]

[32] SOMMA V, CALVIO C, RABUFFETTI M, et al. An overall framework for the *E. coli* γ-glutamyltransferase-catalyzed transpeptidation reactions[J]. Bioorganic Chemistry, 2021, 115: 105217.