

토양 방선균 *Streptomyces platensis* YK-2가 생산하는 Transglutaminase의 정제 및 효소학적 특성

고희선¹ · 김현수^{2*}

¹국립농업과학원 농업미생물과
²계명대학교 미생물학과

Purification and Characterization of Transglutaminase from a Newly Isolated *Streptomyces platensis* YK-2

Hee-Sun Ko¹ and Hyun-Soo Kim^{2*}

¹Dept. of Microbiology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

²Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Gyeonggi 441-707, Korea

Abstract

A species producing transglutaminase (EC 2.3.2.13) was isolated from forest soil and identified as *Streptomyces platensis* YK-2. The transglutaminase was purified from culture broth by 50% methanol precipitation, followed by successive chromatography on DEAE-Sephadex. The yield and purification-fold was 63.4% and 2.2-fold, respectively. The purified microbial transglutaminase (MTG) migrated as a single band of approximately 45 kDa upon sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The isoelectric point determined by multichambered electrofocusing was pH 6.0~7.0. The enzyme was strongly inhibited by Hg²⁺, but was activated by Cd²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺ and reducing agents such as dithiothreitol and mercaptoethanol.

Key words: microbial transglutaminase, *Streptomyces platensis* YK-2, purification, methanol precipitation, DEAE-Sephadex

서 론

Transglutaminase(TGase, R-glutaminyl-peptide:amine γ -glutamyl-transferase, EC 2.3.2.13)는 단백질 혹은 펩타이드쇄 중의 glutamine 잔기의 γ -carboxyamide기와 1급 amine간에 acyl 전이반응을 촉매하는 Ca²⁺ 의존 효소로, 단백질 중의 lysine 잔기의 ϵ -amino기가 acyl 수용체로서 작용할 때 단백질 분자 내 및 분자 간에서 ϵ -(γ -Glu)Lys 가교결합을 형성한다(1,2). TGase의 촉매반응은 단백질의 기능적인 특성을 변형시킬 수 있으므로(3,4), 유장 단백질, 대두 단백질, gluten, myosin, actomyosin 등과 같은 많은 단백질의 가교결합을 촉매 하는데 사용되고 있다. 이러한 TGase에 의한 식품단백질의 변형은 물성을 강인하고 유연하게 해주고, 다양한 화학적 반응으로부터 식품단백질 중의 lysine 보호, 내열성과 내수성 형성, 미가열 상태에서의 겔화, 탄력성과 수분 함유 능력의 향상, 가용성과 기능적인 특성의 변화를 도와준다(3,5,6). 그리하여 TGase는 어육제품, 축육제품, 밀가루식품, 간장 제조 등에 다양한 분야에서 식품가공용 소재로서 이용되고 있다(7-9). 국내에서도 TGase 첨가료 국

내산 밀가루 반죽의 제면적성이 향상되며, 겔 형성이 어려운 유채 단백질의 겔화(10)에 이용되거나, TGase를 첨가한 우유 단백질과 우유 분말 제품이 무침가균에 비하여 용해성, 유효화성 및 거품형성 등의 기능적 특성이 부분적으로 우수해진다고 보고된 바가 있다(11). 또한 지혈 시에는 fibrin 구조의 안정화와 적혈구 막을 견고하게 해주는 역할이 있어, 상처의 치유 등 생물학적으로 중요한 기능을 가지는 혈액응고 제13인자로서 의약분야에서도 수많은 연구가 수행되고 있다(12).

TGase는 포유동물의 모발, 뇌, 간장 등 생체 내에 널리 존재하며 조류, 어류, 식물 등에도 존재하는 것으로 알려져 있다(1,2,13,14). 진핵 조직의 TGase(type II)의 효소활성은 Ca²⁺과 GTP에 의해 조절되며(15), 혈액응고 제13인자와 상피세포의 TGase(type II)는 단백질 가수분해효소에 의해서 활성이 조절된다(16,17). 그러나 동물 유래의 TGase의 상업적 이용은 효소 생산 상의 높은 비용이 제약이 되는 반면, 미생물 유래의 TGase가 포유동물 유래의 TGase와는 달리 칼슘 비의존성, 열안정성 및 넓은 pH 범위의 반응특성을 가지고 있어 주목받게 되었다. 미생물 유래의 microbial trans-

*Corresponding author. E-mail: hskim@kmu.ac.kr
Phone: 82-53-580-5284, Fax: 82-53-580-5509

glutaminase(MTG)는 방선균인 *Streptovercillium* sp. S-8112(14,18)에서 처음으로 분리되었다. 세포외 분비효소로서의 MTG는 *Sv. mobaraense* DSMZ strain(19), *Sv. ladakaum*(20), *Sv. cinnamoneum* CBS683.68(21), *Streptomyces hygroscopicus*(22), *Streptomyces platensis* M5218(23)에서 분리되었고, 세포내 효소로서의 MTG는 *Bacillus subtilis*(24)와 *Physarum polycephalum*(25)에서 발견되었다. 이들 생산균 중 *Sv. mobaraense*와 *Sv. SP. S-8112*에서 분리된 MTG가 단백질 gel화에 대한 연구 등에 광범위하게 이용되어 왔으며(26-29), 대량생산을 위한 연구도 계속 수행되고 있다.

이러한 관점에서 선행연구(30,31)로 토양에서 MTG를 생산하는 신규한 방선균 strain YK-2를 분리하여 효소의 대량 생산조건 및 특성을 확립하였고(30), *Streptomyces platensis* YK-2로 동정(31)한 바 있다. 본 연구에서는 *Streptomyces platensis* YK-2가 생산하는 MTG를 정제하고 그 효소 화학적 제 특성에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

배양조건 및 조효소액의 조제

선별된 공시균의 배양은 ISP Medium No. 2(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MC, USA)를 사용하여 28°C에서 2주간 배양한 평판배지로부터 포자현탁액(10^9 spores/mL)을 제조하여 이용하였다. TGase 생산 기본배지(2% polypeptone, 2% soluble starch, 0.2% yeast extract, 0.2% K_2HPO_4 , and 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7.0)에 포자현탁액 0.1 mL를 접종한 후, 28°C에서 2일간 전배양하였고, 본배양 배지에 사용할 때까지 -70°C에서 보존하였다. 조효소액의 조제는 TGase 최적생산배지(2.0% glucose, 1.0% Bacto-soytone, 1.0% polypeptone, 0.1% $MnCl_2$, 0.2% K_2HPO_4)(30)에 전배양균을 3% 접종하여 28°C에서 5일간 진탕배양한 후, 배양액을 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거한 배양여액을 조효소액으로 하였다. 조효소액의 농축법으로 황산암모늄 침전법과 유기용매 침전법을 이용하였다. 황산암모늄 침전법은 조효소액 100 mL에 황산암모늄을 80% 포화되도록 첨가하여 4°C에서 12시간 방치한 후, 4°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻은 침전 단백질을 소량의 0.1 M Tris-acetate buffer(pH 7.0)에 용해시켜, 동일한 완충액에서 투석 후 효소활성을 측정하였다. 유기용매 침전법에서는 조효소액 100 mL에 각각의 유기용매(acetone, ethanol, methanol)를 25%, 50%, 66%, 75%의 비율로 첨가하여 -20°C에서 12시간 방치한 다음 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였고, 침전물을 소량의 0.1 M Tris-acetate buffer(pH 7.0)에 용해시킨 후 효소활성의 측정 및 정제에 사용하였다.

효소활성 측정

배양액 중 생산된 TGase의 활성 측정은 E-tube에 100 μ L의 1.0 M Tris-acetate buffer(pH 6.0)를 넣고 75 μ L 0.2 M CBZ-L-Gln-Gly, 25 μ L 0.1 M calcium chloride, 25 μ L 2.0 M hydroxylamine 및 25 μ L 0.02 M EDTA를 첨가한 후, 250 μ L의 enzyme 용액을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 종료 시에는 반응액에 15% TCA, 0.1 N 및 2.5 N hydrochloric acid에 각각 용해한 5% ferrous chloride 용액 500 μ L를 첨가하여 반응중지 후 흡광도를 525 nm에서 측정하였다. 표준곡선은 L-glutamic acid- γ -monohydroxamate(Sigma Co., USA)를 사용하여 작성하였으며, 효소의 활성은 효소액 mL 당 1분간에 1 μ mole의 L-glutamic acid- γ -monohydroxamate를 생산하는 효소량을 1 unit로 환산하였다(32).

단백질 정량

단백질의 농도는 Bradford법(33)에 따라 protein assay kit(Bio-Rad Co., Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. Bovine serum albumin(Bio-Rad Co.)으로 표준곡선을 작성한 후, 이를 이용하여 시료에 존재하는 단백질 농도를 산출하였다. 정제과정 중의 단백질 농도는 UV-Vis spectrophotometer(Pharmacia Co., Hongkong)를 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소의 정제

본 효소의 정제는 조효소액에 cold methanol을 50% 첨가로 사용하여 -20°C에서 12시간 방치한 후, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻어진 침전물을 소량의 0.1 M Tris-acetate buffer(pH 7.0)로 용해, 회수하였고, 회수된 효소액은 DEAE-Sephadex column(\varnothing 2 \times 30 cm)에 적용되어 정제가 수행되었다. MTG의 분자량의 측정 및 정제도의 확인은 mini gel kit(Hoefler Co., Holliston, USA)를 사용하여 12.5% SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 전기영동 된 단백질은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 확인하였으며, 분자량 marker로는 phosphorylase b(M.W. 97,400), bovine serum albumin(M.W. 67,000), ovalbumin(M.W. 46,000), carbonic anhydrase(M.W. 30,000), trypsin inhibitor(M.W. 21,500), lysozyme(M.W. 14,300)(Amersham Pharmacia Biotech Co.)을 사용하였다.

등전점 측정

본 효소의 등전점은 multichambered electrofocusing unit(Isoprime, Hoefler Co.)를 사용하였다. 즉, 제조사의 사용방법에 따라 acrylamido buffer(Hoefler Co.)를 사용하여 pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10의 7종류의 immobilized membrane을 제조하여 설치한 다음, 각 chamber에 증류수 20 mL를 첨가하였으며, 조효소액 20 mL는 임의의 chamber에 주입하여 18~24시간 전기영동 시킨 후, 각

chamber에 이동한 단백질을 대상으로 효소의 활성을 측정하여 TGase 활성이 있는 chamber의 membrane pH를 등전점으로 산출하였다.

금속이온 및 저해제의 영향

본 효소의 효소학적 특성은 효소활성에 영향을 미치는 금속이온 및 저해제를 대상으로 검토하였다. 금속이온에 대한 영향은 효소반응액에 2가 이온으로 Ca⁺⁺, Cd⁺⁺, Cu⁺⁺, Fe⁺⁺, Hg⁺⁺, Mn⁺⁺, Pb⁺⁺, Zn⁺⁺을 각 1 mM의 농도로 첨가하였으며, 저해제의 경우는 2,2'-bipyridine, DTT, EDTA, mercaptoethanol, o-phenanthroline sodium azide, sodium cyanide, trichloroacetate를 각 1 mM의 농도로 첨가하여 30분간 반응시켜 효소의 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

조효소액의 농축법 선정

조효소액의 농축은 황산암모늄 침전법과 유기용매 침전법을 이용하여 배양액 1 mL에 대한 회수율을 비교하였다. 황산암모늄 침전에 의한 효소활성은 78.4%의 회수율을 보였으며, 유기용매 침전에서는 50% methanol 침전으로 99%의 높은 회수율을 보였다(Table 1). 이 결과는 *S. hygroscopicus* 유래의 MTG를 70% ethanol 처리로 침전하여 우

Table 1. Recovery yield of organic solvents and (NH₄)₂SO₄ precipitation

Precipitation	Activity (units/mL) ³⁾	Recovery (%)
Non-treatment ¹⁾	5.18	100
Acetone	25% ²⁾	74.9
	50%	93.6
	66%	92.5
	75%	91.4
Methanol	25%	71.5
	50%	99.0
	66%	93.3
	75%	91.5
Ethanol	25%	44.2
	50%	78.7
	66%	62.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	80%	78.4

¹⁾Culture filtrate.

²⁾Organic solvents addition, v/v.

³⁾Changed values to 1 mL of culture filtrate.

Table 2. Purification steps of the TGase

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (Fold)	Yield (%)
Culture filtrate ¹⁾	111.3	581.1	4.65	1.0	100.0
50% Methanol ppt. ²⁾	69.3	513.7	7.41	1.6	88.4
DEAE-Sephadex	32.2	328.6	10.21	2.2	56.5

¹⁾From 100 mL of culture broth. ²⁾Precipitation.

수한 회수율을 나타낸 보고(22)와 유사하게 대부분의 유기용매에서 회수율이 양호한 것으로 나타났다. 이후 50% methanol 침전을 본 효소의 정제를 위한 농축법으로 이용하였다.

효소 정제

본 공시균주가 생산하는 MTG의 분리는 최적 생산배지(30)에서 배양한 배양여액을 조효소액으로 하여 50% methanol 침전, DEAE-Sephadex column에 적용시켜 정제하였다. TGase의 활성이 검출된 각 fraction(4 mL/tube)에 대해 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. TGase의 활성분획(fraction number 8~13)은 회수하여 Amicon ultra-filtration kit(Millipore Co., Bedford, MA, USA)로 농축하였다. 정제된 MTG는 Table 2에서와 같이 정제도 2.2배, 56.5%의 회수율을 나타내었다.

분자량 측정

본 정제효소의 정제도 및 분자량의 측정은 Laemmli의 방법(34)에 준하여 12.5% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 수행하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 본 정제효소는 단일 band를 나타내어 monomer인 단일 단백질로 정제되었다. 본 효소의 분자량을 측정한 결과, Fig. 3에서와 같이 약 45,000 dalton 정도인 것으로 추정되었다. 이 결과는 *Sv. sp. S-8112*의 경우 TGase 분자량이 40,000 dalton(14) 및 331개의 아미노산 분석에 따른 분자량 37,863 dalton(34)인 결과와 *Sv. ladakanum*(20) 유래의 분자량 37,500 dalton, *Sv. cinnamomeum* CBS683.68(21) 유래의 37,660 dalton, *S. hygroscopicus*(22) 유래의 38,000 dalton 및 *Bacillus subtilis* 유래

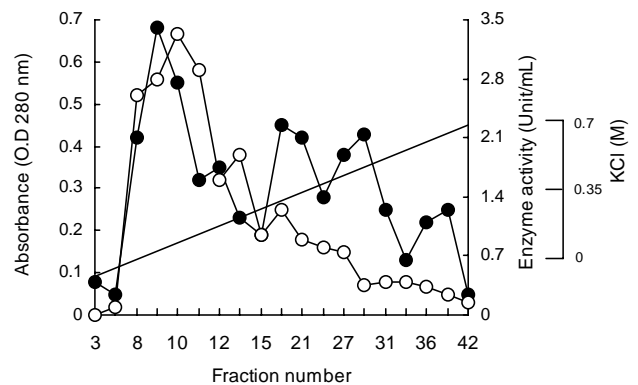


Fig. 1. Chromatogram of TGase on DEAE-Sephadex column. ○ Enzyme activity (Unit/mL), ● Protein amount (absorbance at 280 nm), — KCl gradient concentration (M).

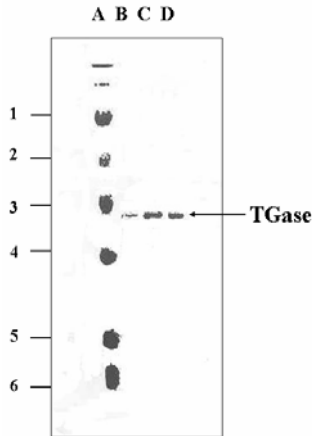


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified TGase. Lane A: Standard protein, 1: Phosphorylase b (M.W. 97,400), 2: Bovine serum albumin (M.W. 67,000), 3: Ovalbumin (M.W. 46,000), 4: Carbonic anhydrase (M.W. 30,000), 5: Trypsin inhibitor (M.W. 21,500), 6: Lysozyme (M.W. 14,300), Lane B: Purified TGase (1.4 µg), Lane C: Purified TGase (3.7 µg), Lane D: Purified TGase (4.9 µg).

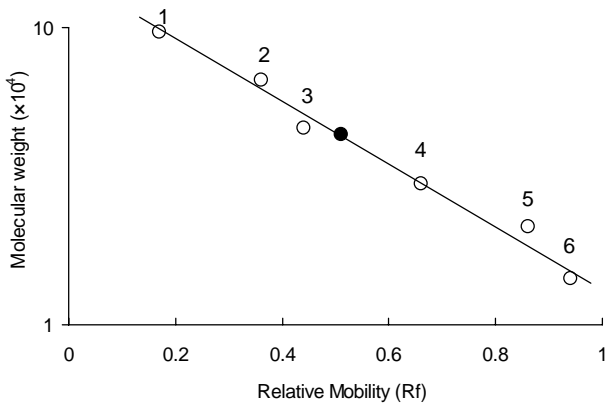


Fig. 3. Determination of molecular weight of the TGase by SDS-PAGE. ○ Protein molecular marker, 1: phosphorylase b (M.W. 97,400), 2: bovine serum albumin (M.W. 67,000), 3: ovalbumin (M.W. 46,000), 4: carbonic anhydrase (M.W. 30,000), 5: trypsin inhibitor (M.W. 21,500), 6: lysozyme (M.W. 14,300). ● Purified TGase.

의 29,000 dalton(24)보다 다소 큰 분자량을 보임에 따라 다른 종류의 MTG인 것으로 추정되나, *Sv. mobaraense*(35)의 SDS-PAGE 분석에서 45,000 dalton이라는 결과와 *S. plattensis* M5218의 418개의 아미노산 분석에 따른 분자량 46,511 dalton(23)과 *Sv. ladakanum* B1의 410개의 아미노산 유래 분자량 45,780 dalton(36)과 유사한 크기의 효소라고 판단되었다.

등전점 측정

본 효소의 등전점은 multichambered electrofocusing unit를 사용하여 acrylamido buffer로 pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 9, pH 10의 immobilized membrane을 제작하여 수행하였다. 본 효소의 등전점을 측정된 결과, Table 3에서 보인 바와 같이 MTG의 활성은 ch. 4(pH 6.0~7.0)에서 활성

Table 3. Isoelectric point of the TGase by isoprime unit

Membrane	Chamber	Activity
pH 4	ch. 1	- ¹⁾
pH 5	ch. 2	-
pH 6	ch. 3	-
pH 7	ch. 4	+ ²⁾
pH 8	ch. 5	-
pH 9	ch. 6	-
pH 10	ch. 7	-
	ch. 8	-

¹⁾Not detected TGase activity.

²⁾Detected TGase activity.

이 확인되어 본 TGase의 등전점은 pH 6.0~7.0으로 나타났다. 이 결과는 *Sv. sp. S-8112*의 TGase의 등전점이 pH 8.9 (14) 및 *Sv. mobaraense*의 약 8.0(36)이라는 보고와는 차이를 보였다.

기질친화성 측정

본 효소의 기질농도에 대한 효소반응속도는 반응액 중의 기질인 CBZ-L-Gln-Gly의 농도를 5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM로 조정하여 pH 6.0, 37°C에서 효소반응을 수행하여 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 분석하였다. Fig. 4에서와 같이, Km치는 18.5 mM CBZ-L-Gln-Gly인 것으로 나타났으며, *S. hygroscopicus*(22)의 경우 54.69 mM N-CBZ-Gln-Gly이라는 결과와 차이를 보였으며 본 효소는 기질과의 친화력이 우수하다고 사료되었다.

금속이온의 영향

금속이온이 본 효소 활성화에 미치는 영향은 Table 4에 나타난 바와 같이 공시균이 생산하는 TGase는 1 mM 농도의 Cu²⁺, Fe²⁺의 존재 시에는 약 10% 정도의 활성이 저해되었으며, 특히 1 mM Hg²⁺에 의하여 93% 이상의 효소 활성이 저해되었다. 그러나 Cd²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ 존재 시 활성이 약간 증가하는 경향을 보였다. 이 결과는 *Sv. sp. S-8112*(14)의 경우 Pb²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ 존재 시 활성이 저해되었으나 Mg²⁺, Mn²⁺ 존재 시 활성에 큰 변화가 없었다는 보고

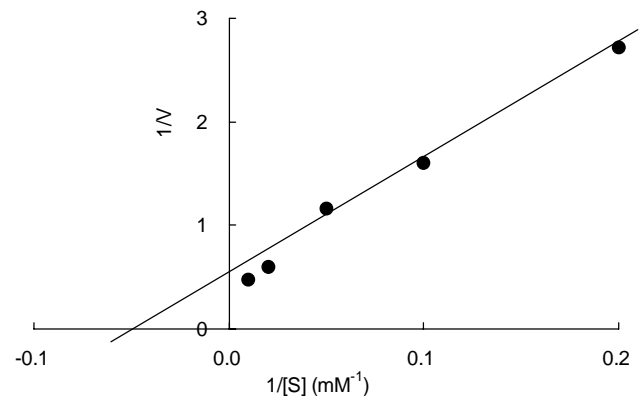


Fig. 4. Determination of Km value for TGase by Lineweaver-Burk plot. The used substrate concentrations were 5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, and 100 mM. Velocity (V) was expressed as enzyme activity (units).

Table 4. Effect of metal ions and inhibitors on the TGase activity

Chemicals	Relative activity (%)	
None	100	
Metal ions (1 mM)	Cd ⁺⁺	115
	Cu ⁺⁺	94
	Fe ⁺⁺	90
	Hg ⁺⁺	8
	Mg ⁺⁺	105
	Mn ⁺⁺	107
	Pb ⁺⁺	103
	Zn ⁺⁺	109
Inhibitors (1 mM)	2,2'-Bipyridine	74
	DTT	293
	Mercaptoethanol	220
	O-Phenanthroline	89
	Sodium azide	107
	Sodium cyanide	77
Trichloracetate	91	

와 *S. ladakanum*(20)의 경우 K⁺, Na⁺, Ca⁺⁺, Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe³⁺에는 활성이 증가하거나 큰 변화가 없었으나 Cu⁺⁺, Cd⁺⁺, Hg⁺⁺, Ni⁺⁺, Co⁺⁺, Zn⁺⁺ 존재 시에 저해되었다는 보고와 *S. hygroscopicus*(22)의 경우 K⁺, Na⁺, Ca⁺⁺, Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Ba⁺⁺, Co⁺⁺에 안정하였으나 Pb⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, Hg⁺⁺, Fe³⁺ 존재 시 효소 활성이 강하게 저해되었다는 보고와 비교할 때 효소에 따라 상이한 결과를 보였다. 즉, 일반적인 MTG의 경우 Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, Pb⁺⁺, Li⁺⁺, Hg⁺⁺에 강한 저해를 보이는데, 본 효소의 경우 Hg⁺⁺에 강한 저해를 보이는 것은 중금속이 active site로 알려진 cys 잔기의 thiol group과의 결합에 의한다는 보고(37)와 일치한다고 사료되었으며, Zn⁺⁺ 및 Fe³⁺ 존재 시의 활성 변화의 차이는 MTG 생산균주의 종류에 따라 이러한 금속 이온들의 효소 활성에 미치는 영향이 달라질 수 있는 것으로 사료되었다.

저해제의 영향

본 효소의 활성부위의 특성을 검토하기 위해 각종 저해제에 의한 효소의 활성을 검토하였다. 사용한 저해제가 1 mM 농도에서 본 효소에 미치는 영향은 Table 4에 나타난 바와 같이 DTT에 의해 293%, mercaptoethanol에 의해 219% 이상의 효소 활성을 촉진시키는 것으로 나타났으며, 다른 저해제의 존재 시에는 효소 활성에 거의 영향을 미치지 않거나 2,2'-bipyridine과 sodium cyanide에 의해서 약 25%의 저해를 받는 것으로 나타났다. 이 결과로 미루어 이 효소의 활성부위에는 thiol group이 존재하는 것으로 추정되며, 금속이온인 Hg⁺⁺의 존재 하에서 강한 저해활성을 보인 결과(Table 4)로부터 TGase의 active site로 알려진 cys잔기가 1개 존재한다는 타 연구(35) 및 선행된 연구결과(38)와도 일치하였다.

요 약

본 연구는 transglutaminase 생산능이 우수한 토양유래

방선균 strain YK-2를 TGase 최적생산배지에서 28°C, 5일간 배양하여 얻은 배양액으로 본 효소의 정제 및 정제된 효소의 효소화학적 특성에 관하여 검토한 것이다. 본 효소의 정제는 50% methanol precipitation, DEAE-Sephadex column chromatography의 정제 절차를 거쳐 56.5%의 수율로 정제되었고, 정제된 효소의 순도는 12.5% SDS-PAGE에서 단일 밴드를 나타내어, 서브유닛의 분자량이 약 45,000 dalton으로 추정되는 호모형 효소인 것을 알 수 있었다. 정제된 TGase의 생화학적 제 특성을 검토한 결과, 등전점은 pH 6.0~7.0 부근에 있는 것으로 나타났으며, 본 효소의 기질인 CBZ-L-Gln-Gly 농도에 대한 Km치는 18.5 mM으로 추산되었다. 또한 금속이온 및 저해제의 영향으로는 Hg⁺⁺에 의해서 본 효소의 활성이 강하게 저해되었으나, DTT 및 mercaptoethanol에 의해 각각 293% 및 219% 활성이 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화연구센터(TMR)의 일부 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Folk JE. 1980. Transglutaminase. *Annu Rev Biochem* 49: 517-531.
- Lorand L, Conrad SM. 1984. Transglutaminase. *Mol Cell Biochem* 58: 9-35.
- Mostoki M, Seguro K. 1994. Trends in Japanese soy protein research. *Inform* 5: 308-313.
- Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J. 1995. Microbial transglutaminase. a review on its production and application in food processing. *Appl Microbiol Biotechnol* 44: 277-288.
- Kitabake N, Doi E. 1993. Improvement of protein gel by physical and enzymatic treatment. *Food Rev International* 9: 445-471.
- Mathenis G, Whitaker JR. 1987. A review: enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *J Food Biochem* 11: 309-327.
- Nio N, Motoki M, Takinami K. 1985. Gelation of casein and soybean globulin by transglutaminase. *Agric Biol Chem* 49: 2283-2286.
- Yoshikawa M, Goto M, Ikura K, Sasaki R, Chiba H. 1982. Transglutaminase-catalysed formation of coenzymatically active NAD' analog · casein conjugates. *Agric Biol Chem* 46: 207-213.
- Ikura K, Okumura K, Yoshikawa M, Sasaki R, Chiba H. 1985. Incorporation of lysyl dipeptides into food protein by transglutaminase. *Agric Biol Chem* 49: 1877-1878.
- Hyun EH, Kim YJ. 1999. Gelation of rapeseed protein induced with microbial transglutaminase. *Kor J Food Sci Technol* 31: 1261-1267.
- Jeong JE, Hong YH. 2005. Properties of transglutaminase treated milk product powders. *Kor J Food Sci Technol* 37: 345-351.
- Ikura K, Yoshikawa M, Sasaki R, Chiba H. 1981. Incorporation of amino acid into food protein by transglutaminase.

- Agric Biol Chem* 45: 2587-2592.
13. Ichinose A, Borrenus RE, Davie EW. 1990. Structure of transglutaminase. *J Biol Chem* 256: 13411-13414.
 14. Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H, Motoki M. 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric Biol Chem* 53: 2613-2617.
 15. Pedersen LC, Yee LC, Bioshop PD, Trong IL, Teller DC, Stenkamp RE. 1994. Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules. *Protein Sci* 3: 1131-1135.
 16. Takahashi N, Takahashi Y, Putnam FW. 1986. Primary structure of blood coagulation factor XIII (fibrinolytic, transglutaminase) from human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8019-8023.
 17. Kim HC, Lewis MS, Gorman JJ, Park SC, Girard JE, Folk JE, Chung SI. 1990. Protransglutaminase E from guinea pig skin. Isolation and partial characterization. *J Biol Chem* 265: 21971-21978.
 18. Kanaji T, Ozaki H, Takao T, Kawajiri H, Ide H, Motoki M, Shimonishi Y. 1993. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain S-8112. *J Biol Chem* 268: 11565-11572.
 19. Gerber U, Jucknischke U, Putzien S, Fuchsbauer HL. 1994. A rapid and simple method for production of transglutamates from *Streptovorticillium mobaraense*. *Biochem J* 299: 825-829.
 20. Tsai GJ, Lin SM, Jiang ST. 1996. Transglutaminase from *Streptovorticillium ladakanum* and application to minced fish product. *J Food Sci* 61: 1234-1238.
 21. Duran R, Junqua M, Schmitter JM, Gancet C, Goulas P. 1998. Purification, characterization, and cloning of transglutaminase from *Streptovorticillium cinnamoneum* CBS683.68. *Biochimie* 80: 313-319.
 22. Li C, Du G, Zhang D, Liu H, Chen J. 2007. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. *Food Chem* 105: 612-618.
 23. Lin YS, Chao ML, Liu CH, Tseng M, Chu WS. 2006. Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Process Biochem* 41: 519-524.
 24. Suzuki S, Izawa Y, Kobayashi K, Eto Y, Yamadaka S, Kubota K. 2000. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 2344-2351.
 25. Klein JD, Guzman E, Kuehn GD. 1992. Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. *J Bacteriol* 174: 2599-2605.
 26. Nonaka M, Tanaka H, Okiyama A, Ando H, Umaeda K, Matsuura A. 1989. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agric Biol Chem* 53: 2619-2623.
 27. Nonaka M, Sakamoto M, Toiguchi S, Kawajiri H, Soeda T, Motoki M. 1992. Sodium caseinate and milk gels formed by incubation with microbial transglutaminase. *J Food Sci* 57: 1214-1219.
 28. Sakamoto H, Kumazawa Y, Motoki M. 1994. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. *J Food Sci* 59: 866-871.
 29. Seguro K, Kumazawa Y, Ohtsuka Y, Toiguchi S, Motoki M. 1995. Microbial transglutaminase and ϵ -(γ -glutamyl) lysine crosslink effects on elastic properties of Kamaboko gels. *J Food Sci* 60: 305-311.
 30. Kim HS, Jung SH, Lee IS, Yu TS. 2000. Production and characterization of a novel microbial transglutaminase from *Actinomyces* sp. T-2. *J Microb Biotech* 10: 187-194.
 31. Yeo SH, Yoon JH, KIM SB, Lee DG, Kim HS. 2008. Screening for and partial characterization of a new transglutaminase from *Streptomyces platensis* YK-2. *J Microbiol Biotechnol* 19: 588-595.
 32. Folk JE, Cole PW. 1966. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. *J Biol Chem* 241: 5518-5525.
 33. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
 34. Laemmli UK. 1970. Cleavage structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
 35. Toshiya K, Ozaki H, Takao T, Kawajiri H, Ide H, Motoki M, Shimonishi Y. 1993. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium* sp. strain s-8112. *J Biol Chem* 268: 11565-11572.
 36. Pasternack R, Dorsch S, Robenek IR, Wolf S, Fuchsbauer HL. 1998. Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense* purification, characterization and sequence of the zymogen. *Eur J Biochem* 257: 570-576.
 37. Lin YS, Chao ML, Liu CH, Chu WS. 2004. Cloning and expression of the transglutaminase gene from *Streptovorticillium ladakanum* in *Streptomyces lividans*. *Process Biochem* 39: 591-598.
 38. Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. 2004. Properties and application of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 447-454.

(2009년 2월 9일 접수; 2009년 6월 8일 채택)