

미생물성 Transglutaminase에 의한 유채단백질의 겔화

현은희 · 강영주
제주대학교 식품공학과

Gelation of Rapeseed Protein Induced with Microbial Transglutaminase

Eun-Hee Hyun and Yeung-Joo Kang

Department of Food Science and Engineering, Cheju National University

Abstract

Optimum reaction conditions for gel formation of rapeseed, *Brassica napus*, protein catalyzed by microbial TGase(transglutaminase) were evaluated by measuring breaking strength and deformation of gel. The polymerization of the protein gel was ascertained by SDS-PAGE and content of GL crosslinking[ϵ -(γ -glutamyl)lysine]. In the reaction between rapeseed protein and TGase at 45°C for 60 min, the breaking strength and deformation of the gel was the maximum at the ratio of 1 : 40 of enzyme to substrate. 10%(w/v) of rapeseed protein concentrate was optimum for gel production. The maximum breaking strength and deformation was shown at 45°C. The breaking strength increased linearly up to 90 min of the reaction time and remained unchanged. The breaking strength and deformation by TGase treatment was pH dependent and pH 7 was optimum for 10% rapeseed protein solution. SDS-PAGE analysis indicated that new band of high-molecular polymers were formed by the enzyme reaction, with disappearing the original bands of rapeseed protein. According to HPLC analysis, the content of GL crosslinking was increased from 0 to 7.14 μ mol/g gel for 90 min of the reaction time.

key words : transglutaminase, GL crosslinking [ϵ -(γ -glutamyl)lysine], rapeseed protein, polymerization

서 론

효소는 단백질의 식품학적 기능성을 개선시키는 수단으로 많이 이용되고 있는데 주로 단백질을 선택적으로 절단하는 가수분해형 효소^(1,2,3)와 중합하는 여러 가교중합형 효소⁽⁴⁾가 있다. Transglutaminase(TGase)는 가교중합형 효소 중 대표적인 것으로 이는 단백질 및 펩타이드 중의 glutamine 잔기의 γ -carboxamide 기와 각종 일급 아민 간의 아실 전이반응을 촉매하여 단백질 내 혹은 단백질 상호간에 ϵ -(γ -glutamyl)lysine 가교 결합(GL교차결합)을 형성하여 단백질을 중합함으로써 겔을 형성시키는 효소이다⁽⁵⁾. 특히 TGase 처리로 겔이 형성되지 않는 단백질의 겔화 뿐만 아니라 단백질의 겔형성능 향상과 탄성 부여, 미가열 상태 및 천연 유효상태의 단백질의 겔화, 내열성, 내산성, 내수성을 가진 안정성이 높은 겔 형성에 도움을 준다고 보고⁽⁵⁾되고 있다. 식품가공에 있어 동물 유래의 TGase의 상업

적인 이용은 효소 생산의 높은 비용이 문제가 되었으나 *Streptoverticillium mobaraense*의 변종에서 생산된 미생물 체외효소인 TGase의 발견 이후로 경제적인 문제가 해결되어 식품분야에서의 응용 연구가 활발하여지고 있다⁽⁶⁾. 미생물 유래의 이 효소는 동물에서 추출한 TGase(칼슘 의존성 효소)와는 나르게 칼슘 농도에 영향을 받지 않는 칼슘 비의존성 효소라는 점, 또한 동물 유래의 TGase에 비해 열에 비교적 안정하고, 작용 pH 범위도 넓은 특성을 지니고 있다^(5,7).

한편, 유채단백질은 영양적 품질 및 수분 및 유흡수성, 에멀전 특성, 점도 등의 식품학적 기능면에서 매우 우수한 것으로 알려지고 있으나⁽²⁾ 가열 겔형성능이 없어 그 이용에 제한을 받고 있다. 따라서 본 연구에서는 유채단백질의 이용도 증진을 위한 연구의 일환으로서 유채단백질의 겔화에 영향을 미치는 TGase 작용조건에 대한 영향인자를 조사하여 좀더 효율적인 유채단백질의 겔화방법과 겔 특성을 살펴보고, 동시에 겔화가 일어날 때 단백질의 변화를 생화학적 지표인 SDS-PAGE 및 GL 교차결합 함량 등의 측정에 의해서 검토하였다

Corresponding author : Yeung-Joo Kang, Food Science and Engineering, Cheju National University, Ara-Dong 1, Cheju, Cheju Do, 690-756, Korea

Table 1. Reaction conditions for gel formation of rapeseed protein catalyzed by TGase

Ratio of enzyme to substrate ([E] : [S])	1 : 100, 1 : 80, 1 : 60, 1 : 40, 1 : 20
Protein concentration(% , w/v)	4, 6, 8, 10, 12
Reaction temperature(°C)	25, 35, 45, 55, 65
Reaction time(min)	30, 60, 90, 120, 180
Reaction pH	4, 5, 6, 7, 8, 9

재료 및 방법

재료

*Streptovercillium mobaraeuse*에서 생산된 효소활성이 1 unit/mg인 미생물 TGase (ACTIVA TG, Ajinomoto Co. Inc. Japan; 10% TGase-90% dextrin)를 구입하여 사용하였으며, 유채실은 제주지역에서 주로 재배되는 *Brassica napus* (Youngsan)종을 구입하여 김 등의 방법⁽²⁾에 따라 유채박 분에서 65.6% (dry basis) 단백질 함량을 가지는 유채단백질을 분리, 정제하여 기질단백질로 사용하였다.

TGase 처리에 의한 유채단백질의 겔화와 겔강도 측정

TGase에 의한 유채단백질의 겔형성 최적조건을 정하기 위해 효소농도, 기질농도, 온도, 시간, pH 등을 달리하고 일정시간 반응시킨 후 겔형성 유무를 알아 보았다(Table 1). 각 겔화 조건에 의하여 만들어진 유채단백질 겔의 물성을 rheometer (COMPAC-100, SUN과학, Japan)로 측정하였다. 용기 안에 있는 일정한 규격(직경 20 mm, 높이 15 mm)의 시료를 직경 10 mm의 구형 plunger를 이용하여 측정하였으며, 최초로 겔의 파괴가 일어날 때의 하중을 겔강도(breaking strength, g)로, 이때의 깊이를 변형(deformation, mm)으로 나타내었다.

SDS-PAGE 분석

반응이 끝난 시료(0.2 g)를 0.0625M Tris-HCl 완충용액(pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, bromophenol을 함유한 완충용액 10 ml에 현탁시킨 후 100°C에서 1분 30초간 가열하고, 흐르는 물에서 냉각시켜 SDS-PAGE용 시료로 하였다. SDS-PAGE (sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)는 Laemmli의 방법⁽⁸⁾에 따라 12.5% polyacrylamide를 지지체로 하여 행하였다. 주입 시료량은 20 µl이며 시료 당 5 mA의 전류를 사용하여 3시간 동안 실온에서 전개하였다. 전기영동 후 전개된 겔은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하고, 증류수 : 무수에탄올 : 빙초산의 혼합비가 6 : 3 : 1(v/v)의 용액으로 탈색하였다.

겔 중의 Gln-Lys (GL) 교차결합 함량 분석

시료의 전처리에는 Lee 등의 방법⁽⁹⁾을 약간 변형하여 실시하였다. 시료를 pronase (2 unit/mg protein), leucine aminopeptidase (0.5 unit), prolidase (0.5 unit), carboxypeptidase A(0.5 unit)의 네 종류의 단백효소로 연속적으로 가수분해한 후 분해된 시료를 0.5 µm Millipore filter로 여과 후 동결건조시켜 GL 교차결합 함량 측정의 시료로 사용하였다. 시료의 분석은 HPLC (Spectra-Physics Co., USA)로 실시하였다. Altech C₁₈ column (250×4.6 mm)을 사용하여 두 가지 용매로 구성된 용액 시스템에서 methanol(용매 B)의 함량을 20%에서 95%까지 달리하여 기울기 용리(gradient elution)를 행하였다. 형광검출기를 사용하여 interference excitation : 334 nm, emission : 440 nm에서 측정하였으며, 분리는 40분간 실시하였다

결과 및 고찰

효소 및 기질농도에 따른 유채단백질의 겔화

기질단백질에 대한 효소첨가량이 유채단백질의 겔화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10% 유채단백질 용액에 효소 : 기질의 비를 1 : 100, 1 : 80, 1 : 60, 1 : 40, 1 : 20, 1 : 10 로 달리하여 pH 7, 45°C에서 1시간 동안 반응시켜 Fig. 1에 나타내었다. TGase를 첨가하지 않은 경우, 반응후 단백질 용액은 반응전과 차이를 보이지 않았으나 같은 조건에서 TGase를 첨가하였을 때는 유채단백질용액의 겔화가 관찰되었다. 또한 효소 첨가량 증가에 따라 TGase 촉매 하에 형성된 유채단백질의 겔강도와 변형도 비례적으로 증가하고 있어 TGase의 첨가는 유채단백질 용액의 겔화 뿐만 아니라 겔의 물성 개선에도 많은 도움을 주고 있음을 보여주었다. 그러나 효소와 기질의 비가 1 : 40 이상으로 효소농도가 높아질수록 오히려 겔강도와 변형 값은 감소되는 경향을 보여 단백질 겔 제조 시 적당량의 TGase 첨가는 겔 형성능의 향상을 부여하지만, 지나친 양의 첨가는 오히려 겔을 약화시키고 부서지기 쉬운 상태로 만들고 있는 것으로 조사되었다. 이는 TGase 촉매작용으로 인한 단백질 내에 지나친 GL 교차결합의 형성이 단백질 망상구조의 규칙적인 형성을 방해

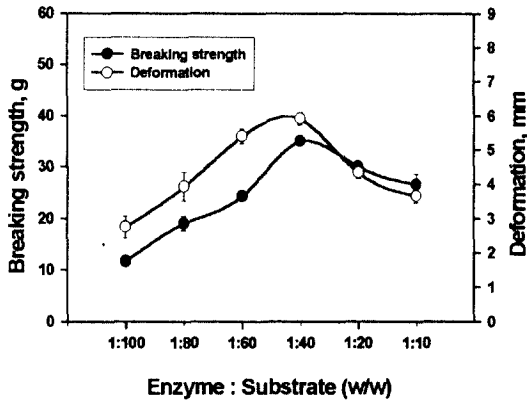


Fig. 1. Effects of ratio of enzyme to substrate on breaking strength and deformation of rapeseed protein gels formed by transglutaminase at 45°C for 1hr. The concentration of rapeseed protein was 10% and the pH of reaction mixture was 7.

하기 때문⁽⁹⁻¹¹⁾으로 보고되고 있다. 따라서 기질로 사용되는 단백질 종류에 따라 효소량이 달라져야 하며 유채단백질의 경우 겔 제조 시 사용되는 효소 첨가량은 물성학적 측면을 고려할 때 단백질 농도가 10%인 경우, 1:40 비로 첨가하는 것이 적당할 것으로 여겨진다.

효소촉매 반응에서 기질단백질 농도에 따른 겔강도와 변형의 변화를 검토하여 그 결과를 Fig. 2에 제시하였다. 효소가 첨가되지 않은 경우에는 기질단백질 농도 12%에서도 겔이 형성되지 않았으나 효소 : 기질을 1:40의 비로 TGase를 첨가하였을 때는 기질농도 4%에서부터 겔이 형성되기 시작하여 겔강도는 기질단백질 농도가 증가함에 따라 직선적으로 증가하고 있다.

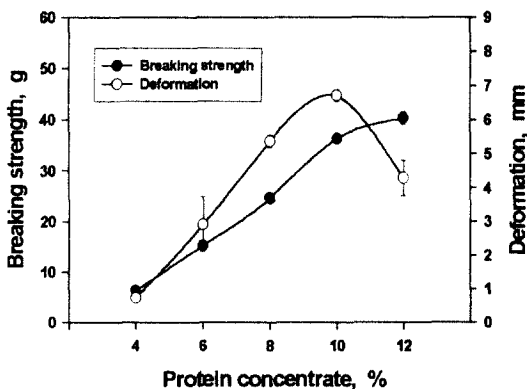


Fig. 2. Effects of protein concentration on breaking strength and deformation of rapeseed protein gels formed by transglutaminase at 45°C for 1hr. Ratio of enzyme to substrate was 1:40(w/w) and the pH of reaction mixture was 7.

Nio 등⁽¹²⁾도 TGase 촉매반응에 의한 겔형성 실험에서 효소반응은 단백질 농도에 크게 영향을 받아 카제인, 콩단백질의 농도가 높을수록 단백질 겔이 형성되는 속도가 빠르나, TGase 무첨가 단백질 용액은 같은 조건에서도 아무런 변화를 보이지 않고 있다고 보고하고 있다. 4%, 6% 기질단백질 농도에서는 유채단백질이 겔화될 때 수분 분리 현상을 보이고 있는데, 이는 TGase 반응에서 생성된 저농도 용액의 겔은 물리적 망상구조의 형성이 고농도에 비해 잘 이루어지지 않아 3차원적 매트릭스 구조에서 수화능력이 떨어짐으로서 발생하는 현상으로 여겨진다. 반면에 고농도의 단백질 용액에서는 TGase의 촉매작용에 의한 단백질간의 상호작용(공유결합과 같은 강한 결합)이 강하게 일어나며, 또한 규칙적인 매트릭스 구조를 형성하기 때문에 수분 분리 현상이 없는 강한 겔형성이 이루어지는 것으로 생각된다⁽¹²⁾. 단백질 겔 변형은 8%까지는 직선적으로 그리고 10%까지는 완만한 증가를 보이고 있으나 그 이후로는 감소하고 있다. 이는 단백질농도10%인 겔은 비교적 외부의 힘에 견딜 수 있는 탄력을 가지고 있는데 반하여 12% 농도의 유채단백질 겔은 겔강도가 높은 것으로 보아 단단하기는 하나 변형 값의 급격한 감소로 보아 탄력을 가지지 못해 힘을 가했을 때 부서지기 쉬운 성질을 가지고 있음을 말해준다^(10,11).

반응시간, 온도 및 pH에 따른 유채단백질의 겔화

Fig. 3은 45°C에서 유채단백질과 TGase를 반응시켰을 때 반응시간에 따른 유채단백질 겔 특성을 나타낸 그림이다. 반응시간 90분까지 직선적으로 증가하던 겔

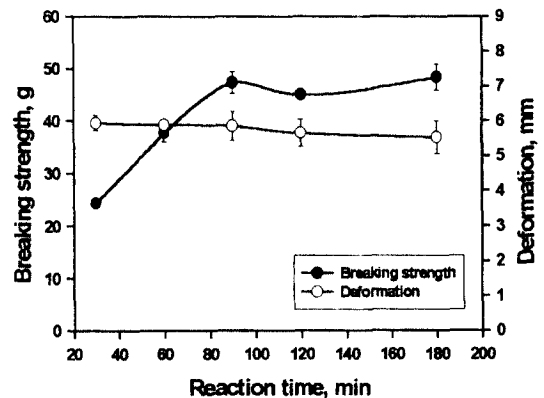


Fig. 3. Effects of reaction time on breaking strength and deformation of rapeseed protein gels formed by transglutaminase at 45°C The concentration of rapeseed protein was 10%. Ratio of enzyme to substrate was 1:40 (w/w) and the pH of reaction mixture was 7.

강도가 90분 이후 거의 변하지 않고 있어 더 이상 단백질과 효소간의 반응이 이루어지지 않고 있음을 짐작할 수 있다. 이와 같은 결과는 아마도 효소 촉매작용을 일으킬 수 있는 유채단백질의 작용기들이 반응 90분 동안에 거의 반응에 참여하였거나, 효소의 열에 의한 실활, 또는 단백질의 열변성에 의한 작용기들의 기능상실에 의한 것으로 생각된다. Sakamoto 등⁽¹¹⁾도 여러 가지 TGase처리 단백질의 반응시간에 따른 겔강도 측정에서 분리대두단백질인 경우는 30분, caseinate와 젤라틴인 경우는 120~250분에서 최대 값을 나타낸다고 보고하고 있어 기질 단백질의 종류에 따라 또는 같은 단백질인 경우에도 효소-단백질 반응온도에 따라 최대 활성을 나타내는 시간이 현저히 다를 수 있다. 유채단백질 겔 변형은 겔강도와는 달리 반응 30분에서나 반응 180분 후에서나 거의 값의 차이를 보이지 않고 있어 효소-단백질 반응시간 90분은 단단한 겔을 형성하는데 도움을 주기는 하나 겔의 탄력 향상에는 더 이상 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

Fig. 4에는 기질단백질에 TGase를 첨가한 후 25°C~65°C의 범위에서 반응시켰을 때의 겔화에 대한 온도의존성을 나타내었다. TGase 처리하지 않은 반응 용액은 겔화가 이루어지지 않는 않았으나 효소첨가 시료인 경우에 상온(25°C)에서도 TGase 첨가만으로도 유채단백질 겔이 형성되고 있어 비가열상태 겔 식품의 제조에 유채단백질을 응용할 수 있는 범위가 넓어질 것으로 기대된다. 또한 가열조작의 병행으로 단백질의 겔형성능이 증강되어 반응온도 45°C까지 겔강도와 변형은 반응온도에 비례하여 증가함을 보이고 있다. 그러나 그 이상의 반응온도에서 겔의 물성이 현저하게 저

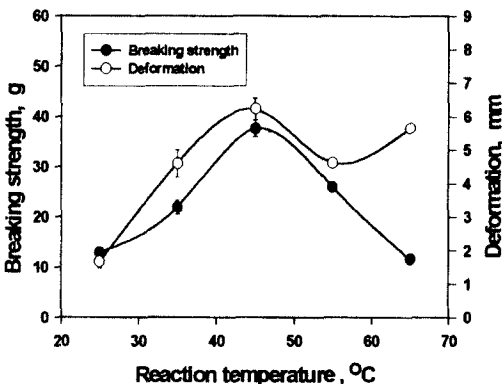


Fig. 4. Effects of reaction temperature on breaking strength and deformation of rapeseed protein gels formed by transglutaminase for 1hr. The concentration of rapeseed protein was 10%. Ratio of enzyme to substrate was 1 : 40(w/w) and the pH of reaction mixture was 7.

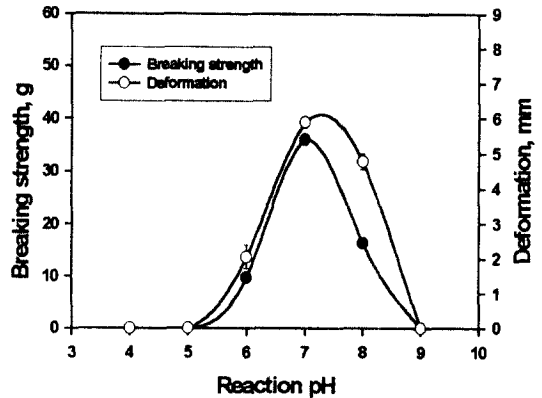


Fig. 5. Effects of pH on breaking strength and deformation of rapeseed protein gels formed by transglutaminase at 45°C for 1hr. The concentration of rapeseed protein was 10%. Ratio of enzyme to substrate was 1 : 40(w/w).

하되고 있어 효소활성이 급속히 감소되고 있다는 것을 알 수 있다. Ando 등⁽⁶⁾은 합성기질을 이용한 TGase 활성 실험에서 TGase 활성의 최적온도는 약 50°C이고 (pH 6, 10분간 처리), pH 7에서 10분간 40°C로 처리 하였을 때는 100%활성이 남아 있었으나, 50°C, 10분 반응 시 초기활성의 25%를 상실하였고, 60°C, 5분 반응 시는 효소활성을 완전히 잃어버렸다고 보고하고 있으나 식품단백질을 기질로 사용하였을 경우에는 기질 속에 함유되어 있는 어떤 성분들이 효소의 열안정성에 영향을 미치며, 대부분 효소의 열안정성이 증대되는 경향이 있는 것으로 보고⁽¹⁰⁾되고 있다.

반응용액의 pH가 단백질-효소반응에 의해 생성되는 겔의 강도와 변형에 미치는 영향을 살펴보면(Fig. 5), pH 4, 5, 9에서는 겔이 형성되지 않았으나, pH 6, 7, 8에서 효소촉매에 의해 겔이 형성되었다. 겔강도와 변형은 pH 7에서 최대값을 보이고 있어 유채단백질 겔 제조에 가장 적합한 pH라고 생각된다. pH 5는 유채단백질의 등전점 부근으로 단백질의 부분적인 침전이 일어나 효소와 반응할 수 있는 작용기들이 적어져 효소 촉매반응이 잘 이루어지지 못하여 겔화가 어려운 것으로 추측할 수 있다. 이와는 달리 pH 8에서는 유채단백질 용액의 겔화가 비교적 잘 이루어지나 알칼리성에서 유채단백질의 색택이 어두워지고 풍미가 나빠지는 성질 때문에 관능적인 면을 고려할 때 반응용액의 pH는 중성 부근이 적당할 것으로 생각된다.

전기영동 결과

TGase 촉매로 유채단백질 분자내의 glutamine과

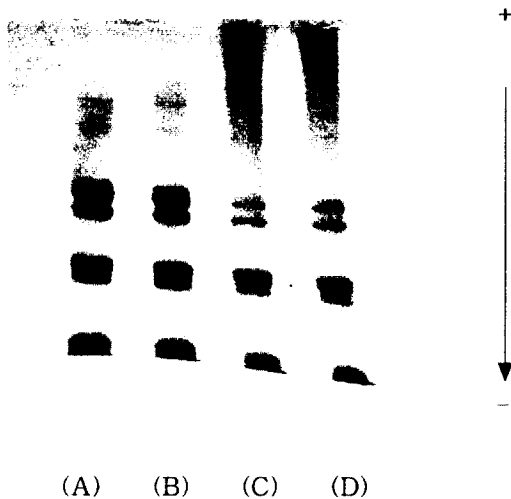


Fig. 6. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of rapeseed protein incubated with transglutaminase at various reaction times.

(A); rapeseed protein solution, (B); rapeseed protein solution incubated without TGase at 45°C for 60 min, (C); rapeseed protein solution incubated with TGase at 45°C for 30 min, (D); rapeseed protein solution incubated with TGase at 45°C for 60 min, The pH of reaction mixture was 7.

lysine간의 공유결합에 의한 고분자의 형성을 살펴보기 위하여 TGase를 첨가하지 않은 유채단백질 용액과 첨가된 유채단백질 겔을 시료로 하여 SDS-PAGE 분석을 행하였다(Fig. 6). SDS-PAGE분석에 사용되는 시료는 전기영동 전에 2-mercaptoethanol 처리가 되어지므로 시스테인 결합으로 인한 폴리머는 검출되어지지 않기 때문에 TGase에 의해 겔화된 단백질의 전기영동 결과 검출되는 폴리머는 효소에 의한 GL교차결합으로 형성되어진 것으로 생각된다. 반응시간에 따라 유채단백질의 분자량의 변화를 살펴보면 효소가 첨가되지 않은 (B)와 비교해 볼 때 반응시간 30분(C), 60분(D) 경과 시에는 밴드들은 소멸되고 있거나 전체적으로 희미해지고 있는 대신 고분자 밴드가 separating gel의 맨 윗 부분에 생성되고 있어 TGase가 유채단백질을 구성하고 있는 분자들이 GL 교차결합에 의하여 고분자화가 이루어지고 있음을 보여주고 있다. 전기영동 분석에서 반응시간 30분(C)과 60분(D) 간에 뚜렷한 차이를 보이지는 않고 있는데, 이는 전기영동 분석 시 사용되어진 유채단백질 겔의 단백질 농도가 10%로 높아 교차결합 반응 진행이 매우 빨라서 시간에 따른 단백질의 고분자화의 변화가 분명하게 드러나지 않은 것으로 여겨진다⁽¹³⁾. 대부분 카제인과 젤라틴 등의 불규칙한 구조를 많이 함유하고 있는 단백질과 대두단백질이나 소

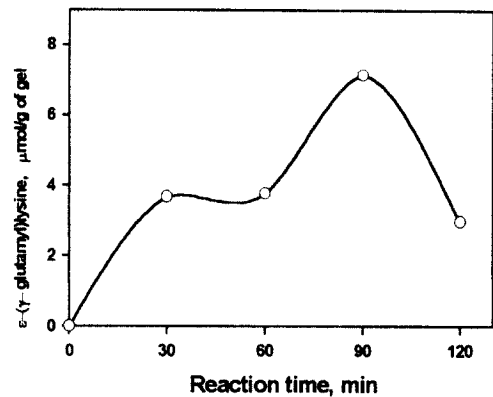


Fig. 7. Changes in ϵ -(γ -glutamyl)lysine content in rapeseed protein gels as related to enzyme reaction time at 45°C. Protein concentration was 10% and pH of reaction mixture was 7. Ratio of enzyme to substrate was 1:40 (w/w).

맥단백질과 같은 lysine 잔기와 glutamine 잔기를 많이 함유한 단백질이 TGase의 좋은 기질이 된다⁽¹¹⁾. 그러나 TGase의 기질로서 이용 가능성은 TGase와 반응하는 glutamine 주위의 아미노산 배열에 의해 결정된다고 알려져 있기 때문에 기질로서 작용하는 능력을 평가하는데 단백질의 구조 또한 중요하다고 보고되고 있다⁽¹⁴⁾.

GL [ϵ -(γ -glutamyl)lysine] 교차결합 함량 변화

TGase는 단백질 및 펩타이드 중의 glutamine 잔기의 γ -carboxamide 기와 각종 일급 아민 간의 아실 전이 반응을 촉매하여 단백질 내 혹은 단백질 상호간에 ϵ -(γ -glutamyl)lysine 가교결합(GL 교차결합)을 형성하여 단백질을 중합함으로써 겔 형성능을 높이는 것으로 알려져 있다. 따라서 유채단백질 겔 형성이 TGase 촉매로 인한 것임을 확인하기 위하여 반응시간에 따른 GL 교차결합의 함량을 측정된 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 효소를 첨가하지 않았을 때(반응 0시간), 즉 겔을 형성하지 않은 반응용액의 HPLC 분석에서는 GL 교차결합 피크가 검출되지 않았으나 TGase 첨가로 겔이 형성되었을 때는 반응 30분에 3.67 $\mu\text{mol/g}$ gel, 60분에는 3.77 $\mu\text{mol/g}$ gel, 90분에는 7.14 $\mu\text{mol/g}$ gel의 GL 교차결합 피크가 검출되고 있어 TGase 촉매작용으로 유채단백질 내에 GL 교차결합이 형성됨으로서 유채단백질의 겔화가 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 이는 반응시간에 따른 겔강도(Fig. 3)와 같은 경향을 보이고 있어, 유채단백질 겔형성은 유채단백질 내 GL 교차결합과 관련되어 있음을 시사하였

다. 그러나 반응시간에 따른 GL 교차결합 함량의 증가를 보였다는 연구 보고⁽¹⁵⁾와는 다르게 본 실험 결과 GL 결합 함량이 반응 90분까지는 증가하다가 그 이후에는 오히려 감소되는 경향을 보여 지금까지의 보고와는 다른 결과를 나타내고 있어 120분 반응 후에 형성된 겔의 GL 교차결합 수가 감소된 이유에 대하여는 앞으로 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

겔 형성이 어려운 유채단백질의 겔화를 위하여 미생물성 TGase의 촉매작용에 의하여 최적 겔화 반응조건을 겔강도(g)와 겔변형(mm)을 조사하여 검토하였다. 또한 형성된 겔의 고분자화를 SDS-PAGE 및 GL 교차결합 함량 측정에 의하여 확인하였다. 단백질-TGase 반응에서 효소 첨가량은 45°C에서 60분 동안 반응 시 단백질농도가 10%에서 효소가 1:40([E]:[S])의 비로 첨가되었을 때 겔강도와 변형 값이 가장 높았다. 또한 이 조건에서 기질단백질 농도가 4~12%로 증가함에 따라 겔강도는 비례적으로 증가함을 보였으나 겔의 변형을 고려할 때 10% 농도가 유채단백질 겔 제조에 적당한 농도로 조사되었다. 최적 활성을 나타내는 반응온도는 45°C로 관찰되었고, 반응시간은 90분이면 적당한 것으로 조사되었다. 겔강도와 변형은 다른 pH와 비교할 때 pH 7에서 상당히 높은 값을 보여 pH 7이 최적조건이었다. SDS-PAGE분석에서 효소반응에 따라 유채단백질의 본래 밴드들이 소멸되거나 희미해지면서 고분자 밴드들이 형성되고 있음을 보여주었다. 또한 HPLC 분석 결과 GL 교차결합 함량이 반응시간에 따라 0 μmol/g gel에서 최고 7.14 μmol/g gel(반응 90분)까지 증가되고 있어 유채단백질의 겔화가 TGase에 의해 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

문 헌

1. Kang, Y.J. Enzymatic modification of soy proteins: Effect of functional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis. *Kor. J. Food Sci. Tech.* 19: 211-217 (1984)
2. Kim, C.H., Kim, H.S., Jung, Y.H., and Kang, Y.J. The hydrolysis conditions of rapeseed protein by pronase. *J.*

- Korean Soc. Food Nutr.* 25: 513-518 (1992)
3. Kim, H.S. and Kang, Y.J. Deamidation on glutaminy and asparaginy residues of protein by Neutrased. *Kor. J. Food Sci. Tech.* 27: 794-798 (1995)
4. Whitaker, J.R. Enzymatic modification of proteins applicable to foods. pp. 95-155. In: *Food Protein-Improvement through Chemical and Enzymatic Modification.* Feeny, R.E.(ed.). American Chemical Society, Washington, DC, USA (1977)
5. Soeta, K. A study of new protein ingredient by transglutaminase. *Shouhing Kougok* 12: 18-25 (1997)
6. Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. and Motoki, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2613-2617 (1989)
7. Tsai, G.J., Lin, S.M. and Jiang, S.T. Transglutaminase from *Streptococcus lactis* and application to minced fish product. *J. Food Sci.* 61: 1234-1238 (1996)
8. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
9. Lee, H.G., Lanier, T.C., Hamann, D.D. and Knopp, J.A. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J. Food Sci.* 62: 20-24 (1997)
10. Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Toiguchi, S., Seguro, K., Soeda, T. and Motoki, M. Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture. *J. Food Sci.* 60: 300-304 (1995)
11. Sakamoto, H., Kumazawa, Y. and Motoki, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. *J. Food Sci.* 59: 866-871 (1994)
12. Nio, N., Motoki, M. and Takinami, K. Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* 49: 2283-2286 (1985)
13. Chanyongvorakul, Y., Matsumura, Y., Hiroko, S., Motoki, M., Ikura, K. and Mori, T. Gelation of bean 11S globulin by Ca²⁺-independent transglutaminase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 864-869 (1994)
14. Kurth, L. and Rogers, P.J. Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soya protein, casein and gluten. *J. Food Sci.* 49: 573-589 (1984)
15. Tsukamasa, Y., Sato, K., Shimizu, Y., Imai, C., Sugiyama, M., Minegishi, Y. and Kawabata, M. ε-(γ-Glutamyl)lysine crosslink formation in sardine myofibril sol during setting at 25°C. *J. Food Sci.* 58: 785-787 (1993)