

감마선 조사된 난백 Albumin(Gal d 1)의 알러지성 및 항원성의 변화

이주운 · 육홍선 · 조경환 · 이수영* · 변명우[†]

한국원자력연구소 방사선식품 · 생명공학기술개발팀

*아주대학교 의파대학 소아과교실

The Changes of Allergenic and Antigenic Properties of Egg White Albumin (Gal d 1) by Gamma Irradiation

Ju-Woon Lee, Hong-Sun Yook, Kyoung-Hwan Cho, Soo-Young Lee* and Myung-Woo Byun[†]

Team for Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute,
Daejeon 305-600, Korea

[†]Dept of Pediatrics, School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

Abstract

Gamma irradiation was applied to reduce egg allergy. Ovalbumin (OVA), an egg white protein, was used as model allergen and was gamma-irradiated at 3, 5, or 10 kGy in an aqueous state (2.0 mg/mL). The changes in allergenic and antigenic properties of OVA resulted from gamma irradiation were monitored by ELISA with serum from egg-hypersensitive patients (H-IgE), and mouse monoclonal IgG (M-IgG) or rabbit polyclonal IgG (R-IgG). The binding ability of H-IgE to irradiated OVA was dose-dependently reduced. However, IgGs from animal did better recognize 3 or 5 kGy-irradiated OVA. In the evaluation of immune reactivity using blind test, the reactivity of H-IgE rapidly decreased depending upon the irradiation dose. However, the reactivities of M-IgG and R-IgG was higher at 5 and 3 kGy-irradiated OVA than non-irradiated control. The results provide a new possibility to use irradiation process for reducing the allergenicity of egg white.

Key words: gamma irradiation, egg allergy, ovalbumin, allergenicity, antigenic properties

서 론

계란은 중요한 식량 자원의 하나로 높은 영양가치를 가지고 있으며, 자체로 섭취하거나 가공식품의 원료로 많이 이용되고 있다. 그러나, 계란은 식품알러지를 잘 일으키는 주요 식품(1)에 해당되며, 난백 단백질에 존재하는 albumin(ovalbumin, OVA), ovomucoid 등이 주요 allergen으로 보고되고 있다(2,3). 특히 계란으로 유발되는 알러지는 성인보다는 유아나 소아에게서 빈번히 발생되므로 성장기 어린이의 균형적인 영양공급에 악영향을 끼치며, 원인 식품의 거부로 인한 편식 등을 유발하기도 한다(4,5).

식품으로부터 유발되는 알러지는 IgE를 매개로 하는 전신적인 과민반응을 유도하여 식량자원의 효율적인 이용에 장애가 될 뿐만 아니라 환자에게는 고통과 대상식품의 기피를 야기하여 궁극적으로 바람직하지 않은 결과를 나타낸다. 식품알러지를 억제하기 위한 다양한 방법들이 연구되어 보고되었으나(6-8), 극히 제한적인 부분에 이용될 뿐 그 이용성에 한계가 있다. 계란의 경우 호소처리와 가열처리로 알러지성을 감소시키려는 연구가 일부 진행되기도 하였으나(9), 가공식품의 첨가물의 경우에 약간의 효과를 얻었을 뿐, 전란을

이용하거나 섭취할 경우 이용할 수가 없는 단점이 있다.

식량자원의 효율적인 관리와 내장균 O157:H7과 같은 식중독 원인균을 사멸시킬 목적으로 개발된 방사선 조사기술은 세계적으로 그 이용이 확대되고 있으며, 적절한 흡수선량에서 조사된 식품은 영양학적, 독성학적으로 아무런 문제가 없다고 보고되고 있어(10), 국내에서도 식품의 안전 저장과 국민 보건을 위해 그 이용이 점차 확대될 것으로 기대된다.

한편, 방사선에 의해 식품내 단백질들의 구조가 변화된다는 보고(11-14)가 발표된 이래로 방사선 조사기술이 식품알러지를 억제하거나 제거할 수 있는 가능성에 대한 연구가 보고되고 있다(15-18). 본 연구에서는 방사선 조사기술을 이용하여 계란의 알러지성 감소를 위한 기초연구로서, 난백 단백질 중 주요 allergen인 OVA(Gal d 1, 43 KD)에 대하여 감마선 조사에 의해 야기되는 알러지성 및 항원성의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

환자혈청 및 동물항체의 준비

분석에 사용한 환자혈청은 계란 알러지 병력이 있고 OVA

[†]Corresponding author E-mail: mwbyun@nanum.kaeri.re.kr
Phone 82-42-868-8065, Fax 82-42-868-8043

에 대한 prick skin test에 양성인 20명의 환자에게 삶은 난백을 급여하여 과민반응을 유도한 후, 즉시 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 -80°C 에 보관하며 실험에 사용하였다. 또한 비교구는 계란 알러지가 없는 5명으로부터 혈액을 채취하여 그 혈청을 사용하였다.

OVA에 대한 단클론 항체(monoclonal anti-chicken egg albumin IgG, Clone OVA-14, M-IgG)는 Sigma사에서부터 구입하였다. OVA에 대한 다클론항체(P-IgG)는 Lee 등(11)의 방법을 사용하여 토끼에 면역원으로 OVA를 감작시켜 생산하였다.

시료의 준비 및 감마선 조사

감마선 조사에 의한 OVA의 항원성 변화를 측정하기 위해 Sigma사(Sigma Chemical Co. Ltd., St Louis, MO, USA)로부터 순도 98%의 분리, 정제된 OVA를 구입하여 사용하였다. OVA를 2 mg/mL의 농도로 0.01 M phosphate buffer (0.15 M NaCl, pH 7.4, PBS)를 사용하여 준비한 후 감마선을 조사하였다. 계란에 대한 직접적인 감마선 조사의 효과를 측정하기 위해 시판제란을 구입하여 감마선을 조사하였다.

감마선 조사는 Co-60을 선원으로 하여 시간당 10 kGy의 선량율로 시료가 1, 3, 5, 7, 10 kGy의 흡수선량을 받도록 감마선을 조사하였으며, 흡수선량의 확인은 Fricke dosimetry (ceric/cerous dosimeter)(19)를 사용하였고, 흡수선량의 오차는 ± 0.1 kGy였다. 이때 조사실의 온도는 10°C 였다. 조사 후 OVA 용액을 4°C 보관하면서 실험에 사용하였다.

감마선 조사된 OVA에 대한 항체반응성 평가

Human IgE(H-IgE), M-IgG와 R-IgG에 대한 감마선 조사된 OVA와의 반응을 조사하기 위해 competitive indirect enzyme linked immunosorbent assay (Ci-ELISA)법을 사용하였다(11). OVA에 대한 Ci-ELISA의 시험과정은 다음과 같다. Polystyrene flat-bottom microtiter plates(Maxisorp, Nunc, Kamstrup, Denmark)에 OVA를 basic coating buffer (0.1 M sodium carbonate, pH 9.6)를 사용하여 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석한 후 100 μL 를 첨가하여 4°C 에서 하룻밤 동안 well에 고정시켰고, 1%의 gelatine 용액 130 μL 를 첨가하여 blocking하였고, 일정하게 희석한 감마선 조사된 OVA 용액과 표준 OVA용액과 25%로 희석한 환자 혈청을 각각의 well에 50 μL 첨가하고 반응시켰다. Mouse anti-human IgE에 horseradish peroxidase(HRP)(Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, AL, USA)를 공액결합한 2차 항체를 PBS 완충액을 사용하여 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하여 well에 100 μL 를 첨가하여 반응시킨 후, 0.04% o-phenylenediamine (OPD, Sigma Chemical Co.) 기질용액을 사용하여 발색을 유도하고, 세척없이 그 well에 2.0 M H_2SO_4 용액으로 반응을 종결시킨 후 492 nm로 고정된 ELISA Reader(CERES UV-900C, BIO-TEK instruments Inc., MI, USA)에서 흡광도를 측정하여 microplate well에 고정된 OVA와 항체의 반응을

구하였다. 각 단계별 반응 후 well을 0.05%(v/v) Tween 20을 함유한 PBS 완충액으로 3회 세척하였고, coating을 제외한 모든 반응은 37°C 에서 120분간 반응시켰다.

M-IgG와 R-IgG의 Ci-ELISA는 1차 항체의 희석비를 M-IgG는 0.01%로 R-IgG는 0.05%로 각각 PBS완충액으로 희석하여 사용하였고, 2차 항체를 M-IgG의 경우 Rabbit anti-M IgG HRP(Dako A/S., Glostrup, Denmark), R-IgG의 경우 Goat anti-R-IgG HRP(Sigma Chemical Co.)를 사용하였고, 나머지 부분은 H-IgE와 같은 방법으로 실험하였다.

Blind test를 통한 면역반응성의 변화 측정

실험자가 농도를 알 수 없도록 조제한 선량별 OVA 용액에 대한 각 항체의 면역반응성을 측정하였다. 비조사 OVA로 얻은 표준곡선을 이용하여 시료용액내 존재하는 OVA의 농도를 측정하여 비조사구를 1로 하였을 때 얻어진 값을 구하여 감마선 조사된 OVA와 각 항체 반응성을 비교하였다.

결과 평가 및 통계처리

각 항체에 대해 동일한 실험을 5회 반복 실시하였으며, 시료에 대해 3회 반복 실시하여 얻어진 결과들을 SAS[®] software (20)에서 프로그램된 general linear procedures, least square 평균값을 Duncan의 multiple range test법을 사용하여 평가하였다.

결과 및 고찰

감마선 조사된 OVA에 대한 환자 IgE의 반응성

환자의 혈청을 이용한 Ci-ELISA에서 감마선 조사선량이 증가할수록 H-IgE의 감마선 조사된 OVA에 대한 반응성이 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 1). 비조사 OVA에 대해 H-IgE는 0.31~5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 검출 범위를 나타내며, 알러젠의 농도에 따라 전형적인 표준곡선을 나타냈고, 이때 곡선의 기울기는 -15.17을 나타냈다. 3 kGy의 감마선 조사로 곡선의 기울기는 감소하여 -9.63을 나타냈고, 5와 10 kGy의 선량에서도 비슷한 결과를 나타냈다. 표준곡선에서 기울기의 변화는 항체의 반응성을 나타내는 것으로서, 기울기의 절대값이 감소할수록 표면항원결정기, 즉 epitope의 파괴로 인한 반응성의 감소를 나타낸다(14,21). 이 결과는 OVA의 epitope이 감마선 조사에 의해 항원결정성을 상실하여 H-IgE가 반응할 수 있는 기회가 적어진 것을 나타내며, 3 kGy 이상의 선량에서는 epitope의 부분적 파괴와 함께 3차 구조의 변화로 인한 항원결정기의 전체적인 감소가 나타난 것을 알 수 있었다. 이와 유사한 결과는 Byun 등(17)과 Lee 등(18)의 갈색 새우의 주요 알러젠인 tropomyosin과 우유의 β -lactoglobulin에 대한 감마선 감수성 시험에 대한 보고에서도 관찰되었는데, 감마선 조사된 알러젠의 알러지성은 감마선 조사선량이 증가할수록 감소되는 것으로 나타났다. 현재까지 감마선 조사된 OVA에 대한 환자 혈청을 이용한 알러지성의 변화에 관한

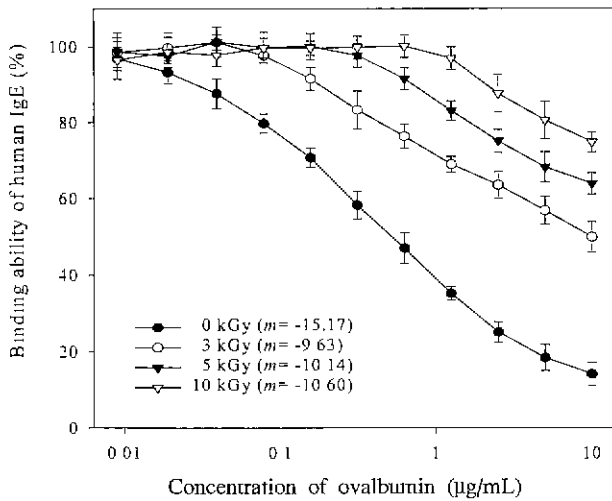


Fig. 1. Binding ability (allergenicity) of egg-allergic patients IgE to irradiated ovalbumin by Ci-ELISA.

The protein solutions (2.0 mg/mL) were irradiated, serially diluted, and then tested. *m* is the slope of the curve obtained from binding rate of IgE to coated standard protein. Statistical differences among samples to irradiation on the same concentration were determined by Duncan's multiple range test and recognized in the $p < 0.05$

연구 결과는 보고되어 있지 않아 주요 epitope들에 대한 감마선 조사에 의한 파괴 및 변화 등 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

감마선 조사된 OVA에 대한 단클론 항체의 반응성

M-IgG를 이용한 OVA의 항원성의 변화는 H-IgE의 경우와 다른 결과를 나타냈다. 일반적으로 단클론 항체는 매우 높은 항원특이성을 가지기 때문에 정확하게 항원을 인식할 수 있다. 감마선 조사된 OVA에 대한 M-IgG의 반응성은 5 kGy까지 급격히 증가하다 감소되는 경향을 나타냈다(Fig. 2). M-IgG의 표준곡선의 기울기의 절댓값이 5 kGy까지 2배 이상(19.62에서 42.27) 증가하여 감마선 조사된 항원에 대한 매우 높은 친화성을 나타냈다. 10 kGy에서 기울기의 감소는 노출된 epitope이 분자간 응집에 의해 가려짐에 따라 감소되는 것으로 판단된다(21). 이 결과는 5 kGy까지의 감마선 조사는 OVA의 B 세포 epitope을 표면으로 더 잘 노출시켰으며, M-IgG가 훨씬 쉽게 반응할 수 있게 구조가 변화한 것을 나타낸다. 또한, 이 결과는 β -lactoglobulin의 열변성 시험에서 가열 온도가 상승할수록 일정 온도까지 항원에 대한 단클론항체의 인식정도가 증가하였다는 Kaminogawa 등(22)의 보고와 유사한 경향을 나타내고 있는데, 이는 외부 에너지(본 연구에서는 감마선 조사)에 의한 단백질 내부의 S-S 결합의 부분적 파괴와 3차 구조를 이루는 수소결합의 붕괴가 진행되어 conformational epitopes의 노출로 단클론 항체가 결합할 수 있는 기회를 더 제공하기 때문이다(12).

감마선 조사된 OVA에 대한 다클론 항체의 반응성

감마선 조사된 OVA에 대한 R-IgG의 반응성은 M-IgG와 비슷한 경향을 나타냈으나, R-IgG에서는 3 kGy를 정점으로

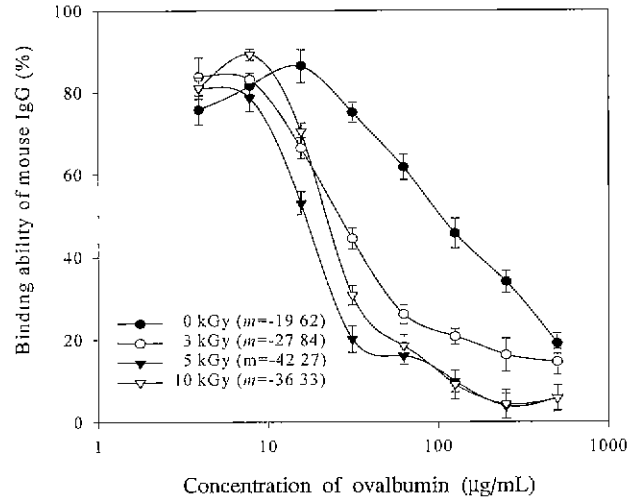


Fig. 2. Binding ability (antigenicity) of mouse anti-ovalbumin IgG to irradiated ovalbumin by Ci-ELISA.

The protein solutions (2.0 mg/mL) were irradiated, serially diluted, and then tested. *m* is the slope of the curve obtained from binding rate of mouse IgG to coated standard protein. Statistical differences among samples to irradiation on the same concentration were determined by Duncan's multiple range test and recognized in the $p < 0.05$

증가 후 감소되는 경향을 나타냈다(Fig. 3). 표준곡선의 변화도 M-IgG와 비슷한 경향을 나타내어 OVA가 감마선 조사에 의해 3과 5 kGy 정도에서 분자구조적 해리가 가장 많이 진행되고(23). 그 이후의 선량에서는 epitope의 파괴와 함께 급격한 분자간, 분자내 응집으로 인해 epitopes이 분자 내부로 감추어 R-IgG가 반응할 수 있는 기회를 막는 것으로 사료된다(18)

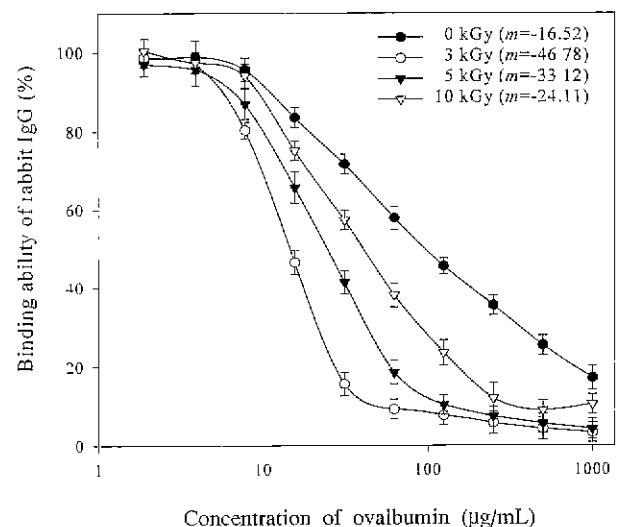


Fig. 3. Binding ability (antigenicity) of rabbit anti-ovalbumin IgG to irradiated ovalbumin by Ci-ELISA.

The protein solutions (2.0 mg/mL) were irradiated, serially diluted, and then tested. *m* is the slope of the curve obtained from binding rate of rabbit IgG to coated standard protein. Statistical differences among samples to irradiation on the same concentration were determined by Duncan's multiple range test and recognized in the $p < 0.05$

맹검법을 이용한 항체 반응성의 비교

비조사 OVA으로 얻어진 각 항체의 표준곡선을 이용한 감마선 조사된 OVA의 면역반응성 시험에서 각 항체의 면역반응성은 표준곡선의 기울기의 변화와 같은 경향을 나타냈고, 이때 얻어진 결과의 신뢰도는 95.78%이었다. 감마선 조사에 의해 H-IgG의 면역반응성은 감소하여 5 kGy에서 0.02, 10 kGy에서는 0.001을 나타내어 급격한 반응성의 감소를 보였다. 그러나, M-IgG와 R-IgG의 면역반응성은 선량의 변화에 따라 증가와 감소를 나타내었고, M-IgG의 경우 5 kGy에서 14.2배의 면역반응성을 나타냈고, R-IgG의 경우 3 kGy에서 16.2배의 반응성을 나타내 매우 높은 항체 친화성이 있는 것으로 나타났다.

일반적으로 식품분석분야에서 사용되는 항체는 다클론 항체가 많이 이용되고 있으나, 항체가 항원에 존재하는 다수의 epitope을 인식하기 때문에 정량적인 시험에서는 신뢰도가 높지 않다. 반면, 식품의 가공 중 단백질의 변성을 측정하기 위한 방법으로 이용가능성이 점차 높게 인식되고 있다(24). 단클론 항체는 항원의 한 부분, 즉 하나의 epitope을 인식하기 때문에 매우 높은 친화성과 우수성을 가지고 있으나, 제조가 까다롭고, 많은 시간과 경비를 요구하기 때문에 그 사용이 제한되어 있지만, 정확한 정량분석을 위해서는 단클론 항체의 이용이 요구된다(25).

본 연구에 사용된 항체의 반응성이 각각 다르게 나타난 것은 매우 흥미있는 결과로서 식품알러지 연구에서 사용하는 주요 분석법인 면역분석법의 이용시 항체의 선별이 매우 중요함을 시사하고 있다(17). 알러젠에 대한 특이 IgE는 일반적으로 다클론 항체로서 인식되지만, 그 특이성에 있어서는 단

클론 항체와 유사한 경향을 갖고 있기 때문에 동물의 항체를 이용한 식품알러지 연구에서는 반드시 알러지성을 유발하는 epitope들을 인식할 수 있는 항체를 생산하는 것이 무엇보다 중요하다. 국내에서는 아직까지 식품알러지에 대한 인식 부족으로 인해 임상의학 분야를 제외하고는 혈청내 IgE의 중요성이 인식되고 있지 않아 연구에 많은 어려움이 있다(18). 본 연구결과에서도 알 수 있듯이 같은 알러젠에 대한 각기 다른 항체의 면역 반응성이 다른 것은 항체가 인식하는 항원 표면 epitope이 서로 다르기 때문이며(Fig 4), 만약 알러지 저감화 식품 개발에서 동물의 항체를 이용할 경우, 임상에서는 매우 다른 결과를 초래할 수 있다는 것을 나타내고 있다. 따라서 이 부분에 대한 연구는 알러젠의 구조 변화, epitope의 파괴 등과 같은 기법을 사용할 시 충분한 자료 조사와 가능하다면 환자의 혈청을 직접 이용하는 것이 바람직하다고 본다(17)

요 약

계란알러지를 감소시키기 위한 방법으로써 감마선 조사기술의 이용 가능성을 평가하였다. 난백단백질인 OVA를 모델 알러젠으로 사용하여 3, 5, 10 kGy의 선량으로 감마선을 조사하고 OVA의 알러지성과 항원성의 변화를 환자의 IgE와 동물 항체를 ELISA로 측정하였다. 환자의 IgE는 감마선 조사된 OVA에서 감마선 조사선량이 증가함에 따라 감소하였다. 그러나 동물 항체는 3과 5 kGy에서 조사된 OVA를 훨씬 잘 인식하는 것으로 나타났다. 맹검법을 사용한 면역반응성 시험에서, H-IgE의 반응성은 조사선량이 증가할수록 급격하게 감소하였다. 그러나, M-IgG와 R-IgG는 비조사구에 비해 5와 3 kGy 조사구에서 더 높게 OVA를 인식하였다. 이 결과는 계란 알러지를 감소시키기 위해 감마선 조사기술의 이용 가능성을 나타내고 있다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 원자력 중장기 연구개발과제의 지원으로 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Breneman, J.C. : *Basis of Food Allergy*, C. C. Thomas, Springfield, p 18-36 (1978)
2. Hoffman, D.R. : Immunochemical identification of allergens in egg white. *J. Allergy Clin Immunol.*, 71, 481-490 (1983)
3. Yunginger, J.W. Food antigens. In *Food allergy adverse reactions to food and food additives*, Blackwell Scientific Publications, Boston, p.50-53 (1997)
4. Hefle, S.L. : The chemistry and biology of food allergens. *Food Technol.*, 50, 86-92 (1996)
5. David, T.J. : *Food and food additive intolerance in childhood* Blackwell Scientific Publications Oxford, p.157-159 (1993)

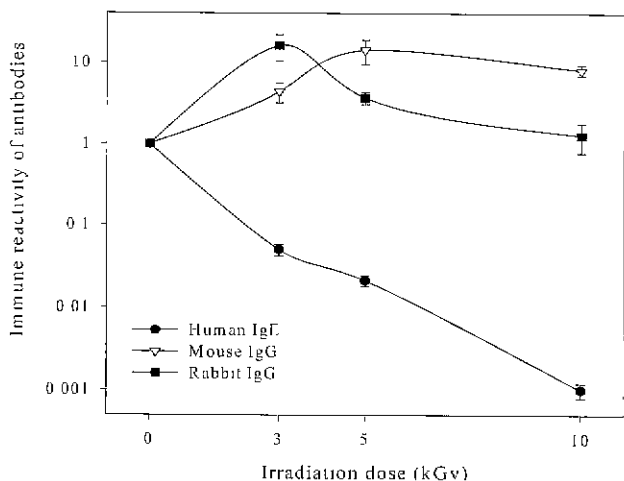


Fig. 4. Immune reactivity of egg-allergic patients IgE, mouse anti-ovalbumin IgG and rabbit anti-ovalbumin IgG to irradiated ovalbumin.

Immune reactivity of each antibody was determined by Ci-ELISA with the protein solution prepared for blind test. The results indicate the rate of detected ovalbumin concentration in irradiated sample to that in non-irradiated sample. Statistical differences of immune reactivity of each antibody by irradiation were determined by Duncan's multiple range test and recognized in the $p < 0.05$

6. Maruyama, N., Sugiura, F., Kishimoto, T., Ichuse, K., Takeuchi, Y., Sawada, T., Tsuda, A. and Utsumi, S. : Decrease IgE-binding with wheat gluten by deamination. *Biosci. Biotech Biochem.* **63**, 567-569 (1999)
7. Asselin, A., Hebert, J. and Amiot, J. : Effects of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J. Food Sci.* **55**, 1037-1039 (1989)
8. Astwood, J.D., Fuchs, R.L. and Lavrik, P.B. : Food biotechnology and genetic engineering In *Food allergy: adverse reactions to food and food additives*, Blackwell Scientific Publications, Boston, p.65-92 (1997)
9. Matsuda, T., Tsuruta, K., Nakabe, Y. and Nakamura, R. : Reduction of ovomucoid immunogenic activity on peptic fragmentation and heat denaturation. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2237-2241 (1985)
10. WHO/HPP/FOS : Review of the safety and nutritional adequacy of irradiated food World Health Organization. *Organisation Mondiale De La Sante*. Provisional Edition. p.24-25 (1992)
11. Lee, J.W., Yook, H.S., Lee, K.H., Kim, J.H., Kim, W.J. and Byun, M.W. : Conformational changes of myosin by gamma irradiation *Radiat. Phys Chem.*, **58**, 271-277 (2000)
12. Al-kahtani, H.A., Abu-tarbouch, H.M., Atia, M., Bajaber, A.S., Ahmed, M.A. and El-mojaddidi, M.A. : Amino acid and protein changes in tilapia and spanish mackerel after irradiation and storage. *Radiat. Phys. Chem.*, **51**, 107-114 (1998)
13. Filali-mouhim, A., Audette, M., St-louis, M., Thauvette, L., Denoroy, L., Penin, F., Chen, X., Rouleau, N., Le Caer, J.P., Rossier, J., Potier, M. and Le Maire, M. : Lysozyme fragmentation induced by γ -radiolysis *Int. J. Radiat. Biol.*, **72**, 63-70 (1997)
14. Horowitz, R., Kempner, E.S., Bisher, M.E. and Podolsky, R.J. : A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*, **323**, 160-164 (1986)
15. Kume, T., Ishii, T. and Matsuda, T. : Immunochemical identification of irradiated chicken eggs. *J. Sci. Food Agric.*, **65**, 1-4 (1994)
16. Kume, T. and Matsuda, T. : Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat. Phys Chem.*, **46**, 225-231 (1995)
17. Byun, M.W., Kim, J.H., Lee, J.W., Park, J.W., Hong, C.S. and Kang, I.J. : Effects of gamma radiation on the conformational antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *J. Food Prot.* **63**, 940-944 (2000)
18. Lee, J.W., Kim, J.H., Yook, H.S., Kang, K.O., Lee, S.Y., Hwang, H.J. and Byun, M.W. : Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. *J. Food Prot.* **64**, 272-276 (2001)
19. Holm, N.W. and Berry, R.J. *Manual on Radiation Dosimetry*. Marcel Dekker Inc., New York (1970)
20. SAS : *SAS/STAT: User's Guide*. 6th edition, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (1988)
21. Herian, A.M., Taylor, S.T. and Bush, R.K. : Allergenic reactivity of various soybean products as determined by RAST inhibition. *J. Food Sci.* **58**, 385-388 (1992)
22. Kamnagawa, S., Shimizu, M., Ametani, A., Hattori, M., Ando, O., Hachimura, S., Nakamura, Y., Totsuka, M. and Yamauchi, K. : Monoclonal antibodies as probes for monitoring the denaturation process of bovine β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta.* **998**, 50-56 (1989)
23. Tzaphlidou, M., Kounadi, E., Leontiou, I., Matthopoulos, P. and Glaros, D. : Influence of low doses of γ -irradiation on mouse skin collagen fibrils. *Int. J. Radiat. Biol.* **71**, 109-115 (1997)
24. Lee, J.W., Park, J.H., Kim, C.J. and Shin, H.K. : Monitoring thermally induced conformational changes in bovine muscle myosin solutions by competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (CI-ELISA). *Inter. J. Food Sci. Technol.*, **33**, 411-418 (1998)
25. Kim, J.B. : Development of chemiluminescence immunoassay for the measurement of plasma steroid and urinary steroid and urinary steroid glucuronides. *Ph.D. Dissertation*, University of London, UK (1983)

(2001년 1월 18일 접수)