

물리적 처리에 따른 우육추출물중의 BSA와 BGG단백질의 SDS-PAGE 패턴 및 항원성의 변화

한기동^{1*} · Fan Jiang Ping¹ · Suzuki Atsushi²

¹영남대학교 식품외식학부 식품가공학전공

²니이가타대학교 농학부 응용생물화학과

Changes of SDS-PAGE Pattern and Allergenicity of BSA and BGG in Beef Extract Treated with Heat and High Pressure

Gi Dong Han^{1*}, Jiang Ping Fan¹ and Atsushi Suzuki²

¹Dept. of Food Technology and Food Service Industry, Yeungnam University,
Gyeongsan 712-749, Korea

²Dept. of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture,
University of Niigata, Niigata 950-2181, Japan

Abstract

In our previous report, we indicated that not only BSA but also BGG played an important role in the allergenicity of beef. In this study, the effect of heat or high-pressure treatments to beef extract on the SDS-PAGE patterns was examined. The antigenicity of each treated samples was also investigated by Western blots assay with the sera of BGG-positive beef allergic patients. The BGG band and its antigenicity slightly disappeared but not generally in 100°C group, indicating 100°C treatment is not sufficient to totally eliminate the antigenicity of beef allergens. Compared with BGG band, BSA band significantly disappeared in SDS-PAGE with 100°C treatment, indicating BSA is more heat-sensitive than BGG. When the beef extract was heated at 120°C, not only BSA but also BGG bands was largely disappeared in both SDS-PAGE and Western blots. High pressure (HP) treatment even at 600 MPa did not affect SDS-PAGE and Western blots pattern of BSA. On the contrary, BGG treated with HP showed visible changes in SDS-PAGE. 600 MPa treatment significantly reduced the antigenicity. Interestingly, these behaviors of BGG were not found in the same experiments with pure BGG treated with HP. From these results, it was speculated that some kinds of proteolytic enzymes in beef extracts were involved in the BGG molecular degradation by HP treatment. The aging experiments of beef extracts treated with HP supported this hypothesis. Further studies are needed to clarify the function and working mechanism of enzymes associated with BGG degradation in beef extracts by HP treatment.

Key words: food allergy, BGG, allergenicity, heat, high pressure

서 론

다양한 식품제조기술이 식품중의 알레르겐 단백질을 제거 또는 감소시키기 위해 이용되어왔다. 알레르겐 단백질의 열처리에 의한 영향은 많은 연구그룹에 의해 폭넓게 이루어져왔다. 그러나 여러 가지 식품유래 알레르겐의 열처리 효과에 대하여 상반된 연구결과가 보고되었다. 우유와 우육에 대하여 알레르기를 가진 환자에게 열처리된 우육은 알레르기 반응성을 낮추었다는 보고(1,2)가 있는 반면, 열처리가 알레르겐성 제거에 효과가 없고, 몇몇 식품에 대해서는 새로운 알레르겐의 생성에 기여한다고 보고하고 있다. 예를 들어, 우유(3)와 새우(4)의 알레르겐성은 열처리에 의하여 증

가하고(5), 락토오스가 함유된 우유의 열처리는 브라운반응을 일으켜 결과적으로 beta-lactoglobulin의 알레르겐성을 증가시킬 수 있다고 지적하고 있다(3). Restani 등(6)은 100°C 열처리는 순수 BSA의 IgE에 대한 결합능력을 줄이지 못했다고 보고하였다. 한편, Urisu 등(7)은 열처리와 다른 공정의 병행은 계란알레르겐 단백질의 감소화에 효과가 있다고 제안했다. 그들은 계란환자에 포함된 알레르겐 단백질인 ovomucoid는 열처리 후 식염수와 증류수로 씻어 줌으로써 대부분의 알레르겐 단백질을 제거할 수 있었다고 한다. 초고압처리는 최근에 소개된 새로운 가공기술로, Suzuki 등(8)의 연구그룹이 식육의 연화와 식육 내 효소의 활성화에 있어 초고압처리의 영향에 관하여 많은 보고를 해왔다. 이전의

*Corresponding author. E-mail: gdhan1@ynu.ac.kr
Phone: 82-53-810-2957. Fax: 82-53-810-4662

보고(9)에서 저자는 우유 추출물중 BSA뿐만 아니라 bovine gamma globulin(BGG) 또한 중요한 알레르겐이라고 보고하였고, 우유추출물의 알레르겐성에 대한 초고압처리와 열처리의 영향에 관한 연구결과도 보고하였다(10). 이번 연구에서 열처리와 초고압처리에 의한 우유중 BSA와 BGG의 SDS-PAGE상의 변화와 알레르겐성의 변화를 BGG 특이적 우유알레르기 환자의 혈청을 이용하여 관찰하였다.

재료 및 방법

우유알레르기 환자의 혈청

이전의 연구(9)에서 연구자는 두 종류의 우유알레르기 환자, 즉 BSA와 BGG 모두에 반응성을 보이는 type 1과 BGG에만 반응성을 보이는 type 2가 있음을 보고하였다. 이번 연구에서는 주로 BGG에 반응성을 보이는 type 2 환자의 혈청이 주로 이용되었고, 이 혈청은 일본 니이타현립 요시다 병원의 Masatomo Matsuno 박사로부터 이번 연구를 위해 제공되었다.

우유추출물의 준비

지방과 결합조직이 제거된 10 g의 우유는 가위로 잘게 절단된 후 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)가 100 mL 첨가된 균질기에서 5초간 균질화되었다. 균질화된 용액은 20,000×g에서 15분간 원심분리된 후 상층액은 다시 Whatman No. 2의 거름종이에 의해 걸러졌다. 모든 조작은 4°C의 저온에서 이루어졌으며, 추출물의 단백질 농도는 biuret 방법(11)으로 측정되어 최종농도가 5 mg/mL되도록 조절되었다.

우유추출물에 대한 열 및 초고압처리

우유추출물은 cab-tube에 넣어진 후 일반 water bath에서 60°C와 100°C에서 10분간 가열되었고, Autoclave(Vision, Seoul Korea)를 이용하여 1.3 atm, 120°C에서 10분간 가열되었다. 이렇게 처리된 sample은 원심분리기(Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 15,000 rpm 저온에서 원심분리된 후 상층액과 침전층을 분리하여 실험에 사용하였다. 초고압처리는 Homma 등(12)의 방법에 따라 이루어졌다. 우유추출물은 polyethylene bag에 넣어져 sealing된 후 100에서 600 MPa로 5분간 가압 처리되었다. 여기에 이용된 초고압 처리기계는 NBIP(Nikkiso Isostatic Processor, Japan)이다. 이렇게 가압 처리된 sample은 바로 또는 37°C에 3시간 또는 48시간 처리된 후 실험에 이용되었다.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Laemmli(13)의 방법에 준하여 실시하였다. 겔은 4%의 농축 겔과 11%의 분리 겔로 구성되었다. 정해진 가열 또는 가압 처리가 된 우유추출물은 동량의 2×SDS-sample buffer(0.25 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing

10% SDS, 4% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.05% bromo-phenol blue, and 10 mM EDTA)가 첨가된 후, 100°C에서 2분간 가열되었다. 전기영동장치(ATTO, Japan)를 이용하여 전기영동 후 겔은 염색액(0.025% Coomassie brilliant blue R-250, 50% methanol and 5% acetic acid)을 이용하여 4시간이상 염색된 후, 탈색액(7.5% acetic acid and 5% methanol)으로 탈색되었다.

Western blots

Western blots은 Towbin 등(14)의 방법에 준하여 실시하였다. SDS-PAGE 후 단백질은 PVDF membrane(Bio-Rad, USA)에 전사 buffer(25 mM Tris, 192 mM glycine and 5% methanol)와 전사장치(ATTO, Japan)를 이용하여 전사되었다. 이후 PVDF membrane은 2% gelatin-PBST(PBS, 20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4, 여기에 0.5% Tween 20 포함)를 이용하여 25°C에서 2시간 blocking되었다. 이후 blocking 처리된 막은 PBS를 이용하여 세척한 후 환자의 혈청을 포함한(희석비율 1:5 vol/vol) PBST로 25°C에서 하룻밤 방치되었다. 이후 2차항체로써 희석률 1:500의 alkaline phosphatase(AP) Conjugated Goat Anti-Human IgE(Tagoimmunologicals, USA)로 25°C에서 90분간 처리되었다. PBST로 3차례 세척과 PBS로 1차례 세척 후, AP conjugate substrate kit(Bio-Rad, USA)를 이용하여 발색시켰다.

결과 및 고찰

열처리에 의한 우유추출물의 SDS-PAGE상 및 Western blots상의 변화

60°C 열처리군의 SDS-PAGE상 및 Western blots상은 대조군과 비교해 두 알레르겐단백질(BSA와 BGG) band에 거의 변화를 보이지 않았다(Fig. 1). BSA와 BGG band는 100°C 가열처리군부터 변화를 보였다. BSA band는 100°C 열처리군에서 거의 소실되었고 BGG band는 그보다 높은 온도인 120°C에서 대부분 소실되었다. 즉, 우유추출물중의 BSA는 BGG보다 열처리에 많은 영향을 받는 것으로 생각된다. 그러나 열처리에 의한 새로운 band의 생성은 관찰되지 않았다(Fig. 1-A). BGG에 대한 알레르겐성의 검토에서 100°C 열처리군에서 항원성의 감소가 BGG band 상에서 다소 관찰되지만 농축겔 부분의 tailing현상으로 그 항원성이 남아있는 것으로 보여 그 효과가 크다고 할 수 없을 것 같다. 120°C 열처리군에서는 전기영동상의 band의 소실과 더불어 그 항원성도 대부분 소실되었다(Fig. 1-B). 이러한 결과로부터 우유추출물중의 알레르겐단백질의 제거를 위해서는 가압가열에서 얻을 수 있는 120°C이상의 열처리가 필요할 것으로 보인다. 대부분의 단백질은 열처리에 의하여 열응고를 일으킨다. 우유추출물도 열처리에 의한 열응고가 관찰되었다. Fig. 1에 나타난 SDS-PAGE는 열응고가 있는 용액 전체에 대하여

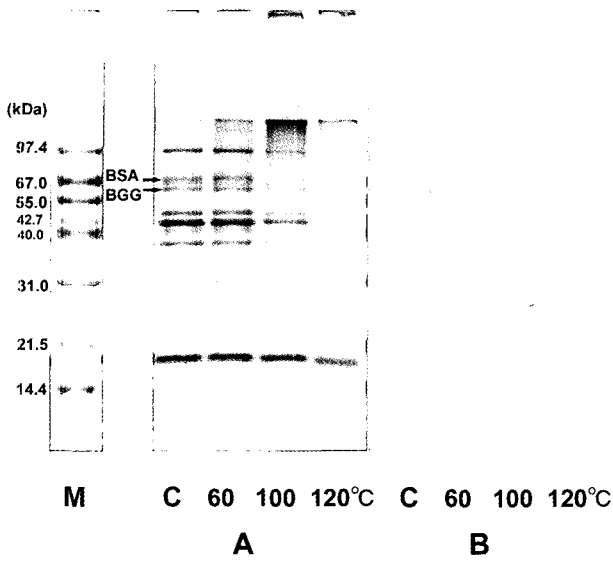


Fig. 1. Effects of a heat treatment to beef extracts on the SDS-PAGE and Western blots patterns. (A) SDS-PAGE, (B) Western blots to (A) with serum of BGG-positive beef allergic patient. Lane M shows middle range molecular marker, Lane C shows the control sample. Equal volumes (25 mg) were loaded in each lane.

동량의 2×SDS sample buffer로 처리한 후 전기영동한 결과이다. 연구자는 열응고단백질과 비응고단백질의 비교를 위해 열처리 후 원심분리를 통하여 열응고부분과 비응고부분을 각각 따로 나누어 전기영동과 Western blots 비교실험을 행하였다.

우육추출물의 열처리 후 원심분리에 의한 열응고부분과 비응고부분의 분리에 따른 항원성의 변화

Fig. 2-B에 나타난 것과 같이 60°C 열처리군부터 항원성

이 상층액에서 침전층으로의 이동이 관찰되었고, 100°C 열처리군의 경우 대부분의 항원성이 침전층으로 이동되었다. 120°C 열처리군의 경우도 비원심분리군에서 나타나지 않은 항원성이 관찰되었다. 이것은 원심분리에 의한 상층액과 침전층의 분리에 따른 상대적 농도의 상승에 따른 환자 항체의 반응성의 증가로 생각되어진다. 이러한 결과로부터 100°C 열처리군의 경우, 모든 알레르겐성이 침전층에 남아있으므로 열처리 후 열응고부분의 제거로 대부분의 알레르겐 단백질의 제거가 가능할 것으로 생각된다. Urisu 등(7)이 계란 흰자에 포함된 알레르겐 단백질인 ovomucoid는 열처리 후 식염수와 증류수로 씻어줌으로써 대부분의 알레르겐 단백질을 제거할 수 있었다고 한 것과 본 연구의 결과는 같은 이유에서 설명되어질 수 있겠다.

초고압처리에 의한 우육추출물의 SDS-PAGE상 및 Western blots상의 변화

Fig. 3-A는 우육추출물에 대한 100 MPa부터 600 MPa의 초고압처리에 의한 추출물중의 분자의 변화를 나타내고 있다. 100 MPa 가압처리는 대조군과 SDS-PAGE상 차이가 관찰되지 않았다. 200 MPa 가압처리로 97 kDa부근의 band의 감소가 관찰되었고, 300 MPa 가압처리로 40 kDa과 31 kDa사이의 band의 소실(약 35 kDa 부근)과 새로운 band(37 kDa 부근)의 출현이 관찰된다. 이러한 band의 소실과 생성은 처리압력이 높아질수록 두드러졌다. 400 MPa 가압처리로 42.7 kDa 부근의 band가 소실되기 시작하였고, 40 kDa 아래 band(약 37 kDa 부근)와 21 kDa 부근과 그 위에 새로운 band의 생성이 관찰되었다. 500 MPa 가압처리로 알레르겐 단백질로 60 kDa인 BGG분자의 소실과 42.7 kDa 부근 band의 소실이 두드러졌고, 이러한 경향은 600 MPa 처리로 더욱

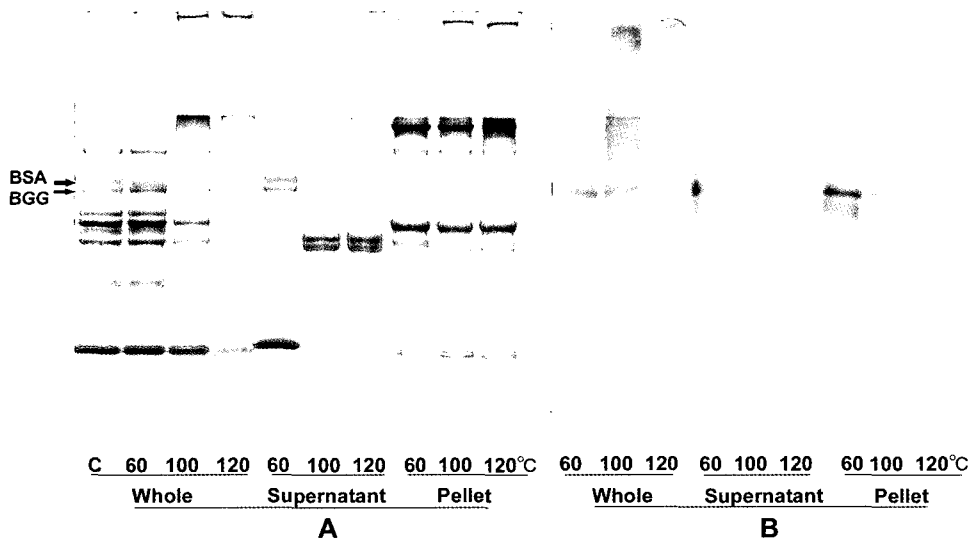


Fig. 2. SDS-PAGE and Western blots analyses of supernatants and pellets separated by centrifuge of the heat-treated beef extracts.

(A) SDS-PAGE, (B) Western blots to (A) with serum of BGG-positive beef allergic patient. Lane C shows the control sample. Equal volumes (25 mg) were loaded in each lane.

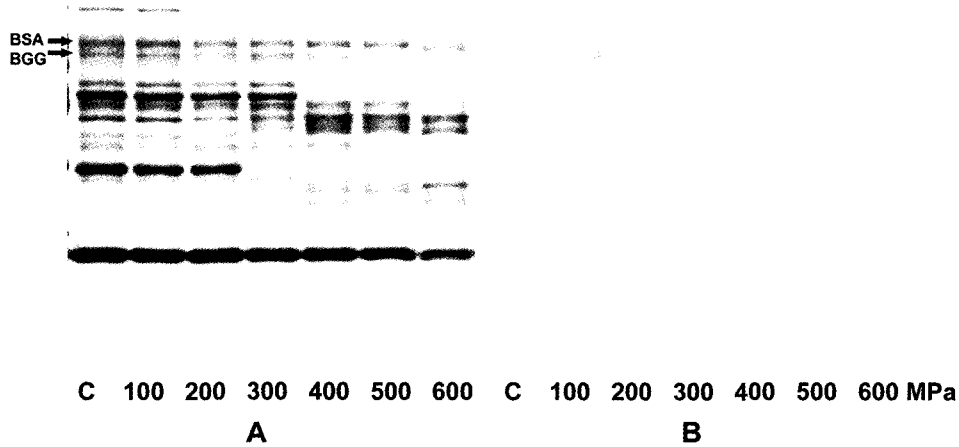


Fig. 3. Effects of a high pressure treatment to beef extracts on the SDS-PAGE and Western blots patterns. (A) SDS-PAGE, (B) Western blots to (A) with serum of BGG-positive beef allergic patient. C shows the control sample. Equal volumes (25 mg) were loaded in each lane. MPa means mega pascal; 1 MPa=10 atm.

두드러졌다. 즉 BGG분자 42.7 kDa분자, 31 kDa분자의 소실과 40 kDa와 35 kDa 사이의 31 kDa와 21.5 kDa 사이에 새로운 band의 생성이 두드러졌다. 이러한 BGG분자의 변화와 상반되어 BSA분자는 초고압처리에 의한 변화가 거의 관찰되지 않았다. Western blots을 이용한 이러한 단백질의 항원성 조사에서 BGG에 대한 항원성은 300 MPa까지는 거의 변화가 없고 400 MPa부터 다소의 항원성의 감소가 관찰되어 600 MPa에서 최대가 되었다. 그러나 120°C 열처리에서 확인되었던 만큼의 큰 항원성의 감소는 관찰되지 않았다 (Fig. 3-B). 이러한 결과를 종합해보면 비교적 큰 분자량의 단백질은 초고압처리의 직접적 또는 간접적 영향에 의하여 비교적 저분자량의 단백질로 분해된 것으로 추측된다. 우유 알레르겐단백질인 BSA와 BGG를 볼 때 BSA는 BGG에 비

하여 초고압처리에 의한 직, 간접적 영향에 저항하는 것으로 보인다. 초고압 처리에 의하여 단백질의 고차구조의 변화에 대해서는 본 연구자를 포함한 많은 연구 그룹으로부터 보고되고 있고, 이러한 구조의 변화는 효소의 활성부위에 영향을 주어 효소와 기질의 반응성을 높이는 것으로 알려져 있다 (15,16). 이러한 배경을 바탕으로 저자는 초고압처리에 의한 우유추출물 중에 존재하는 어떤 물질(효소)의 개입이 있을 것으로 가정하여, 순수 BGG에 대하여 다음과 같은 실험을 행하였다.

순수BGG에 대한 열처리 및 초고압처리의 영향

우유추출물 중에는 각종효소를 포함한 많은 세포질 성분이 포함되어있다. 이러한 성분의 배제 없이는 정확하게 어떤 물질에 대한 물리적 처리가 직접 그 물질에 영향을 미쳤다고

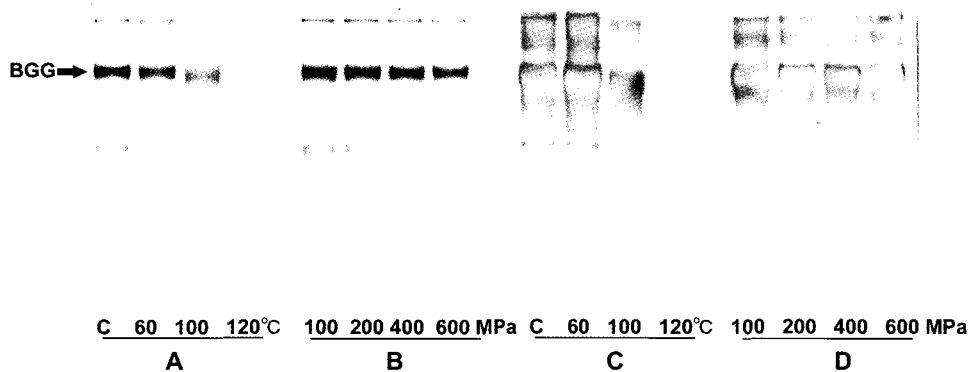


Fig. 4. SDS-PAGE and Western blots analyses of the pure BGG treated with high pressure. (A) and (B) SDS-PAGE, (C) and (D) Western blots to (A) and (B) with serum of BGG-positive beef allergic patient respectively. C shows the control sample. Equal volumes (25 mg) were loaded in each lane.

보기 어려우므로 상업적으로 구할 수 있는 순수 BGG를 이용하여 상기와 같은 실험을 실시하였다. 열처리에 의한 순수 BGG분자의 SDS-PAGE(Fig. 4-A) 및 Western blots(Fig. 4-C)의 결과는 우유추출물의 결과와 비슷한 경향을 보였다. 120°C의 열처리는 순수 BGG분자의 type 1 알레르기 환자의 혈청에 대한 항원성을 큰 폭으로 감소시켰다. 그러나 초고압 처리에 의한 순수 BGG분자의 결과는 우유추출물에서의 결과와 상이하였다. 순수 BGG의 600 MPa까지 초고압 처리에 의한 SDS-PAGE(Fig. 4-B) 및 Western blots(Fig. 4-D)의 결과는 대조군과 전혀 차이를 보이지 않았다. 우유추출물과 순수 BGG에 대한 초고압 처리의 상이한 결과는 우유추출물 중에 존재하는 어떤 효소와 BGG 분자간의 반응성이 초고압 처리에 의하여 높아진 결과인 것으로 보인다. 저자의 연구 그룹은 초고압 처리에 의한 proteasome의 활성화에 미치는 영향을 *in situ* 효소활성 측정장치를 이용하여 조사한 실험에서, 200 MPa 가압처리군이 가장 높은 활성을 나타냈다(16). Fig. 3에 나타낸 것과 같이 이번 연구에서는 400 MPa부터 BGG 분자의 소실이 확인되어 600 MPa에서 최대가 되었다. 이러한 *in situ* 결과와의 차이는 그 측정방법에 있는 것으로 보인다. 이번 연구의 우유추출물은 5분 동안의 초고압 처리 후 동량의 2×SDS-sample buffer로 처리되기 전까지 40~50 분 정도 정상기압에 방치되기 때문에 추출물에 작용된 고압이 그대로 유지되지 않았을 것이며, 상대적으로 최초에 작용된 압력이 높은 sample일수록 정상기압에 방치된 후에도 초고압 처리의 영향이 남아있을 것으로 보인다. 이러한 이유에서 *in situ* 실험에서는 대부분의 효소활성이 없어지는 600 MPa이라는 초고압 처리군에서 BGG분자의 분해가 촉진된

것으로 보인다. 효소의 작용은 또한 기질과의 반응시간이 효소활성에 있어 중요한 변수이다. 따라서 본 연구자는 우유추출물을 초고압 처리 후 숙성이 이러한 결과에 미치는 영향을 조사하였다.

초고압 처리된 우유추출물의 숙성에 의한 변화

먼저 600 MPa로 가압 처리된 후 37°C에서 48시간 방치된 우유추출물은 3시간 방치된 추출물에 비하여 우유알레르겐 단백질인 BSA와 BGG를 포함한 전반적 SDS-PAGE상의 band의 감소 및 소실 정도가 뚜렷했다(Fig. 5-A). 이에 상응하여 우유알레르기 환자의 혈청을 이용한 항원성의 조사에서 37°C 3시간 처리군보다 48시간 처리군의 항원성 감소가 뚜렷하였다(Fig. 5-B).

이러한 결과는 우유추출물 중의 어떤 단백질 분해효소가 초고압 처리에 의하여 활성화되어 BGG를 포함한 일부 단백질의 분해를 유도한 것으로 보인다. 상대적으로 BSA는 이러한 분해효소에 저항한 것으로 보이는데, 이러한 BSA의 효소 저항성은 본 연구자의 *in vitro* 소화성 실험에서 BSA가 우유추출물 중의 다른 단백질에 비하여 pepsin과 trypsin의 연속적 처리에 저항하는 결과로 확인할 수 있었다. 순수 BGG를 이용한 실험과 초고압 처리 후 숙성 실험만으로 초고압 처리에 의한 BGG분자의 소실을 우유추출물 중에 존재하는 어떤 효소의 영향만인 것으로 결론지을 수 없을 것으로 보이며, 앞으로 관여할 것으로 추측되는 단백질 분해효소에 대한 저해제를 이용한 효소저해 실험이 뒤따라야 할 것으로 보인다.

우유추출물 중에 존재하는 알레르겐 단백질인 BSA와 BGG는 120°C 이상의 고온 열처리, 또는 100°C 열처리 후 침

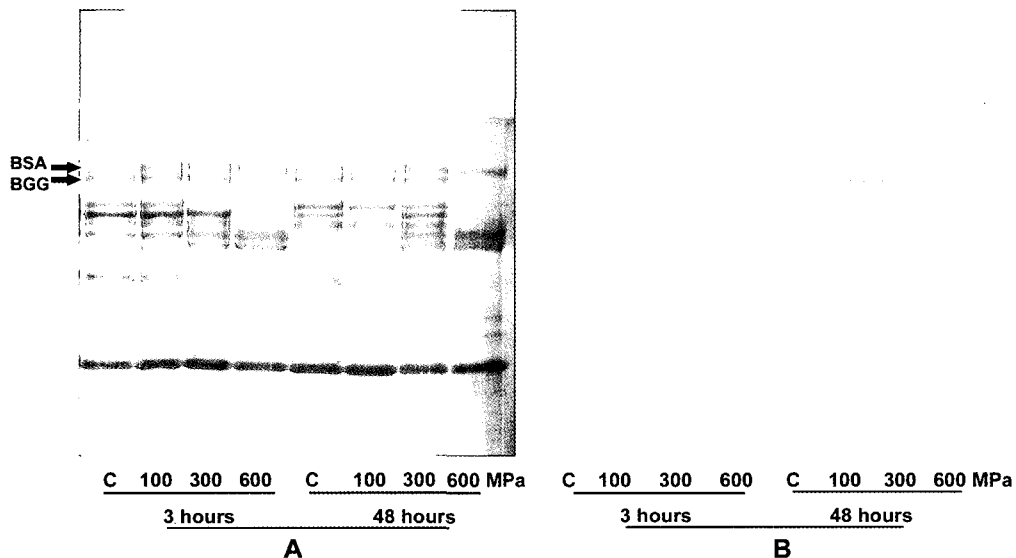


Fig. 5. Effects of an aging of beef extracts after high pressure treatment on the SDS-PAGE and Western blots patterns. (A) SDS-PAGE, (B) Western blots to (A) with serum of BGG-positive beef allergic patient. C shows the control sample. Equal volumes (25 mg) were loaded in each lane.

전물의 제거에 의하여 그들의 항원성의 제거가 가능할 것으로 보이며, 초고압처리는 그 자체만의 이용보다는 다른 처리 방법과 병행함으로써 알레르겐성의 제거에 있어 긍정적 결과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

요 약

이전의 연구에서, 우유중의 주된 알레르겐은 우유추출물중의 BSA, BGG라고 보고하였다. 본 연구에서는 이들 단백질의 열처리와 초고압처리와 같은 물리적 처리에 따른 SDS-PAGE상의 변화와 우유알레르기 환자의 혈청을 이용한 알레르겐성의 변화를 Western blots로 관찰하였다. 우유추출물에 대한 열처리에 의한 알레르겐 단백질의 변화에서, 100°C 가열처리군에서 BSA band는 큰 감소를 보였으나, BGG band는 완전히 제거되지 못하고 남아 있었고, 항원성 역시 대조군에 비하여 감소는 하였으나 여전히 유지되고 있었다. 120°C이상의 열처리는 추출물중의 BSA와 BGG band의 소실과 이에 따른 항원성의 큰 감소를 가져왔다. 우유추출물중의 BSA단백질은 열처리에서와 달리 초고압처리에 의하여 전기영동상에 거의 변화를 보이지 않았다. 그러나 BGG 단백질은 400 MPa 가압처리군부터 전기영동상 band가 감소하였고, 항원성 역시 유의적으로 감소하였다. 이는 초고압처리 정도에 따른 우유추출물중의 BSA와 BGG를 포함한 여러 분자의 SDS-PAGE상의 특이적 변화가 최초로 시사된 결과이다. 이러한 BGG 단백질의 고압처리에 의한 변화는 추출물중의 어떤 효소에 의한 것으로 추측되었고, 고압처리 후 37°C숙성 실험으로 이러한 가설이 확인되었다. 우유추출물에 존재하고 초고압처리로 활성화되어 BGG분자에 특이적으로 관여하는 효소 및 이와 관련된 메커니즘에 대한 연구가 앞으로 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2005학년도 영남대학교 학술연구조성비 지원에 의한 것이며 이에 감사드립니다. 저자는 귀중한 조언을 아끼지 않으신 성삼경 교수님, 이재성 교수님에게 감사드립니다. 또한 저자는 실험실 준비 및 자료정리에 많은 도움을 준 석사과정의 정보영, 최다혜, 최경민을 포함한 저자의 연구실식구 모두에게도 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

1. Werfel SJ, Cooke SK, Sampson HA. 1997. Clinical reactivity to beef in children allergic to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol* 99: 293-300.
2. Fiocchi A, Restani P, Riva E, Mirri GP, Santini I, Bernardo L, Galli CL. 1998. Heat treatment modifies the allergenicity of beef and bovine serum albumin. *Allergy* 53: 798-802.
3. Bleumink E, Young E. 1968. Identification of the atopic allergen in cow's milk. *Int Arch Allergy* 34: 521-543.
4. Nagpal S, Rajappa L, Metcalfe DD, Rao PV. 1989. Isolation and characterization of heat-stable allergens from shrimp (*Penaeus indicus*). *J Allergy Clin Immunol* 83: 26-36.
5. Anderson JA. 1994. Milestones marking the knowledge of adverse reactions to food in the decade of the 1980s. *Ann Allergy* 72: 143-154.
6. Restani P, Fiocchi A, Beretta B, Giovannini M, Galli CL. 1998. Effects of structure modifications on IgE binding properties of serum albumins. *Int Arch Allergy Immunol* 117: 113-119.
7. Urisu A, Ando H, Morita Y, Wada E, Yasaki T, Yamada K, Komada K, Torii S, Goto M, Wakamatsu T. 1997. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *J Allergy Clin Immunol* 100: 171-176.
8. Suzuki A, Kim K, Tanji H, Ikeuchi Y. 1998. Effects of high hydrostatic pressure on postmortem muscle. *Recent Res Devel Agric Biol Chem* 2: 307-331.
9. Han GD, Matsuno M, Ito G, Ikeuchi Y, Suzuki A. 2000. Meat allergy: Investigation of potential allergenic proteins in beef. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1887-1895.
10. Han GD, Matsuno M, Ikeuchi Y, Suzuki A. 2002. Effects of heat and high-pressure treatments on antigenicity of beef extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 202-205.
11. Gornall AG, Bardawill CT, David MM. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751-766.
12. Homma N, Ikeuchi Y, Suzuki A. 1994. Effects of high-pressure treatment on the proteolytic enzymes in meat. *Meat Sci* 38: 219-228.
13. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15: 680-685.
14. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
15. Kubo T, Gerelt B, Han GD, Sugiyama T, Nishiumi T, Suzuki A. 2002. Changes in immunoelectron microscopic localization of cathepsin D in muscle induced by conditioning or high-pressure treatment. *Meat Sci* 61: 415-418.
16. Yamamoto S, Otsuka Y, Borjigin G, Masuda K, Ikeuchi Y, Nishiumi T, Suzuki A. 2005. Effects of a high-pressure treatment on the activity and structure of rabbit muscle proteasome. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 1239-1247.

(2006년 2월 28일 접수; 2006년 4월 11일 채택)