

碩士學位論文

미생물성 transglutaminase에 의한
유채단백질의 겔화



玄 銀 姬

1998年 12月

미생물성 transglutaminase에 의한 유채단백질의 겔화

指導教授 姜永周

玄 銀 姬

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 제출함

1998年 12月



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

玄銀姬의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 高 榮 煥 ㉠

委 員 任 尙 彬 ㉠

委 員 姜 永 周 ㉠

濟州大學校 大學院

1998年 12月

Gelation of Rapeseed Protein Induced with Microbial Transglutaminase

Eun-Hee Hyun

(Supervised by professor Yeung-Joo Kang)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND ENGINEERING
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1998. 12

목 차

| | |
|--------------------------------|----|
| Summary | 1 |
| I. 서 론 | 3 |
| II. 재료 및 방법 | 10 |
| 1. 재료 | 10 |
| 2. 유채단백질 제조 | 10 |
| 3. 미생물 TGase처리에 의한 겔의 제조 | 11 |
| 1) 효소농도 영향 | 12 |
| 2) 기질단백질 농도 영향 | 12 |
| 3) 반응시간의 영향 | 12 |
| 4) 반응온도의 영향 | 12 |
| 5) 반응 pH의 영향 | 13 |
| 4. 겔강도의 측정 | 13 |
| 5. SDS-PAGE 분석 | 14 |
| 6. 겔의 현미경 구조 | 14 |
| 7. 겔 중의 GL교차 결합 함량 분석 | 15 |
| 1) 시료의 전 처리 | 15 |
| 2) HPLC의 운영 조건 | 16 |

| | |
|--|----|
| Ⅲ. 결과 및 고찰 | 18 |
| 1. 효소 농도에 따른 유채단백질의 겔화 | 18 |
| 2. 기질 단백질 농도에 따른 유채단백질의 겔화 | 21 |
| 3. 반응시간에 따른 유채단백질의 겔화 | 23 |
| 4. 반응 온도에 따른 유채단백질의 겔화 | 26 |
| 5. 반응 pH에 따른 유채단백질의 겔화 | 29 |
| 6. 전기영동 결과 | 31 |
| 7. 유채단백질 겔의 현미경 구조 | 35 |
| 8. GL [ϵ -(ν -glutamyl)lysine] 교차결합 함량 변화 | 37 |
| Ⅳ. 요약 | 41 |
| 참 고 문 헌 | 42 |



Abbreviation

| | |
|------------------------|--|
| TGase | transglutaminase |
| GL | ϵ -(γ -glutamyl)lysine |
| Tris | tris(hydroxymethylamino)methane |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| SHMP | sodium hexametaphosphate |
| S-S | disulfide |
| SPI | soy protein isolate |
| CBZ glutaminyl-glycine | N- α -carbobenzoxy-glutaminyl-glycine |
| BSA | bovine serum albumin |
| OPA | o-phthaldialdehyde |
| [E] | enzyme concentration |
| [S] | substrate concentration |

Summary

The optimum reaction conditions for gel formation of rapeseed, *Brassica napus*, protein catalyzed by microbial TGase (trans-glutaminase) were evaluated by measuring the breaking strength(g) and deformation(mm) of the gel. The polymerization of the protein gel was confirmed by SDS-PAGE, microscopic observation and content of GL crosslinking [ϵ -(γ -glutamyl)lysine] .

In the reaction between rapeseed protein and TGase at 45°C for 60min. The breaking strength and deformation of the gel was maximum at 1 : 40 of enzyme : substrate ratio.

The breaking strength of gels proportionally increased with substrate protein concentration(4~12%). 10%(w/v) was optimum for rapeseed protein gel production in terms of deformation of gel. The maximum breaking strength and deformation was shown at 45°C.

The breaking strength increased linearly up to 90 min of reaction time and afterwards reached a plateau. There was no change in from 30 min to 180 min.

The breaking strength and deformation by TGase treatment was pH dependent. pH 7 was optimum in the case of a 10% rapeseed solution.

In SDS-PAGE analysis, it was observed that high-molecular polymers were formed when bands of rapeseed protein was

diminished or disappeared in enzyme reaction.

Microscopic observation showed that protein coagulation was appeared in addition of enzyme to see the difference between reaction solution of adding enzyme and non-adding.

In HPLC analysis, GL crosslink content was detected from 0 μ mol/g gel(0 min reaction) up to the maximum of 7.14 μ mol/g gel (90 min reaction) according to reaction time. Although this confirmed that polymer is formed by TGase, GL crosslinking showed the tendency of decrease after the maximum content.

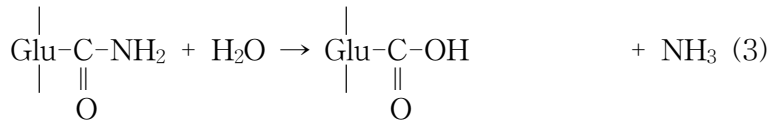
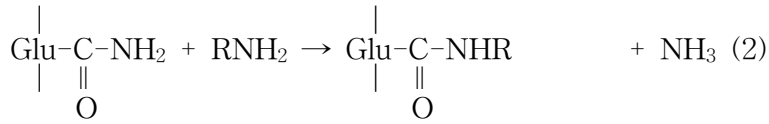
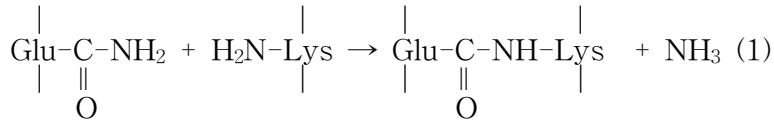


I. 서 론


단백질이 식품 소재로 이용되기 위해서는 유화성, 거품성, 겔형성능, 용해도, 보수성, 습윤성 등 단백질의 식품학적 기능적 특성이 그 판단 기준으로 작용된다. 단백질의 기능성은 영양가 또는 생리활성과는 다른 특성으로서 나타나는 단백질 구조에 따른 단백질의 물리화학적 특성으로, 식품을 제조하거나 가공하는데 각 단백질의 물리화학적 특성의 개선을 위하여 물리적, 화학적 및 효소적 변형과 같은 단백질 변형이 단백질 공학의 한 분야로 꾸준히 연구되어 왔다. 화학적 변형은 필수아미노산의 손실 등으로 영양가의 저하를 일으키거나 바람직하지 않은 부반응들을 일으키는 등의 문제점을 가지고 있으므로 식품산업에 직접 이용하기 위하여서는 영양가의 변화가 적으며, 좀더 온화한 방법인 단백질효소에 의한 효소적 변형이 주로 연구되고 있다.

단백질의 기능성 변형을 위해 주로 이용되는 효소는 단백질을 선택적으로 절단하는 가수분해형 효소와 단백질을 선택적으로 중합하는 가교중합형 효소로 나누어진다(添田, 1997).

단백질을 효소적으로 직접 가교 시키거나 또는 가교를 유발시키는 몇 가지 효소가 알려지고 있는데 이 중 단백질을 효소 반응만으로 가교를 형성시키는 것으로는 transglutaminase(이하 TGase라고 함)가 대표적이다(添田, 1997). TGase는 단백질의 가교중합화, 일급 아민 도입 및 탈아미드의 아래와 같은 3종류의 반응기작을 가진다(山崎와 添田, 1997).



- (1) 단백질분자간 가교
- (2) 단백질분자에 일급 아민 도입
- (3) 단백질분자의 탈아미노화


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

TGase는 단백질 및 펩타이드 중의 glutamine 잔기의 γ -carboxamide기와 각종 일급 아민 간의 아실 전이반응을 촉매 하는 효소로 정의되고 있다. 단백질 중의 lysine 잔기의 ϵ -아미노기가 아실 수용체로서 작용하면 분자내 및 분자간에 ϵ -(γ -glutamyl)lysine 가교결합(이하 GL교차결합이라 함)이 형성된다(1). 이 반응으로 인하여 단백질 분자가 가교중합되어 식품의 물성이 변화된다. 지금까지 공업용 소재로서 이용되고 있는 효소의 대부분은 기질을 분해하는 기능을 가진 가수분해 효소인데 반하여 TGase는 기질을 고분자화하는 특이한 효소이다. (2)는 TGase가 단백질 및 펩타이드쇄 중의 glutamine 잔기의 γ -carboxamide기와 1급 아민 간의 아미노아실 전이반응을 촉매하는 경우로 이 반응을 이용하여 단백질에 제한 필수아미노산 등을 도입하여 강화식품 제조를 위한 시도가 행하여지고 있다. 또한 TGase는 가수분해 효소를

이용하여 알칼리성 pH에서 단백질을 탈아미드화 하는 것(김과 강, 1994)과 같이 일급 아민이 존재하지 않을 경우에는 물이 아실 수용체로 작용하여 glutamine 잔기가 탈아미드되어 글루탐산으로 되는 반응을 촉매(3)하는 탈아미드화 효소로도 작용할 수 있다고 보고되고 있다(Han과 Damodaran, 1996). 이 중 겔상식품 제조와 면류 등의 품질 개선에는 (1)에 나타낸 단백질간 가교반응 특징이 활용된다(山崎과 添田, 1997).

단백질의 가교를 형성시키는 TGase는 혈액, 모낭, 뇌, 간장, 표피, 근육 등 동물의 각조직과 어류의 근육 등에 광범위하게 존재하고 있고, 효소의 특성과 작용 및 활용에 관한 연구가 활발히 진행되어 응용 가능성이 인정되고 있으나(Kumazawa 등, 1997), 식료품의 생산에 있어 이러한 동물 유래의 TGase의 상업적인 이용은 효소 생산의 높은 비용으로 인하여 거의 실용화되지 못하고 있었다.

그러나 *Streptovorticillium mobaraense*의 변종에서 생산된 미생물 체외효소인 TGase의 발견 이후로 경제적인 문제가 해결되어 식품분야에서의 응용 연구가 활발하여지고 있다(Ando 등, 1989). 즉, 미생물 유래의 TGase는 균체외로 분비되기 때문에 배양액으로부터 분리, 정제가 쉬워서 식품단백질 가공 분야에서 이용 가능성이 더욱 커지게 되었다. 미생물 유래의 이 효소는 동물에서 추출한 TGase(칼슘 의존성 효소)와는 다르게 칼슘 농도에 영향을 받지 않는 칼슘 비의존성 효소라는 점에서 식품단백질 변형에 많은 이점을 가지게 되었다. 왜냐하면 단백질을 포함하는 많은 식품재료들은 칼슘의 첨가에 따라 물리화학적 특성이 변화됨으로서(예를 들면 칼슘에 의해 응집현상이 발생하는 식품단백질) 칼슘 의존성 TGase의 기질로서의 이용이 어려워지게 된다. 따라서 이러한 칼슘 비의존성 효소의 발견은 단백질 내에 공유교차 결합으로 인한 단백질의 영양적 가치와 기능성을 변화시킬 수 있는 좀더 좋은 방법이 될 것이라

고 여겨진다(Chanyongvorakul 등, 1994). 또한 동물 유래의 TGase에 비해 열에 보다 안정하고, 작용 pH 범위도 넓어서 식품가공 분야에서 이용 폭이 동물에서 추출한 효소보다 넓어(Tsai 등, 1996; 添田 등, 1997), 각종 식품가공에 있어 유리한 성질을 갖추게 되었다.

TGase의 연구로는 casein, α, β -lactoglobulin, albumin, myosin, soybean protein, surimi, 축·어육단백질과 같은 동일 식품단백질내의 GL교차결합의 형성을 촉매하여 단백질을 겔화시키고, 그 기능성을 변화시킨다는 보고들이 있다(Ikura 등, 1984; Motoki 등, 1983, 1984; Nio 등, 1985, 1986(a), 1986(b); Matheis와 Whitaker, 1987; Tanimoto와 Kinsella, 1988; Kim 등, 1993; Chanyongvorakul 등, 1994, 1995; Kang 등, 1994; Dickinson과 Yamamoto, 1996; Kuraishi 등, 1997; Fukuda 등, 1998; Nonaka 등, 1989, 1992; Sakamoto 등, 1994, 1995; Tsai 등, 1996; Fukuda 등, 1998). 또한 단백질에 methionine, lysine과 같은 제한 필수 아미노산의 접합을 촉매하여 강화식품 제조에(Ikura 등, 1981, 1985) 이용되기도 하고, milk casein과 soybean globulin(Motoki 등, 1987a), casein과 ovomucin(Kato 등, 1991) myosin과 soya protein, casein 혹은 gluten(Kurth과 Rogers, 1984), whey protein과 casein(Traore 등, 1992), whey protein과 soybean 11S globulin(Yildirim과 Hettiarachchy, 1996, 1997)등과 같이 서로 다른 단백질간에 교차결합의 형성을 촉매하여, 이들의 기능성을 개선시킨다고 보고되고 있다. 이외에도 단백질의 탈아미드화 및 단백질 막형성 등에 이용하려는 연구 결과가 보고되었다(Motoki 등, 1986, 1987b). 즉 TGase는 단백질내 혹은 단백질간 가교중합화 기능을 기본으로 식품단백질의 기능성 개선을 가능하게 한다. 예를 들면 미가열 상태에서 각종 단백질의 겔화, 유단백질과 같은 비겔형성능 단백질에 대한 겔형성능 부여, 단백질의 겔형성능 향상과 점탄성 부여

(어육·축육 단백질, 소맥단백질, 대두단백질 등), 천연 유화상태의 단백질에 대해서도 겔화를 일으키며, 내열성, 내산성, 내수성을 가진 안정성이 높은 겔(젤라틴 등)형성 등이다. 현재 일본 등에서는 미생물성 TGase를 배합하여 식품 용도별로 조제된 효소 제품이 시판되고 있으며, 축육 가공품, 어육가공품, 제면 및 식품소재의 접착을 중심으로 한 TGase의 응용 연구가 빠르게 행하여지고 있으나(添田 등, 1997), 국내에서는 TGase에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

유채는 제주도 전역과 남해안 일대에서 재배되고 있는 중요한 식용유지 자원 중의 하나이다. 유채실에서 기름을 짜고 난 후의 유채박은 약 43%의 단백질을 함유하고 있으나 인체에 유해한 glucosinolate와 무기질의 흡수를 저해하는 phytate가 많이 함유되어 있어 현재 동물의 사료나 유기질 비료로 이용되고 있는 정도에 불과하며 아직 식품 단백질원으로는 이용되지 못하고 있는 실정이다. 그러나 유채단백질은 대부분의 유종실 단백질의 제한아미노산인 methionine이 풍부하게 함유되어 있으며 특히 lysine이 풍부하게 들어있어 아미노산 조성이 우수한 단백질이라고 알려져 있다. 또한 Sarwar 등(1985)의 유채단백질과 다른 여러 단백질들을 영양적 품질에 대하여 비교 실험한 결과에 의하면 유채단백질은 대두나 소맥과 같은 식물 원료에서 얻어낸 단백질보다도 훨씬 우수하며 우유 단백질인 casein과는 그 품질이 거의 같고, 식품학적 기능면에서도 수분, 유흡수성, 에멀전 특성, 점도 등에서 대두단백질보다 우수한 것(이 등, 1990)으로 알려지고 있다.

강 등(1990)은 제주도에서 재배되는 유채실을 품종별로 분류하여 추출 단백질의 품질을 향상시키기 위한 유채박 단백질의 추출에 관한 연구를 수행하였고, 이 등(1990)은 등전침전시킨 단백질 용액을 산 세척하고 한외여과, 농축처리하여 glucosinolate와 phytate를 충분히 제거할 수 있

는 유채단백질의 정제방법을 제시하였다. 또한 이 등(1990)은 이 공정에 의해 추출한 유채단백질은 칼슘에 대한 반응성이 높아 칼슘에 의한 단백질 응고현상을 나타내었으나, 열에 대해서는 낮은 단백질 응집현상을 보였다고 보고하고 있다.

일반적으로 효소종류, 효소농도, 온도, pH, 반응시간 등과 같은 반응 속도 변수에 의해 영향을 받는 효소반응은 대두단백질(강, 1984), casein, 어피젤라틴 등에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있으나, 유채단백질을 기질로 한 반응에 관한 연구는 김 등(1992)의 연구 외에는 거의 없는 실정이다. 유채단백질의 가수분해에 관한 연구로서는 pepsin, papain 및 trypsin을 이용하여 유채단백질 기능성 개선에 대한 연구와, 김 등(1992)이 유채단백질을 효소로 가수분해하기 위한 최적 조건을 검토하고, 이때 얻어진 가수분해물의 이화학적 성질과 기능성에 대한 연구가 있다. 그러나 현재 단백질 가공효소인 TGase를 이용한 유채단백질의 영양가, 물성 및 기능성 개선에 대한 연구는 전무한 실정이다.

대부분의 식품소재 단백질은 구상단백질로서, 구상단백질 수용액을 가열하면 분자내부에 묻혀 있는 소수성 펩티드쇄가 분자표면으로 노출되고 분자끼리 소수성 상호작용과 S-S결합 등으로 결합되어 겔을 형성한다. 그러나 유채단백질은 열에 의해 겔화되지 않는데 이러한 성질은 겔상식품 등의 가공식품 제조시 유채단백질을 이용할 수 있는 범위를 제한하여 그 부가가치를 저하시키는 요소가 된다. 따라서 본 연구에서는 산업화 되어있는 미생물성 TGase 효소를 첨가하여 겔화가 어려운 정제 유채단백질의 겔화를 시도해 봄으로서 새로운 물성을 가진 유채단백질 제품의 생산 가능성을 타진해 보려고 한다. 따라서 유채단백질의 겔화에 영향하는 TGase작용 조건에 대한 여러 영향인자를 조사하여 좀더 효율

적인 유채단백질의 겔화방법과 겔 특성을 살펴보고, 겔의 고분자화를 SDS-PAGE, 현미경 관찰 및 GL교차결합 함량 측정에 의하여 확인함으로써 유채단백질의 식품소재 개발과 이용 가능성에 관한 기초 자료를 제공하려 한다



II. 재료 및 방법

1. 재료

*Streptoverticillium mobaraeuse*에서 생산된 효소활성이 1 unit/mg인 미생물 TGase (ACTIVA TG, Ajinomoto Co. Inc. Japan)를 구입하여 사용하였으며, 기질로는 Youngsan 종 유채(*Brassica napus*)에서 단백질을 분리하여 사용하였다. Pronase(53702, Calbiochem, U.S. A), leucine aminopeptidase(L5006, Sigma), prolidase(P6675, Sigma), carboxypeptidase A(CO261, Sigma), 합성 ϵ -(ν -glutamyl)lysine(G5136, Sigma), o-phthaldialdehyde(P0657, Sigma), methanol(270474, Sigma), tetrahydrofuran(270384, Sigma), potassium acetate(P0657, Sigma)를 구입하여 사용하였고, 나머지는 분석용 시약을 사용하였다.

2. 유채단백질 제조

Brassica napus(Youngsan종)를 시중에서 구입하여 정선하고 분쇄하여 체질과 풍선에 의하여 껍질을 제거하고 실온에서 유채실 1 kg에 대하여 n-hexane 2ℓ 씩 가하여 24시간 탈지를 4회 반복 후 일건하고, 건조된 유채박을 다시 60 mesh로 분쇄하여 유채박분을 만들고, 이 등(1990)의 방법에 따라(Fig. 1) 유채박분에서 단백질 함량 65.6%인 유채단백질을 분리, 정제하여 기질단백질로 사용하였다.

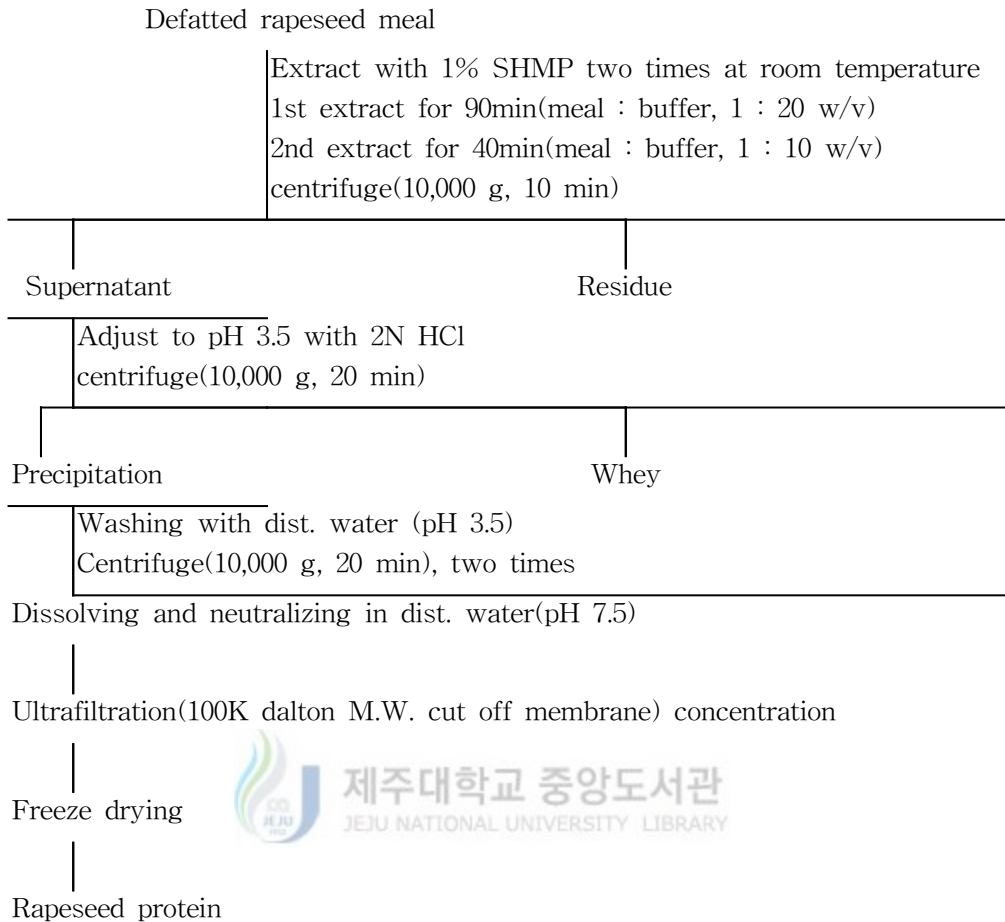


Fig 1. Preparation of rapeseed protein.

3. 미생물 TGase처리에 의한 겔의 제조

Sakamoto 등(1994)의 방법을 기본으로 예비 실험을 거쳐 실험 조건 (효소농도, 기질농도, 반응온도 및 시간, pH)을 설정하였다. 유채단백질을 Tris-HCl 완충용액에 현탁하여 원하는 농도와 pH 조절을 한 후 TGase를 농도를 달리하여 시료용액에 첨가하였다. 이들 혼합물(5 ml)을 작은 유리병 용기(외경 21 mm, 높이 28 mm)에 거품이 혼입되지 않도록 주

이하면서 넣고 잘 밀봉한 다음 수조에서 정해진 온도와 시간동안 반응시켰다. 효소반응 후에 수조(85℃)에서 5분 동안 효소를 불활성화 시킨 후 상온으로 냉각시켜 겔강도 및 변형 측정을 위한 시료로 사용하였다.

1) 효소농도 영향

기질단백질 2 g에 Tris-HCl 완충액(pH 7)에 20 ml를 가한 후 교반하여 10%(w/v) 용액을 만들고 여기에 효소를 0.02 g(기질 : 효소 = 1 : 100, w/w), 0.025 g(기질 : 효소 = 1 : 80, w/w) 0.033 g(기질 : 효소 = 1 : 60, w/w), 0.05 g(기질 : 효소 = 1 : 40, w/w), 0.1 g(기질 : 효소 = 1 : 20, w/w)을 가하여 45℃에서 60분 동안 반응시켰다.

2) 기질단백질 농도 영향

기질단백질 0.8 g, 1.2 g, 1.6 g, 2 g, 2.4 g에 완충용액(pH 7) 20 ml를 가한 후 교반하여 4, 6, 8, 10, 12%(w/v) 농도의 용액을 만들고 여기에 효소 0.05 g(효소 : 기질 = 1 : 40, w/w)을 가하여 혼합후 45℃에서 60분 동안 반응시켰다.

3) 반응시간의 영향

기질단백질 2 g에 완충용액(pH 7) 20 ml를 가하여 10%(w/v) 농도의 용액을 만들고 여기에 효소 0.05 g(효소 : 기질 = 1 : 40, w/w)을 첨가한 후 45℃에서 30, 60, 90, 120, 180분 동안 반응시켰다.

4) 반응온도의 영향

기질단백질 2 g에 완충용액(pH 7) 20 ml를 가하여 10%(w/v) 농도의 용액을 만들고 여기에 효소 0.05 g(효소 : 기질 = 1 : 40, w/w)을 첨가

한 후 25, 35, 45, 55, 65℃에서 60분 동안 반응시켰다.

5) 반응 pH의 영향

기질단백질 2 g에 완충용액(pH : 4~6 ; citrate 완충용액 사용, pH : 7~9; Tris-HCl 완충용액 사용) 20ml를 가하여 10% (w/v)농도의 용액을 만들고 여기에 효소 0.05 g(효소 : 기질 = 1 : 40, w/w)을 첨가한 후 45℃에서 60분간 반응시켰다.

4. 겔강도의 측정

겔강도는 Sakamoto 등(1995)의 방법을 약간 변형하여 rheometer로 다음 조건에 따라 측정하였다.

Table 1. Conditions for texture analysis of rapeseed gel

| | |
|-----------------|----------------------------------|
| Instrument | SUN rheometer(COMPAC-100, Japan) |
| Crosshead speed | 60 mm/min |
| Chart speed | 120 mm/min |
| Plunger type | spherical(10 mm) |

즉, 용기안에 있는 일정한 규격(직경 20 mm, 높이 15 mm)의 시료를 직경 10 mm의 구형 plunger로 눌렀을 때 최초로 파괴가 일어날 때의 하중을 겔강도(breaking strength, g)로, 이때의 깊이를 변형(deformation, mm)으로 나타내었다. 겔강도와 변형값은 3회 반복 측정한 값의 평균치로 취하였다.

5. SDS-PAGE 분석

SDS-PAGE(sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel)는 Laemmli(1970)의 방법에 따라 시료(0.2 g)를 0.0625M Tris-HCl 완충용액(pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, bromophenol blue를 함유한 완충액 10 ml에 현탁시킨 후 이 혼합물을 끓는 물에서 1분 30초간 열처리하고 상온으로 냉각시켜 시료로 사용하였고, 규격이 130 x 1 x 120(mm, W x D x H)인 slab gel(3% stacking gel, 12.5% separating gel)을 만들어 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 분석을 행하였다. 전개 길이는 10 cm이며 전개 완충액은 pH 7.0으로 조정하여 사용하였다. 주입 시료량은 20 μ l이며 시료당 5 mA의 전류를 사용하여 3시간 동안 실온에서 전개하였다. 전기영동 후 SDS-PAGE gels을 coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 증류수 : 무수에탄올 : 빙초산(6 : 3 : 1, v/v) 용액으로 탈색하였다.

6. 겔의 현미경 구조

Tris-HCl 완충액(pH 7.0)에 10%의 농도로 유채단백질을 현탁한 후 에 효소와 기질의 비가 1 : 40이 되도록 효소를 첨가하여 45°C에서 180분간 반응으로 얻어진 유채단백질 겔을 일정량 취하여 slide glass에 얇게 퍼지도록 놓고 cover glass로 덮어 시료로 사용하였고, 같은 조건에서 효소를 첨가하지 않은 시료를 같은 방법으로 취하여 광학현미경(x400, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

7. 겔 중의 GL교차결합 함량 분석

1) 시료의 전처리

Lee 등(1997)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 일정조건에서 반응 후 동결건조된 시료(20 mg)를 0.1M potassium borate 완충액(pH 8.0) 3 ml에 용해시키고 세균번식을 방지하기 위해 소량의 thymol을 첨가하였다. Pronase(2 unit/mg protein)를 이 혼합물에 가하여 24시간 동안 반응시킨 후(2회 반복), 100℃에서 10분간 가열하여 pronase를 불활성화 시켰다. Leucine aminopeptidase(0.5 unit)와 prolidase(0.5 unit)를 이 용액에 첨가하고, 24시간 반응 후에 leucine aminopeptidase(0.5 unit)를 다시 첨가하고 24시간 더 반응시켰다. 마지막으로 carboxypeptidase A(0.5 unit)를 가한 후 이 반응물을 24시간 반응시키고 100℃에서 10분간 열처리로 효소를 불활성화 시켰다. 단백질효소에 의한 가수분해는 모두 37℃에서 행하였다. 분해된 시료를 0.5 μ m Millipore filter로 여과 후 동결건조시켜 GL 교차결합 함량 측정의 시료로 사용하였다. 건조된 분해 시료(4 mg)에 0.5 ml 증류수를 가한 후 50 μ l를 취하고 500 μ l 유도체화 시약으로 상온에서 2분간 처리한 후 즉시 이 반응물 100 μ l를 HPLC에 주입하였다. 표준품으로는 합성 ϵ -(γ -glutamyl)lysine 1 mg을 2 ml 증류수에 녹여 10 μ l 취하고 100 μ l 증류수와 혼합하여 310 μ l 유도체화 시약과 시료와 같은 조건에서 반응시켰다. 유도시약은 pH 10.4인 0.4M potassium borate 1 ml에 무수 o-phthaldehyde(OPA) 6 mg을 녹여(이 용액은 매일 만들고 찬 곳에 보관해야 함) 시료와 반응시키기 바로 전에 methanol과 1 : 1 비로 희석하고 2-mercaptoethanol를 최종농도가 2%가 되도록 가하여 제조하였다.

2) HPLC의 운영조건

Table 1. HPLC conditions for analysis of ϵ -(γ -glutamyl)lysine

| | |
|--------------------|--|
| Column | Altech C ₈ column(250 X 4.6mm) |
| Solvent system | Solvent A(20mM K-acetate(pH 5.5) with 1% tetrahydrofuran) Solvent B(methanol with 1% tetrahydrofuran) |
| Detector | Fluorescence detector (FL 2000) |
| Injection volume | 100 μ l |
| Flow rate | 1.5 ml/min |
| Column temperature | 40°C |

HPLC(Spectra-Physics Co., USA)를 사용하였으며 두 가지 용매로 구성된 용액 시스템에서 methanol(용매 B)의 함량을 20%에서 95%까지 달리하여 기울기 용리(gradient elution)를 행하였다. 분석에 사용하는 검출기는 형광검출기(FL 2000)를 사용하여 interference excitation : 334 nm, emission : 440 nm에서 측정하였으며, 분리는 40분간 실시하였다. 이와 같은 조건에 따라 표준품 GL결합을 검출한 표준곡선은 Fig. 2와 같다.



Retention time, min

Fig. 2. HPLC profiles of standard ϵ -(γ -glutamyl)lysine. An arrow indicates the position of ϵ -(γ -glutamyl)lysine.

III. 결과 및 고찰

1. 효소농도에 따른 유채단백질의 겔화

효소첨가량이 기질단백질의 겔 형성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 기질단백질 농도가 10%인 반응용액을 pH 7, 45°C에서 1시간 동안 다양한 농도의 효소와 반응시킨 후 겔 겔강도(breaking strength, g)와 변형(deformation, mm)을 측정하였다(Fig. 3).

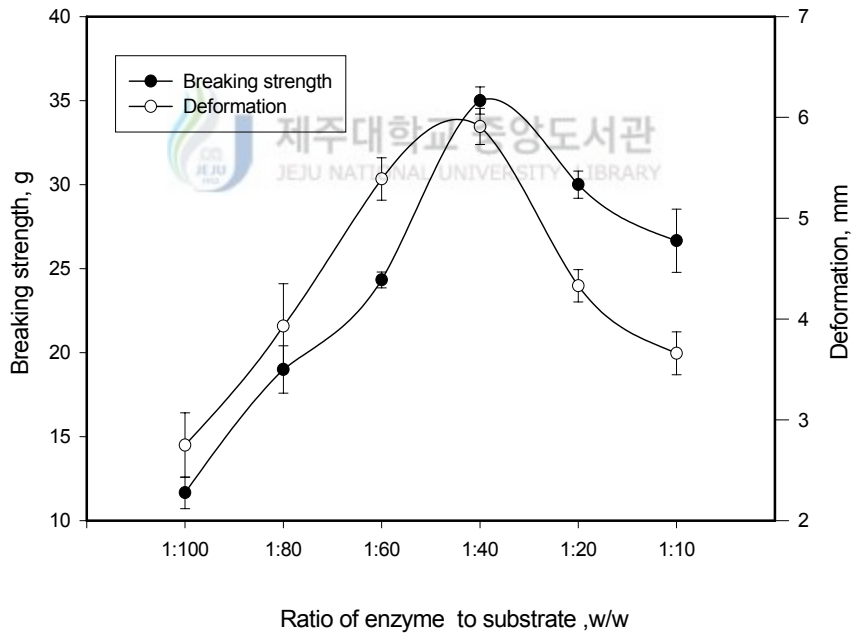


Fig. 3. Effects of ratio of enzyme to substrate on breaking strength and deformation of rapeseed protein gels formed by transglutaminase at 45°C for 1hr. The concentration of rapeseed protein was 10% and the pH of reaction mixture was 7.

예비실험을 통해 유채단백질이 TGase의 기질로서 반응한다는 것을 알아내고 열에 의한 겔화능이 약한 유채단백질에 TGase를 첨가하여 이들의 겔 형성능과 특성을 살펴보았다.

반응용액에 효소가 첨가되지 않았을 경우에 반응용액은 열처리 후에도 처음과 아무런 차이를 보이지 않았으나 같은 조건에서 TGase를 첨가하였을 때에는 유채단백질 용액은 겔을 형성하였다. Nonaka 등(1992)도 sodium caseinate를 기질로 하는 TGase반응 실험에서 기질단백질을 55℃에서 1시간 동안 반응시켰을때 효소를 첨가하지 않은 경우에는 단백질 겔이 형성되지 않았으나 10 unit 이상의 효소가 첨가된 경우에는 반응액의 점성이 높아지거나 겔을 형성하였다고 보고하였다.

TGase 첨가량이 증가함에 따라 TGase에 의해 형성된 유채단백질의 겔강도도 비례적으로 증가하고 있어 TGase의 첨가는 유채단백질 용액의 겔화시킬 뿐만 아니라 겔의 물성개선에 도움을 주고 있음을 보여주었다. 그러나 효소와 기질 비가 1 : 40(w/w) 이후로 더 이상의 증가를 보이지 않고 오히려 겔강도 값은 약간 감소되는 경향을 보이고 있어 단백질겔 제조시 적당량의 TGase첨가는 겔의 형성과 물성에 많은 도움을 주지만 지나친 양의 첨가는 오히려 겔을 약화시키고 부서지기 쉬운 상태로 만들고 있다고 생각되어진다. 이는 TGase 촉매작용으로 인한 단백질 내에 지나친 GL교차결합의 형성이 단백질 망상구조의 규칙적인 형성을 방해하기 때문(Sakamoto 등, 1994, 1995a)으로 여겨진다.

겔의 변형도 효소와 기질 비가 1 : 40(w/w)까지는 직선적으로 증가하다가 그 후로는 급격히 감소하고 있어 1 : 40(w/w)까지는 효소에 의해 유채단백질 겔은 비교적 파쇄됨이 없이 외부의 힘에 잘 견딜 수 있으나 효소첨가량이 지나치게 많아지면 단백질 겔내의 지나친 GL공유교차결합의 형성으로 부서지기 쉬운 상태가 되고 있음을 보여주고 있다.

Seguro 등(1995)도 어묵 제조시 TGase 첨가농도에 따라 겔강도와 변형을 측정하였는데 기질이 되는 시료의 단백질 농도와 전처리 온도에 따라 약간의 차이를 보이기는 하나 효소농도의 증가에 따라 겔강도와 변형이 증가되어 단단하고 탄력성 있는 겔을 형성하는데 있어 효소가 많은 도움을 주어 저급 연육의 겔강도와 탄성보강을 위해 TGase를 이용할 수 있는 가능성을 보여주고 있었으나 효소첨가량이 일정량 이상이 되면 더 이상 증가를 보이지 않거나 오히려 TGase 첨가가 겔의 탄성을 저하시켰다고 보고하고 있다. 添田(1997)도 분리대두단백질(SPI)과 미생물성 TGase 반응시 pH 5.5에서 10 unit까지, pH 6.5에서 1 unit까지 첨가하였을 때 겔강도(g/cm^2)는 처음의 약 2배 가량 증가하였으나 그 이상에서는 오히려 겔강도가 저하되고 있다고 보고하고 있다. 따라서 기질이 되는 단백질의 종류에 따라 양이 달라지겠지만 지나친 효소의 첨가는 오히려 단백질겔의 품질을 떨어뜨리는 결과를 가져오므로 유채단백질인 경우 겔 제조시에 사용되는 효소첨가량은 강도와 탄성을 고려할 때 기질농도의 비를 1 : 40(w/w)으로 첨가하는 것이 적당할 것으로 여겨진다

2. 기질단백질 농도에 따른 유채단백질의 겔화

효소촉매 반응시 반응용액의 기질 단백질 농도에 따라 겔강도(g)와 변형(mm)의 변화는 Fig. 4와 같다.

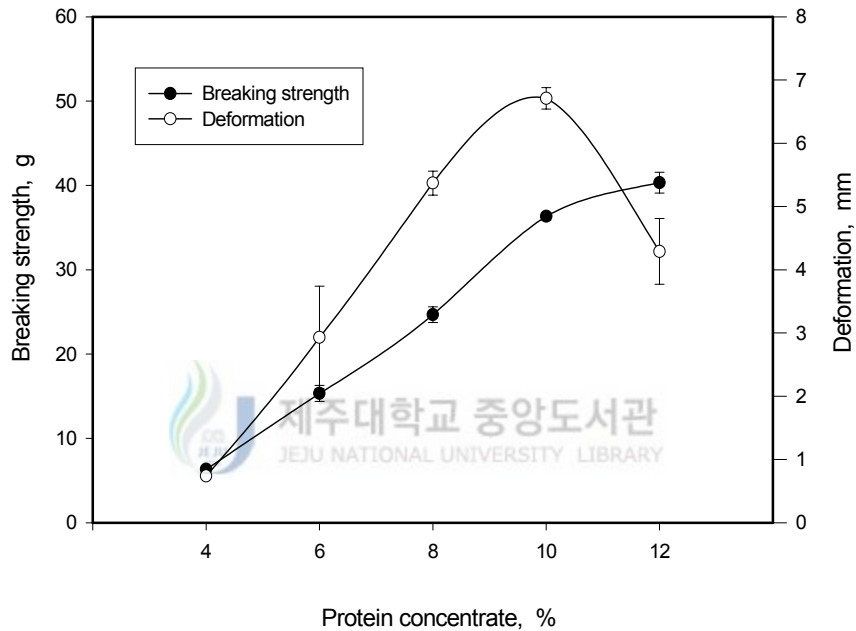


Fig. 4. Effects of protein concentration on breaking strength and deformation of rapeseed protein gels formed by transglutaminase at 45°C for 1hr. Ratio of enzyme to substrate was 1 : 40(w/w) and the pH of reaction mixture was 7.

효소를 첨가하지 않은 반응용액은 기질단백질 농도를 12%까지 높여도 겔이 형성되지 않았으나 같은 조건에서 TGase를 첨가하였을 때는 기질농도 4%에서 겔이 형성되기 시작하여 겔강도는 기질단백질 농도가 증

가함에 따라 직선적으로 증가하였다. Nio 등(1985)도 동물 유래 TGase에 의한 겔형성시 효소반응은 단백질 농도에 의해 크게 영향을 받아 기질단백질 농도가 높을수록 겔이 형성되는 속도가 빠르다고 하였고, α_{s1} -casein(pH 8)인 경우는 3% 이상에서, soybean 11S, 7S globulin(pH 7)은 8% 이상에서 겔을 형성하기 시작하여 그 이상의 농도에서의 겔강도는 급속한 증가를 보였으나, TGase 무첨가 단백질 용액은 같은 조건에서도 아무런 변화를 보이지 않고 있다고 보고하고 있다. Chanyongvorakul 등(1994)이 연구한 11S globulin에서도 본 실험과 비슷한 결과를 보여주고 있어 TGase의 기질로서 작용하는 몇 종류의 단백질을 TGase와 반응시켰을 때 단백질 분자내 GL교차결합의 형성으로 단백질의 중합이 이루어져 겔이 형성되지 않는 단백질에 겔 형성능을 부여하고 있음을 알 수 있다.

4%, 6% 기질단백질 농도에서는 유채단백질겔형성시 수분분리 현상을 보이고 있어서 이때 형성된 겔, 즉 저농도 단백질겔은 낮은 수율을 얻는 것으로 여겨진다. 이는 TGase 반응에서 생성된 저농도 용액의 겔은 물리적 망상구조의 형성이 고농도에 비해 잘 이루어지지 않아 3차원적 매트릭스 구조에서 물을 잡을 수 있는 능력이 떨어짐으로서 발생하는 현상으로 여겨진다. 반면 고농도의 단백질 용액에서는 TGase에 의해 공유결합이 규칙적으로 전개되어, 매트릭스의 형성이 잘 이루어져 단단한 겔이 형성되어진다(Nio 등, 1985). Chanyongvorakul 등(1994)의 실험에서도 기질단백질 농도가 3%일 때 생성된 겔에서의 수분손실율은 시료를 원심분리하였을 경우 70% 정도, 6% 농도의 겔에서는 20% 정도의 수분손실을 보고함으로써 효소반응에 있어 기질단백질 농도의 선택은 겔의 생성능과 물성 뿐만 아니라 또 다른 기능성인 수화능을 고려할 때 매우 중요할 것으로 생각되어진다.

단백질 겔변형은 8%까지는 직선적으로, 10%까지는 완만한 증가를 보이고 있으나 그 이후로는 감소하였다. 이는 12% 농도의 유채단백질 겔은 겔강도가 높은 것으로 보아 단단하기는 하나 부서지기 쉬운 성질을 가지고 있음을 나타낸다.

따라서 유채단백질 겔제조에 있어서 겔강도와 외부힘에 잘 견딜수 있는 조건을 고려한다면 단백질 농도로는 10%가 가장 적당하였다.

3. 반응시간에 따른 유채단백질의 겔화

Fig. 5는 45°C에서 유채단백질과 TGase를 반응시켰을 때 반응시간에 따른 유채단백질겔 특성을 나타낸 그림이다.

효소를 처리하지 않았을 경우 단백질 용액은 45°C에서 180분간 반응시켜도 겔을 형성하지 않았으나 효소를 첨가하였을 경우는 시간이 경과함에 따라 처음에는 점성이 증가하다가 점점 겔화가 이루어져 반응시간이 증가함에 따라 유채단백질 겔강도가 증가하였다. 반응시간 90분까지는 겔강도가 직선적으로 증가하다가 그 이후로는 90분에서의 겔강도와 거의 비슷한 값을 보이고 있어 반응시간 90분 이후에는 더 이상 단백질과 효소간의 반응이 이루어지지 않고 있음을 짐작할 수 있다. 그러나 예비실험시 같은 조건에서 반응용액을 반응온도 37°C로 반응시켰 때는 반응시간의 증가함에 따라 240분까지도 겔강도가 증가하는 경향을 보여 45°C에서와는 달리 반응 240분까지도 효소촉매 반응이 진행되고 있음을 보여 주었다. Sakamoto 등(1994)도 여러 가지 TGase처리 단백질의 반응시간에 따른 겔강도 측정에서 분리대두단백질인 경우는 30분, caseinate과 젤라틴인 경우는 120~250분에서 최대 값을 나타낸다고 보고하고 있어 기

질단백질의 종류에 따라, 같은 단백질인 경우에도 효소-단백질 반응온도에 따라 최대 활성을 나타내는 시간이 현저히 다를 수 있다.

Tsukamasa 등(1993)은 정어리에서 분리한 근원섬유 단백질 겔강도는 3시간까지는 급속히, 그 이후에는 완만한 증가를 보이나, 겔 변형은 1시간까지는 급속히 증가하였으나 그 이상의 반응에는 값의 변화를 거의 보이지 않고 있다고 보고하고 있어 유채단백질겔과 비슷한 경향을 보였다. 10% 반응용액을 45℃에서 1시간 동안 반응시켰을 때 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 여겨진다.

효소반응의 진행은 온도와 시간에 따라 결정되어 높은 온도에서는 반응시간이 짧아지고, 낮은 온도에서는 반응시간이 길어진다. 즉 효소반응의 조절이 가능하므로 반응에 필요한 온도와 시간은 가공할 식품의 종류와 목표로 하는 물성에 따라 결정되어야 할 것이다. 식품단백질 겔 제조시 반응시간 혹은 온도의 증가는 겔강도를 증가시키나 지나친 반응시간은 겔의 품질 향상에 도움을 주지 않는다. 따라서 TGase에 의한 유채단백질겔 제조시 45℃ 반응온도에서는 90분 이상으로 반응시킨다는 것은 무의미한 것으로 여겨진다.

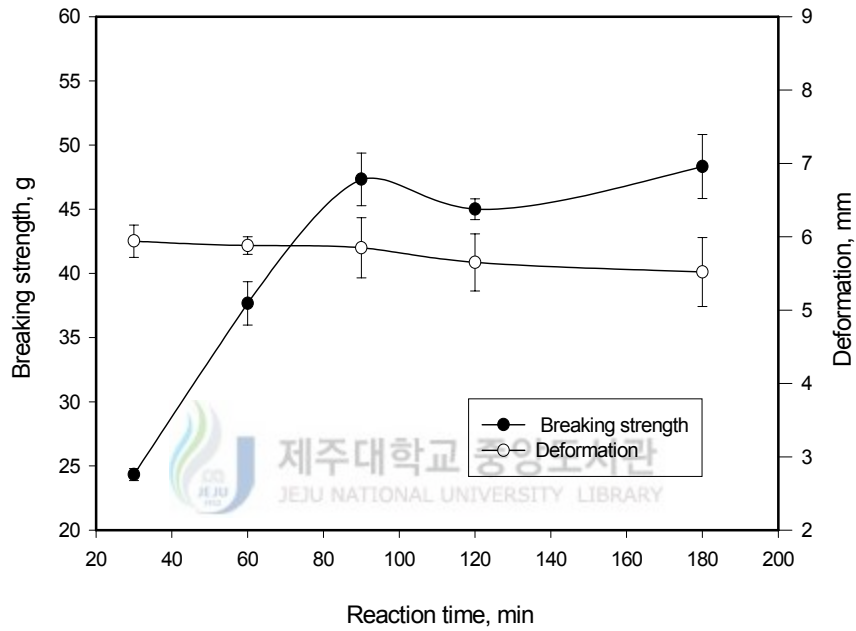


Fig. 5. Effects of reaction time on breaking strength and deformation of rapeseed protein gels formed by transglutaminase at 45°C. The concentration of rapeseed protein was 10%. Ratio of enzyme to substrate was 1 : 40(w/w) and the pH of reaction mixture was 7.

4. 반응온도에 따른 유채단백질의 겔화

반응온도가 효소촉매에 의한 유채단백질겔에 미치는 영향을 살펴보기 위해서 25, 35, 45, 55, 65°C에서 실험을 하였다(Fig. 6)

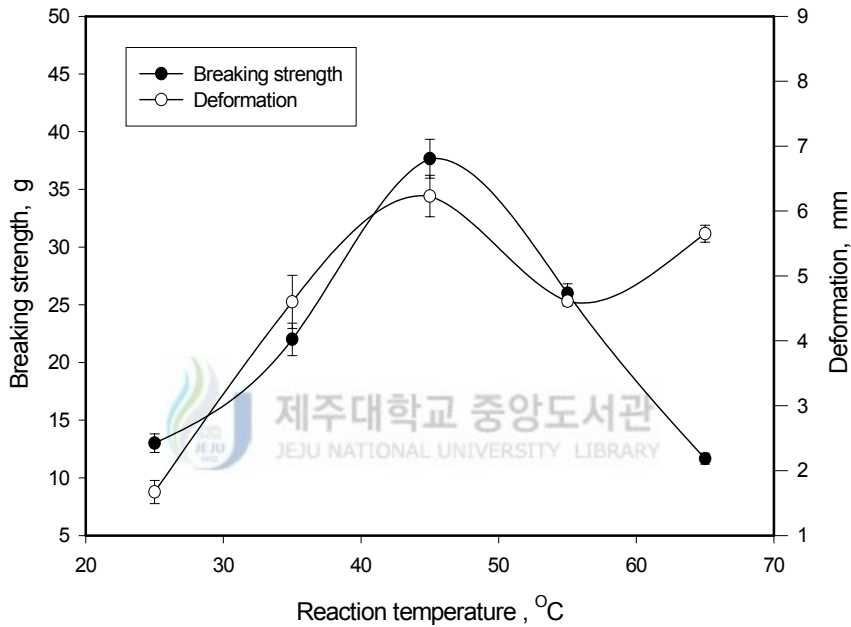


Fig. 6. Effects of reaction temperature on breaking strength and deformation of rapeseed protein gels formed by transglutaminase for 1hr. The concentration of rapeseed protein was 10%. Ratio of enzyme to substrate was 1 : 40(w/w) and the pH of reaction mixture was 7.

대부분의 다른 단백질과는 달리 유채단백질은 상당히 열에 안정하여 (이 등, 1990) 효소처리 하지 않은 단백질 수용액은 반응온도를 100°C까지 높였을 때도 부분적인 단백질 침전 현상이 있었을 뿐 겔화가 이루어

지지는 않았다. 그러나 효소처리 시료인 경우는 상온(25℃)에서도 겔화가 이루어졌으며 가열조작의 병행으로 단백질의 겔화능력이 증강되어 반응온도 45℃까지 겔강도는 반응온도에 비례하여 증가함을 보이고 있다. 그러나 그 이상의 반응온도에서 겔강도가 감소되고 있는 것으로 보아 효소활성이 급속히 감소되고 있음을 알 수 있다. 변형 역시 45℃까지는 증가하였으나, 55℃에서는 겔강도와 더불어 감소하였다.

Ando 등(1989)은 미생물 TGase반응에서 합성기질(hydroxylamine과 CBZ-glutaminy-glycine)을 이용한 효소활성 실험에서 효소활성의 최적온도는 약 50℃이고(pH 6, 10분간 처리), pH 7에서 10분간 40℃로 처리하였을 때는 100% 활성이 남아 있었으나, 50℃, 10분 반응시 초기활성의 25%를 상실하였고, 60℃, 5분 반응시는 효소활성을 완전히 잃어버렸다고 보고하고 있다. 또, Dickinson과 Yamamoto(1996)도 미생물성 TGase는 40℃에서 매우 안정하여 pH 7에서 4시간 처리 후에도 초기활성의 90%가 남아있으나, 55℃에서는 30분 후에 초기활성의 13%만 잔존하고, 3시간 후에는 약 1~2%만 잔존하였다고 보고하고 있다. 그러나 식품단백질을 기질로 사용하였을 경우에는 식품속에 함유되어 있는 어떤 성분들이 효소의 열안정성에 영향을 미쳐 열처리로 인하여 효소가 불활성화되는 것을 어느 정도 완화시켜 효소의 열안정성이 증대되는 경향이 있는 것으로 보고(Sakamoto 등, 1995a)되고 있다. 대부분의 식품에 있어서 75℃에서 TGase는 실활되는 것으로 확인되고 있기는 하나 실활에 필요한 온도와 시간은 기질의 종류에 따라서 다르다. 또한 실활까지 소요되는 시간은 중심온도에 의해서 결정되는데, 중심온도 65℃에서 실활되는데 걸리는 시간은 2시간 이상, 70℃에서는 15분 이내, 75℃에서는 5분 이내, 80℃에서는 1분 이내의 실활 소요시간이 필요하다고 한다.

TGase 촉매에 의한 유채단백질겔 제조시 반응온도 45℃는 효소가 최

대의 활성을 나타낼 수 있도록 하는 최적온도로 여겨지며 그 이상의 온도에서는 오히려 효소의 열안정성을 저하시켜 겔강도나 겔변성을 감소시키는 것으로 생각되어진다. Sakamoto 등(1994)의 분리대두단백질, 카제인, 젤라틴 등을 기질로 한 단백질 실험에서 최대 겔강도의 값은 50 또는 60℃에서 나타났다고 하였으며, 어묵겔에서 TGase에 의한 겔강도와 변형은 10℃에서 반응시켰을 때에도 증가하였다고 하였으며(Saguro 등, 1995), surimi 제조시(Sakamoto 등, 1995)는 30℃에서 최대 겔강도를 나타낸다고 보고함으로서 기질에 따라 최대 겔강도를 나타내는 온도가 다를 수 있다. 또 Kang 등(1994)은 soybean glycinin-TGase 촉매반응시 glycinin을 100℃에서 30~120초간 열처리 하였을 때 glycinin표면에 lysine과 glutamine잔기 함량의 증가로 인해 변형되지 않은 천연(native) 상태의 단백질에서 보다 TGase촉매에 의한 폴리머 형성이 더 잘되었다고 보고하였다.



유채단백질에서는 열처리하지 않고도(상온, 25℃) 효소처리에 의해 겔이 형성되고 있어 비가열상태 겔식품의 제조시에도 유채단백질의 응용범위가 넓어질 것으로 기대되어진다. Kuraishi 등(1997)도 0.5% caseinate을 넣은 분쇄한 돼지고기에 0.5% TGase를 첨가하여 저온(5℃)에서 반응시켰을 때 겔이 형성됨으로서 열처리나 염의 첨가없이 즉 냉동하거나, 익히지 않은 상태 혹은 저염농도의 재조직육(restructured meat) 제조에 TGase가 사용되어질 수 있는 가능성을 보여주고 있었다.

5. 반응 pH에 따른 유채단백질의 겔화

반응용액의 pH가 단백질-효소반응에 의해 생성되는 겔의 겔강도와 변형에 미치는 영향을 측정하였다(Fig. 7).

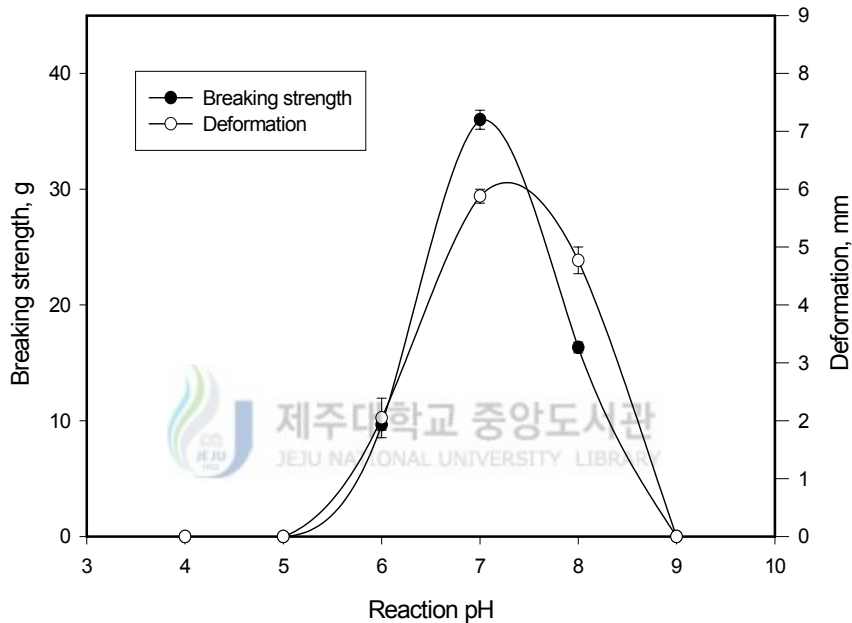


Fig. 7. Effects of pH on breaking strength and deformation of rapeseed protein gels formed by transglutaminase at 45°C for 1hr. The concentration of rapeseed protein was 10%. Ratio of enzyme to substrate was 1 : 40(w/w).

Tsai 등(1996)은 *Streptverticillium ladakanum*으로 부터 얻은 TGase는 hydroxylamine과 CBZ-glutaminy1-glycine의 촉매반응에서 최적 pH는 5~7.5라고 보고하였다. Motoki 등(1992)도 hydroxylamine과 CBZ-glutaminy1-glycine를 기질로 사용하였을 때 *Streptverticillium moba-*

raense, *Streptverticillium griseocarneum*, *Streptverticillium cinnamoneum*의 미생물에서 추출한 TGase의 최적 pH는 모두 6~7이며 pH 5~9, pH 6~9 부근에서 안정성을 가져 활성을 보였으나 동물유래의 TGase인 경우는 최적 pH는 6이고, pH 6~7.5 범위에서 활성을 갖는다고 보고하고 있다. 따라서 pH에 따른 TGase의 활성은 추출하는 미생물에 따라 최적 pH나 활성을 갖는 pH 범위가 약간씩 다르기는 하지만 미생물 TGase는 동물 유래의 TGase에 비해 pH 변화에 덜 민감하여 비교적 응용가능성이 넓다고 보고되고 있다. 그러나 실제 유채단백질 실험에서는 pH 4, 5, 9에서는 겔이 형성되지 않았고, pH 6, 7, 8에서만 효소 촉매에 의한 겔이 형성되고 있어 유채단백질을 기질로 하였을 때는 TGase가 단백질 내에서 촉매작용을 할 수 있는 pH 범위는 그리 넓지 않은 것으로 여겨진다. 겔강도와 변형은 pH 7에서 최대값을 보이고 있어 유채단백질 겔제조에 가장 적합한 조건이라고 여겨진다. Nio 등 (1986)도 pH 6~7 인 10% 7S globulin emulsion 용액에 TGase 첨가하였을 때 빠르게 단백질 용액의 겔화가 이루어지나 pH 9에서는 겔화가 이루어지지 않았다고 보고하였다. 그러나 Sakamoto 등(1994)은 분리대두 단백질, caseinate 및 난황을 기질로 하여 미생물성 TGase 촉매 반응시에 pH 9에서, 젤라틴과 난백인 경우는 pH 6에서 겔강도값이 최대치를 나타낸다고 보고하고 있어, 유채단백질을 시료로 하였을 때와 다른 결과를 보여주고 있었다.

유채단백질의 등전점은 산성 부근으로 pH 4~5에서는 단백질의 부분적인 침전이 일어나 반응용액의 효소촉매반응이 잘 이루어지지 않아 겔화가 이루어지지 않은 것으로 여겨진다. 또 pH 9는 반응용액의 용해도가 증가하는 범위이나, 미생물 TGase의 등전점 부근(pH 9~9.8)이라서 TGase의 활성과 안정도가 영향을 받아 유채단백질의 효소촉매 반응

에 영향을 주는 것으로 생각되어진다. Larré 등(1993)도 산성 pH(pH 5, 6)에서 TGase는 좋은 활성을 가지나 기질단백질인 legumin의 부분적인 침전으로 인하여 기질로서 작용할 수 있는 능력의 감소를 보였고, 염기성 pH(pH 8.5 이상)에서는 단백질의 해리정도와 용해도는 증가하나 이 부근에서 효소가 빠르게 변성 되어 효소반응의 저하를 보이고 있다고 보고하고 있다. 즉 이러한 결과의 차이는 기질특이성 뿐만 아니라 효소 특성과 같은 여러 요소에 의해 영향을 받는 것으로 보고되고 있다 (Sakamoto 등, 1994).

반응용액은 pH 8에서도 겔화가 비교적 잘 일어나기는 하였으나 pH 6이나 7에서 얻어진 겔 보다 색택이 약간 어두어졌다. 이것은 유채단백질이 알칼리성에서 색택이 어두어지고 풍미가 나빠지는 성질(Serriaino와 Thompson, 1984) 때문으로 여겨진다.



6. 전기영동 결과

TGase 촉매로 유채단백질 분자내 glutamine과 lysine 간에 공유결합에 의한 폴리머의 형성을 살펴보기 위하여 TGase 처리하지 않은 시료와 TGase에 의해 형성된 유채단백질 겔을 시료로 하여 SDS-PAGE 분석을 행하였다(Fig. 8). SDS-PAGE분석에 사용되는 시료는 전기영동 전에 2-mercaptoethanol 처리가 되어서므로 시스테인 결합으로 인한 폴리머는 검출되어지지 않기 때문에 TGase에 의해 겔화된 단백질의 전기영동 결과 검출되는 폴리머는 효소에 의한 GL교차결합으로 형성되어진 것이다 (Motoki와 Nio, 1983).

유채단백질의 상당부분은 $1.96 \sim 1.59 \times 10^4$ dalton의 분자량을 가진

저분자 밴드로 구성되고 있고 나머지는 $3.25 \sim 2.48 \times 10^4$ dalton의 분자량을 가진 밴드로 구성되어 있다고 한다(이 등, 1990). 또 Motoki 등(1992)이 미생물 TGase의 분자량은 $3.8 \times 10^4 \sim 4.1 \times 10^4$ dalton이며, 동물유래 TGase의 분자량은 9×10^4 dalton이라고 보고하고 있다.



Fig. 8. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis 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 60min, (C, D) rapeseed protein solution incubated with TGase at 45°C for 30 and 60min, respectively. The pH of reaction mixture was 7.

반응시간에 따라 유채단백질의 분자량의 변화를 살펴보면 효소촉매작용 없는 (B)와 비교해볼 때 반응시간 30분(C), 60분(D) 경과시에는 고

분자 밴드들은 소멸되고 있고 저분자 밴드들은 전체적으로 희미해지고 있다. 대신에 separating gel을 통과하지 못할 정도로 분자량이 큰 고분자 밴드가 separating gel의 맨 윗부분에 생성되고 있어 TGase가 유채단백질을 구성하고 있는 폴리머들의 GL공유교차결합을 촉매하여 유채단백질의 고분자화가 이루어지고 있음을 보여주고 있다. PAGE분석에서 반응시간 30분(C)과 60분(D)간에 뚜렷한 차이를 보이지는 않고 있는데, 이는 전기영동 분석시 사용되어진 유채단백질 겔의 단백질의 농도가 10%로 높아 교차결합 반응 진행이 매우 빨라서 시간에 따른 중합단백질량의 변화가 분명하게 드러나지 않은 것으로 여겨진다. 실제로 Chanyongvorakul 등(1994)도 TGase 촉매 작용에 의한 폴리머 형성의 정도를 자세히 보기 위해 단백질 농도를 0.4%로 저농도로 조절하여 전기영동 실험을 행하였는데 반응시간이 진행됨에 따라 밴드의 변화를 좀더 자세히 관찰할 수 있다고 보고하였다.

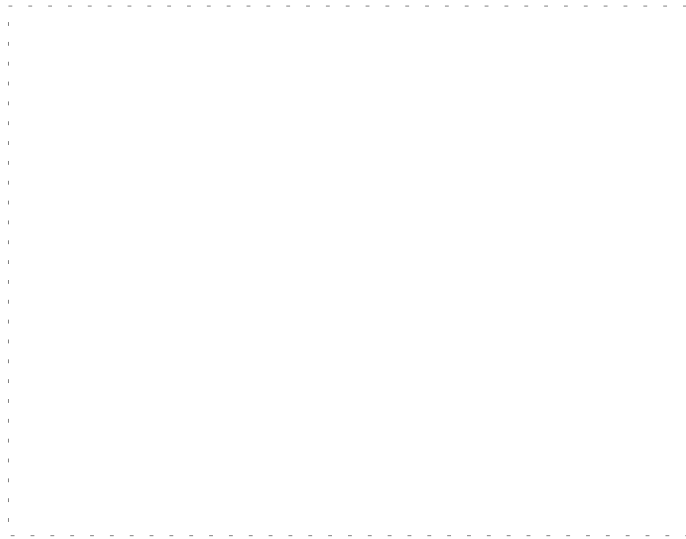
동물유래 TGase에 의하여 단백질내 혹은 단백질 간의 공유교차 결합의 형성으로 고분자 밴드 즉 분자량이 큰 폴리머의 형성은 Kurth 등(1984)이 myosine + soya protein, casein과 gluten 단백질 각각의 분자에서, Ikura 등(1981)이 α -casein, β -casein, 7S, 11S protien, gluten과 필수아미노산(L-methionine, L-lysine)간에, α_{s1} -casein(Huang 등, 1995)에서 고분자 폴리머의 형성을 보고하고 있다. 미생물성 TGase 촉매로 Kato 등(1991)은 ovmucin, ovmucine + 11S globulin에서, Kang 등(1994)은 glycine에서, Dickinson 등(1996)은 β -latoglobulin에서 분자량이 큰 폴리머가 형성되었다고 보고하였다. 그러나 BSA, ovalbumin (Ikura 등, 1984; Han 등, 1990)은 TGase 반응에 의한 폴리머가 형성되지 않았다고 보고하고 있어서 모든 단백질이 TGase에 의하여 고분자 폴리머를 형성하는 것은 아닌 것으로 알려지고 있다.

대부분 카제인과 젤라틴 등의 불규칙한 구조를 많이 함유하고 있는 단백질과 대두단백질이나 소맥단백질과 같은 lysine 잔기와 glutamine 잔기를 많이 함유한 단백질이 TGase의 좋은 기질이 된다(Sakamoto 등, 1994). 그러나 TGase의 기질로서 이용되어지는 단백질 효율은 TGase와 반응하는 glutamine 주위의 아미노산 서열에 의해 결정된다고 알려져 있기 때문에 기질로서 작용하는 능력을 평가하는데 단백질의 구조 또한 중요하다고 보고되고 있다(Kurth 와 Roger, 1984; Kang 등, 1994).

또, TGase의 기질로서 작용하는 단백질을 구성하고 있는 모든 펩타이드들이 TGase 촉매에 의한 폴리머 형성에 관여하는 것은 아니다. 예를 들어 Larré 등(1993)은 pea legumin을 기질로한 TGase 촉매반응 실험에서 α 폴리펩타이드만 폴리머 형성에 관여하고 β 폴리펩타이드는 이 반응에 관여하지 않았으며 반응에 참여하는 α 폴리펩타이드도 종류에 따라 반응에 참여하는 정도가 달라진다고 보고하고 있다. 따라서 펩타이드가 단백질 구조내에 분포하는 위치에 따라서, 또한 펩타이드 중의 glutamine과 lysine 잔기의 함량에 따라서도 반응에 참여하는 정도가 달라진다. 이러한 현상은 유채단백질을 기질로한 TGase 반응실험에서도 일치하였다.

7. 유채단백질 겔의 현미경 구조

겔의 물성과 겔 망상조직간에는 밀접한 관계가 있어 만일 겔이 잘 전개된 3차원적인 망상구조를 가지고 있다면 겔은 좀 더 탄성적이고 단단할 것이고(Kitabake 등, 1989), 겔이 불량하게 전개된 구조를 가지고 있다면 (특히 응집형망상) 겔은 물렁할 것이다. Chanyongvorakul 등(1995)은 열에 의해 형성된 globulin겔과 TGase에 의해 형성된 globulin겔의 레올로지 특징을 비교한 실험에서 TGase 촉매에 의해 형성된 겔과 열에 의한 시스템 결합과 비공유 결합의 생성으로 형성된 겔을 비교해 볼 때 TGase 촉매에 의한 겔은 단백질 폴리머에 단단함과 강도를 부여하는 GL교차결합을 더 함유하여 망상구조의 안정화에 좀더 도움을 주기 때문에 좀 더 탄성이 있는 겔을 형성할 수 있다고 보고하였다. 효소처리하여 반응시킨 수용액과 효소없이 같은 조건에서 반응시킨 시료를 현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 9와 같다. TGase를 첨가하지 않았을 때(A)는 단백질 입자 간에 응집됨없이 입자 각각이 용매에 현탁되어 단백질 입자들이 균일하게 용매에 퍼져있는 것을 관찰할 수 있었으나 TGase가 첨가되면 (A) 단백질 겔을 형성하게 되어 규칙적으로 입자들이 배열된 (A)와는 달리 단백질 입자들의 응집으로 인해 입자들이 고루 퍼져있지 못하고 덩어리들이 뭉쳐 있는 불규칙한 형태를 보여주고 있다. 겔의 미세한 매트릭스 구조는 SEM 사진에 의한다면 더욱 명확히 밝힐 수 있을 것이다 (Kang 등, 1994). 따라서 TGase에 의해 유채단백질은 단백질내의 아미노산 중 glutamine 잔기와 lysine 잔기 간의 가교 결합 형성으로 겔화되어 유채단백질 물성면에서 품질향상 효과를 얻을 수 있을 것이라고 여겨진다.



(A)



(B)

Fig. 9. Microphotography(x 400) of rapeseed protein solutions incubated with transglutaminase at 45°C for (A) 0 min, (B) 180min. 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.

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

유채단백질 겔 형성이 TGase 촉매작용으로 단백질내에 GL교차결합의 형성으로 인한 고분자화에 의한 것임을 확인하기 위하여 반응시간에 따른 GL교차결합의 함량을 분석하였다(Fig. 10).

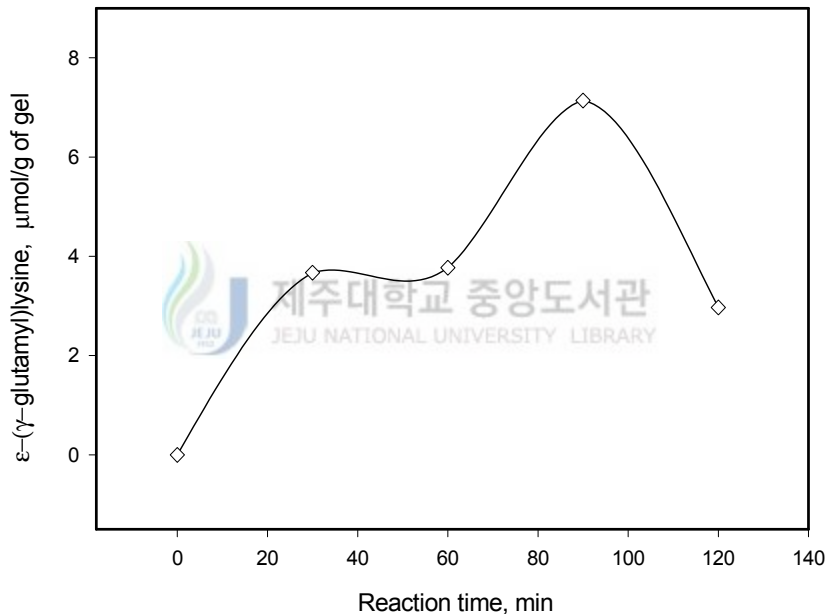


Fig. 10. Relationship between reaction time and amounts of ϵ -(γ -glutamyl)lysine from rapeseed protein incubated with 10% concentration at 45°C. Ratio of enzyme to substrate was 1 : 40(w/w) and the pH of reaction mixture was 7.

HPLC분석은 시료를 단백질 분해효소를 이용하여 단백질의 GL결합을 제외한 펩타이드 결합을 절단한 후 OPA(o-phthaldialdehyde)유도체

화 반응을 한 후 실시되었다. GL 분석시 OPA 유도체에 의한 형광강도는 매우 민감하여 유도체 반응 후의 시간의 경과에 따라 영향을 받으므로 정확한 반응시간과 온도를 유지하여 실시되어야 한다(Sato 등, 1992, Sakamoto 등, 1995b)

HPLC 크로마토그램에서 표준품 GL결합 피크는 14.848분에서, 17.589분에서 유도시약 피크가 검출되고 있었다(Fig. 2). TGase를 첨가하지 않은 반응용액을 분석하였을 때는 GL결합 피크는 검출되지 않았으나 TGase 첨가로 유체단백질 겔이 형성되었을 때는 GL결합 함량이 반응 30분에는 3.67 $\mu\text{mol/g gel}$, 60분에는 3.77 $\mu\text{mol/g gel}$, 90분에는 7.14 $\mu\text{mol/g gel}$, 120분에는 2.97 $\mu\text{mol/g gel}$ 검출되고 있어 TGase 촉매작용으로 유체단백질 내의 lysine 잔기의 ϵ -아미노기와 glutamine 잔기의 γ -carboxamide기 간의 GL교차결합이 형성됨으로서 유체단백질의 겔화가 이루어지고 있음을 확인할 수 있다. Nonaka 등(1989)도 casein을 기질로 한 TGase 반응 실험에서 효소 첨가시에만 GL교차결합이 검출되고 있다고 하였다.

TGase는 단백질내 혹은 단백질 간에 GL교차결합을 형성하므로 많은 식품단백질의 영양적, 텍스츄어 특질을 개선하기 위해 TGase가 사용되어지고 있다. 겔형성과 점탄성에는 정전기적 수소결합, 소수성 상호작용, 시스틴 결합, GL교차결합 등이 영향을 미치는데 특히 이들 결합 중에서 GL교차결합은 공유결합으로 겔형성과 점탄성에 중요한 영향을 미친다(Seguro 등, 1995).

위의 결과에서 단백질-효소 반응시간은 GL결합의 함량과 관계가 있음을 보여주는데 효소를 첨가하지 않았을 때(반응 0시간), 즉 겔을 형성하지 못한 반응용액에는 단백질내에 형성된 GL교차결합은 없었지만 겔이 형성되었을 때는 유체단백질 내에 GL 교차결합이 형성되기 시작하고

반응시간 90분 후에는 GL교차결합의 함량이 7.14 $\mu\text{mol/g gel}$ 까지 증가하고 있어 유체단백질의 겔화는 효소축매에 의해 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다.

Sakamoto 등(1994), Seguro 등(1995)은 기질 단백질에 첨가되는 TGase 농도의 증가에 따라 GL교차결합 함량이 증가한다고 보고하고 있었고, Tsukamasa 등(1993), Kumazawa 등(1993), Lee 등(1997)은 반응시간에 따른 GL교차결합 함량의 증가를 보고하였다. 그러나 본 실험 결과에서는 90분 동안의 반응으로 형성된 겔에서보다 120분 반응 후의 겔의 레오메타에 의한 강도값은 90분에서의 겔강도 값보다 약간 낮을 뿐 거의 차이가 없었으나 GL결합 함량은 오히려 감소되는 경향을 보여 지금까지의 보고와는 다른 결과를 나타내고 있어 120분 반응 후에 형성된 겔의 GL교차결합 수가 감소된 이유에 대한 좀더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되어진다.

변형과의 관계를 살펴보면 반응시간 90분까지는 TGase 축매작용으로 형성된 유체단백질 내의 GL결합량의 증가에도 불구하고 겔의 변형도는 30분과 90분에서 별반 차이를 보이지 않고 있어(Fig. 3) 겔강도와는 달리 교차결합과 비례적인 관계를 보이지 않았으나 앞의 결과들을 종합해 볼 때 GL교차결합의 형성으로 유체단백질의 변형은 어느정도까지는 개선이 된다고 여겨진다. Tsukamasa 등(1993)도 겔의 변형값은 GL함량이 증가에 따라 개선되어지기는 하지만 겔강도와 같이 비례적인 관계로 변화하지는 않는다고 보고하고 있다.

또한 Lee 등(1997)은 교차결합의 함량이 많을 때 겔강도와 항상 평행적인 관계를 나타내지는 않는다고 보고하고 있고, Seguro 등(1995)도 GL교차결합의 함량의 증가되면 켈리강도($\text{g} \times \text{mm}$)도 급속히 증가되나 GL교차결합이 지나치게 형성되었을 때는 오히려 켈리강도는 약해지는 현

상이 발생한다고 보고하고 있다. 이는 앞서도 언급하였듯이 GL교차결합의 지나친 형성이 단백질분자 내부의 규칙적인 망상구조의 형성을 방해하는 요소로서 작용하고 있기 때문으로 생각된다.



IV. 요약

겔형성이 어려운 유채단백질의 겔화를 위하여 산업화된 미생물성 TGase(transglutaminase)의 촉매작용에 의하여 최적 겔화 반응조건을 겔강도(g)와 겔변형(mm)을 조사하여 검토하였다. 또한 형성된 겔의 고분자화를 SDS-PAGE, 현미경 관찰 및 GL(ϵ -(ν -glutamyl)lysine) 교차결합 함량 측정에 의하여 확인하였다.

단백질-TGase 반응에서 효소첨가량은 45°C에서 60분 동안 반응시 효소가 1 : 40([E] : [S])의 비로 첨가되었을 때 겔강도와 변형값이 가장 높았다. 이때 기질단백질 농도가 4~12%로 증가함에 따라 겔강도는 비례적으로 증가함을 보였으나 겔의 변형면을 고려할 때 10% 농도가 유채단백질 겔제조에 적당한 농도로 조사되었다. 최적 활성을 나타내는 반응온도는 45°C로 관찰되었고, 반응시간은 90분이면 적당한 것으로 조사되었다. 겔강도와 변형은 pH는 7에서 다른 pH에서와 비교할 때 현저한 값을 보여 pH 7이 최적조건이라고 밝혀졌다. SDS-PAGE 분석에서 효소반응시 유채단백질의 밴드들이 소멸되거나 희미해지면서 고분자 폴리머들이 형성되고 있음을 보여주었고, 효소를 첨가하지 않은 반응용액과 효소첨가 후의 차이를 현미경으로 관찰한 결과 효소첨가에 의하여 단백질 응집이 관찰되었다. 또한 HPLC 분석시 GL교차결합 함량이 반응시간에 따라 0 μ mol/g gel에서 최고 7.14 μ mol/g gel(반응 90분)까지 검출되고 있어 유채단백질의 겔화가 TGase에 의해 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었으나 그 이후는 GL교차결합의 감소되는 경향을 보였다.

참 고 문 헌

Ando, H., M. Adachi, K. Umeda, A. Matsuura, M. Nonaka, R. Uchio, H. Tanaka and M. Motoki, 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, 53(10), 2613-2617.

Chanyongvorakul, Y., Y. Matsumura, S. Hiroko, M. Motoki, K. Ikura and T. Mori, 1994. Gelation of bean 11S globulin by Ca^{2+} -Independent transglutaminase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58(5), 864-869.

Chanyongvorakul, Y., Y. Matsumura, M. Nonaka, M. Motoki and T. Mori, 1995. Physical properties of soy bean and broad bean 11S globulin gels formed by transglutaminase reaction. *J. Food Sci.*, 60(3), 483-488.

Dickinson, E. and Y. Yamamoto, 1996. Rheology of milk protein gel and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. *J. Agric. Food Chem.*, 44(6), 1371-1377.

Fukuda, A., N. Kanzawa, T. Tamiya, K. Seguro, T. Ohtsuka and T. Tsuchiya, 1998. Transglutaminase activity correlates to the chorion hardening of fish eggs. *J. Agric. Food Chem.*, 46(6), 2151-2152.

Han, X. Q. and S. Damodaran, 1996. Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. *J. Agric. Food Chem.*, 44(5), 1211-1217.

Ikura, K., M. Yoshikawa, R. Sasaki and H. Chiba, 1981. Incorporation of amino acids into food proteins by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* 45(11), 2587-2592.

Ikura, K., M. Goto, M. Yoshikawa, R. Sasaki and H. Chiba, 1984. Use of transglutaminase. Reversible blocking of amino groups in substrate proteins for a high yield of specific products. *Agric. Biol. Chem.*, 48(9), 2347-2354.



Ikura, K., K. Okumura, M. Yoshikawa, R. Sasaki and H. Chiba, 1985. Incorporation of lysyldipeptides into food protein by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, 49(6), 1877-1878.

Kang, I. J., Y. Matsumura, K. Ikura, M. Motoki, H. Sakamoto and T. Mori, 1994. Gelation and gel properties of soybean glycinin in a transglutaminase-catalyzed system. *J. Agric. Food Chem.*, 42(1), 159-165.

강동섭, 이장순, 강영주, 1990. 품종별 유채박 단백질의 추출에 관한 연구. 한국영양식량학회, 19. 315-320.

Kang, Y. J. 1984. Enzymatic modification of soy proteins: Effect of functional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis. *Kor. J. Food Sci. Tech.*, 19(2). 211-217.

Kato, A., T. Wada, K. Kobayashi, K. Seguro and M. Motoki, 1991. Ovomucin-food protein conjugates prepared through the transglutaminase reaction. *Agric. Biol. Chem.*, 55(4), 1027-1031.

Kim, S. H., J. A. Carpenter, T. C. Lanier and L. Wicker, 1993. Polymerization of beef actomyosin induced by transglutaminase. *J. Food Sci.*, 58(3), 473-491.

김충희, 김효선, 정용현, 강영주, 1992. 유채단백질의 단백질효소에 의한 가수분해조건. *한국영양식품학회지*, 25(5), 513-518.

김효선, 강영주, 1995. Neutrase에 의한 glutamine과 aspragine잔기의 탈아미드화. *한국식품과학회지*, 27(5). 794-798.

杵川洋一, 1993. 新しい機能性乳清タソパワ質の開発と利用. *食品と開発* 28(11). 42-45.

Kumazawa, Y., K. Seguro, M. Takamura and M. Motoki, 1993. Formation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine cross-link in cured horse mackerel meat induced by drying. *J. Food Sic.*, 58(5), 1062-1064.

Kumazawa, Y., K. Sano, K. Seguro, H. Yasueda, N. Nio and M. Motoki, 1997. Purification and characterization of transglutaminase from Japanese Oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Agric. Food Chem.*, 45(3), 604-610.

Kuraishi, C., J. Sakamoto, K. Yamazaki, Y. Susa, C. Kuhara and T. Soeda, 1997. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J. Food Sci.*, 62(3), 488-490.

Kurth, L. and P. J. Rogers, 1984. Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soya protein, casein and gluten. *J. Food Sci.*, 49, 573-589.



Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

Larré, C., M. Chiarello, S. Dudek, M. Chenu and J. Gueguen, 1993. Action of transglutaminase on the constitutive polypeptides of pea legumin. *J. Agric. Food Chem.*, 41(11), 1816-1820.

Lee, H. G., T. C. Lanier, D. D. Hamann and J. A. Knopp, 1997. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J. Food Sci.*, 62(1), 20-24.

이장순, 강동섭, 강영주, 1990. 유채박 단백질의 추출 및 정제에 관한 연구. 한국식품과학회지. 22. 780-785.

Matheis, G. and J. R. Whitaker, 1987. A review: Enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *J. Food Biochem.*, 11, 309-327.

Motoki, M. and N. Nio, 1983. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. *J. Food Sci.*, 48, 561-566.

Motoki, M., N. Nio and K. Takinami, 1984. Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, 48(5), 1257-1261.



Motoki, M., K. Seguro, N. Nio and K. Takinami, 1986. Glutamine-specific deamidation of α_{s1} -casein by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, 50(12), 3025-3030.

Motoki, M., N. Nio and K. Takinami, 1987a. Functional properties of heterologous polymer prepared by transglutaminase between milk casein and soybean globulin. *Agri. Biol. Chem.*, 51(1), 237-239.

Motoki, M., H. Aso, K. Seguro and N. Nio, 1987b. Immobilization of enzymes in protein films prepared using transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, 51(4), 997-1002.

Nio, N., M. Motoki and K. Takinami, 1985. Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, 49(8), 2283-2286.

Nio, N., M. Motoki and K. Takinami, 1986a. Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, 50(4), 851-855.

Nio, N., M. Motoki and K. Takinami, 1986b. Gelation of protein emulsion by transglutaminase. *Agri. Biol. Chem.*, 50(6), 1409-1412.

Nonaka, M., H. Sakamoto, S. Toiguchi, H. Kawajiri, T. Soeda and M. Motoki, 1992. Sodium caseinate and skim milk gels formed by incubation with microbial transglutaminase. *J. Food Sci.*, 57(5), 1214-1218.

Nonaka, M., H. Tanaka, A. Okiyama, M. Motoki, H. Ando, K. Umeda and A. Matsuura, 1989. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, 53(10), 2619-2623.

Sakamoto, H., Y. Kumazawa and M. Motoki, 1994. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. *J. Food Sci.*, 59(4), 866-871.

Sakamoto, H., Y. Kumazawa, S. Toiguchi, K. Seguro, T. Soeda and M. Motoki, 1995a. Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture. *J. Food Sci.*, 60(2), 300-304.

Sakamoto, H., Y. Kumazawa, H. Kawajiri and M. Motoki, 1995b. ϵ -(ν -Glutamyl)lysine crosslink distribution in food as determined by improved method. *J. Food Sci.*, 60(2), 416-419.

Sato, K., Y. Tsukamasa, C. Imai, K. Ohtsuki, Y. Shimizu and M. Kawabata, 1992. Improved method for identification and determination of ϵ -(r -glutamyl)lysine cross-link in protein using proteolytic digestion and derivatization with phenyl isothiocyanate followed by High-Performance Liquid Chromatography separation. *J. Agric. Food Chem.*, 40(5), 806-810.

Seguro, K., Y. Kumasawa, T. Ohtsuka, S. Toiguchi and M. Motoki, 1995. Microbial transglutaminase and ϵ -(r -glutamyl)lysine crosslink effects on elastic propertise of kamaboko gels. *J. Food Sci.*, 60(2), 305-311.

Serraino, M. R. and L. U. Thompson, 1984. Removal of phytic acid and protein phytic acid interaction in rapeseed. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 38-40.

添田孝彦, 1993. トランスグルタミナーゼを利用した食品開発. 食品と開発. 28(10), 42-45.

添田孝彦, 1997. トランスグルタミナーゼによるタンパク質素材研究. 食品工業. 40(24), 18-25.

Tanimoto, S. Y. and J. E. Kinsella, 1988. Enzymatic modification of proteins: Effects of transglutaminase cross-linking on some physical properties of β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.*, 36(2), 281-285.

Tsai, G. J., S. M. Lin and S. T. Jiang, 1996. Transglutaminase from *Streptomyces* *ladakanum* and application to minced fish product. *J. Food Sci.*, 61(6), 1234-1238.

Tsukamasa, Y., K. Sato, Y. Shimizu, C. Imai, M. Sugiyama, Y. Minegishi and M. Kawabata, 1993. ϵ -(γ -Glutamyl)lysine crosslink formation in sardine myofibril sol during setting at 25°C. *J. Food Sci.*, 58(4), 785-787.

山崎勝利, 添田孝彦, 1997. トランスグルタミナーゼの新しい利用. 食品と開発. 32(12), 11-13.

Yildirim, M., N. S. Hettiarachchy and U. Kalapathy, 1996. Properties of Biopolymer from cross-linking whey proteins isolate and soybean 11S globulin. *J. Food Sci.*, 61(6), 1129-1131.

Yildirim, M. and N. S. Hettiarachchy, 1997. Biopolymer produced by cross-linking soybean 11S globulin with whey proteins using transglutaminase. *J. Food Sci.*, 62(2), 270-275.



사 사

2년의 결실을 맺으며 아낌없는 사랑으로 부족한 저를 늘 일으켜 세워 배움의 길로 이끌어 주신 강영주 지도교수님께 먼저 깊이 감사 드립니다. 그리고 논문을 세심하게 손질하여 주신 고영환 교수님, 임상빈 교수님께도 감사드리며, 많은 조언과 따뜻한 격려를 주신 송대진 교수님, 김재하 교수님, 김수현 교수님, 하진환 교수님께도 감사드립니다.

연구에 많은 도움을 주신 김효선 선배님과 이창환 선배님을 비롯한 식품공학과 대학원 선·후배님들과 식품가공실험실 여러분께도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 그리고 늘 믿음으로 지켜봐 주신 부모님과 가족들에게 감사하는 마음을 전하며, 항상 곁에서 저의 든든한 버팀목이 되어준 영미와 인영이, 애순언니를 비롯한 사랑하는 나의 친구들에게 고맙다고 전해주고 싶습니다.

