

## 자외선 조사가 Ovalbumin의 분자적 성질에 미치는 영향

조용식<sup>1,3,\*</sup> · 송경빈<sup>2</sup> · 山田經路<sup>3</sup> · 한귀정<sup>4</sup>

<sup>1</sup>국립농업과학원 발효이용과, <sup>2</sup>충남대학교 식품공학과, <sup>3</sup>구주대학 식량화학공학과, <sup>4</sup>국립농업과학원 전통한식과

## Effect of Ultraviolet Irradiation on Molecular Properties of Ovalbumin

Yong Sik Cho<sup>1,3,\*</sup>, Kyung Bin Song<sup>2</sup>, Koji Yamada<sup>3</sup>, and Gui Jung Han<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Fermentation & Food Processing Division, Department of Korean Food Research for Globalization, National Academy of Agricultural Science, Suwon 441-850, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>3</sup>Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

<sup>4</sup>Korean Food & Culture Division, Department of Korean Food Research for Globalization, National Academy of Agricultural Science, Suwon 441-850, Korea

Received July 30, 2008; Accepted October 30, 2008

To elucidate the effects of ultraviolet (UV) irradiation on molecular properties of ovalbumin, the molecular weight profile, secondary structure and tertiary structure of proteins were examined after irradiation by UV with 254 nm wavelength for 4, 8, 16 and 32 hrs, respectively. UV irradiation of protein solution caused the disruption on the native state of protein molecules. SDS-PAGE and gel permeation chromatography indicated that radiation caused initial fragmentation of polypeptide chains and as a result subsequent aggregation due to cross-linking of protein molecules. Circular dichroism (CD) study showed that UV irradiation caused the change on the secondary structure resulting in decrease of helical structure or compact denature on structure of protein depending on irradiation period. Fluorescence spectroscopy indicated that irradiation quenched the emission intensity excited at 280 nm. These results suggest that UV irradiation affect the molecular properties of ovalbumin and may have potential as a means to change the antigenicity of protein allergen.

**Key words:** circular dichroism, emission intensity, molecular weight, ovalbumin, ultraviolet-irradiation

### 서 론

식품 allergy는 식품 중에 함유된 allergy 유발물질을 섭취할 때 발생하는 면역학적 과민증으로서 최근 유병율도 점차 증가하고 있어 식품 allergy 문제에 대응하는 효과적인 방안이 요구되고 있다. 대표적인 allergy 유발식품으로는 우유, 계란, 대두 등이 있으며, 우유중의  $\beta$ -lactoglobulin과 계란중의 ovalbumin 등 일부 단백질은 allergy를 일으킨다<sup>1)</sup>. Allergy를 방지하는 방법은 allergen의 섭취를 막는 것이며 allergen을 제거하거나 열, 산알칼리 처리에 의하여 단백질을 변성하거나 효소로 분해시켜 단백질의 항원성을 감소시키는 방법이 있다<sup>2)</sup>. 효소처리는 가수분해산물의 쓴맛성분이 문제가 되거나 구성물질의 항원성 저하에 효과적이지 않은 경우가 있고 열에 의한 변성의 경우 가열

시간과 온도에 따라 다양한 결과가 보고되고 있다<sup>3)</sup>.

여러 가지 산화시스템에서 단백질은 절단과 중합이 관찰된다. 단백질의 산화는 ozone, superoxide anion, 자외선전자선감마선 조사 등 이온화 조사 또는 발효반응에 의하여 생산된 hydroxy radical의 작용으로 일어난다<sup>4)</sup>. 특히 감마선 조사와 같은 이온화 반응은 단백질의 종류와 조사량에 따라 단백질의 구조적 변화, 아미노산의 산화, 공유결합의 파괴, 자유라디칼의 형성 및 단백질의 재구성 또는 중합반응을 유도한다<sup>5)</sup>. 이와 같은 감마선 조사에 의한 단백질의 구조적 변화는 선행 연구에서 뚜렷하게 관찰된 바 있다. 변 등은 식품 allergy 저감화 연구의 일환으로 allergy를 유발하는 단백질을 감마선 조사에 의해 구조 변화를 일으킨 결과 항원항체 결합능이 감소하였다고 보고하였다<sup>6-8)</sup>. 식품에 대한 자외선 조사는 식품중의 미생물학적 안전성을 유지하기 위한 일환으로 가장 광범위하게 연구되어 왔다<sup>9)</sup>. 자외선 조사는 감마선 조사에 비하여 에너지는 적으나 소비자의 인식과 안전성 측면에서 유리한 장점이 있다. 단백질과 펩티드의 자외선 조사효과에 관한 선행연구에서 자외선 조사도 단백질과 펩티드를 보다 적은 분자질량으로 절단하고 중합을

\*Corresponding author

Tel: +82-31-299-0572; Fax: +82-31-299-0553

E-mail: yscho@rda.go.kr

유도하는 것으로 나타났다<sup>9)</sup>. 그러므로 자외선 조사도 식품 allergen의 특성변화와 항원성을 변화시키는 수단으로 이용가능성이 기대되며 먼저 자외선 조사에 의한 식품 단백질의 구조 및 이화학적 특성변화에 관한 깊이 있는 검토가 요구되나 이에 관한 국내 연구는 미진한 실정이다.

이에 본 연구에서는 식품 allergy 저감화 수단으로 자외선 조사의 타당성을 검토하는 기초 자료로서 자외선 조사에 의한 단백질의 분자적 특성변화를 구명하기 위하여 계란 allergy를 유발하는 주요 단백질인 ovalbumin에 자외선을 조사한 후 분자량 분포와 2차 구조 및 형광스펙트럼의 변화 등을 조사하였다.

## 재료 및 방법

**시험재료.** Ovalbumin은 Sigma사(St. Louis MO, USA) 제품을 사용하였고, 정제 없이 공급된 상태 그대로 시료로 사용하였다. Sephacryl S-200 HR resin은 Amersham Pharmacia Biotech AB사(Uppsala, Sweden)로부터 구입하였고, 전기영동용 표준단백질은 BIO-RAD사(Richmond, CA, USA)의 제품을 사용하였다.

**자외선 조사.** 자외선을 조사하기 위하여 ovalbumin 0.15 g을 평량하고 여기에 10 mM 인산완충용액(pH 7.0) 20 ml를 가하여 교반하면서 용해하여 최종적으로 0.5% ovalbumin 용액(5 mg/ml)을 제조하였다. 자외선 조사는 얻어진 단백질 용액을 fused quartz cell에 넣고 spectrofluorometer RF-1500(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 대기 하의 실온상태에서 254 nm의 자외선 파장으로 각각 4, 8, 16, 32시간 동안 각각 조사하였다. 254 nm의 자외선 파장은 식품의 미생물학적 건전성을 구명하기 위한 연구에서 통상 사용되는 자외선 파장이다<sup>10)</sup>. 자외선 조사된 단백질 용액은 분석 전까지 -30°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

**SDS-PAGE.** SDS-PAGE는 Laemmli의 방법에 따라 실시하였다<sup>11)</sup>. Separating gel의 acrylamide 농도는 15%이었으며, stacking gel의 acrylamide 농도는 5%를 사용하였다. 전기영동용 시료는 자외선 조사된 단백질 용액에 10 mM 인산완충용액(pH 7.0)을 가하여 5배 희석한 후 0.06 M Tris-HCl(pH 6.8), 2% SDS, 14.4 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 25% glycerol, 0.1% bromophenol blue을 함유한 sample buffer와 혼합하여 준비하였다. 전기영동용 표준단백질은 BIO-RAD사(Richmond, CA, USA)의 recombinant protein molecular weight marker를 사용하였으며 분자량 구성은 다음과 같다. Myosin, 201;  $\beta$ -galactosidase 130; Bovine serum albumin 94; Ovalbumin 48.6; Carbonic anhydrase 36.4; Soybean trypsin inhibitor 29.8; Lysozyme 20.6; Aprotinin 6.6 kDa.

**Gel Permeation Chromatography.** Gel permeation chromatography는 10 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 평형화된 Sephacryl S-200 HR column(1.5×120 cm, Amersham Pharmacia Biotech AB(Uppsala, Sweden)을 이용하였으며 자외선 조사된 ovalbumin 용액 2 ml를 컬럼에 주입하였다. 이동상으로 사용한 10 mM 인산완충용액은 0.45 mm microfilter(Whatman, USA)로 여과하였고 aspirator(EYELA, Japan)로 완전하게 탈기하였으며

연동펌프((Perista Mini-Pump SJ-1211, Atto Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 0.5 ml/min의 유속으로 흘려서 단백질을 분획하였고 280 nm에서 단백질 분획의 흡광도를 측정하였다.

**Circular Dichroism (CD) Study.** 자외선 조사된 ovalbumin 용액의 2차 구조를 시험하기 위하여 spectropolarimeter(JASCO J-720, Tokyo, Japan)를 이용하여 25°C에서 Circular dichroism (CD) 연구를 수행하였다. 자외선 조사된 ovalbumin 용액은 Far-UV CD에서 최적농도가 되도록 10 mM 인산완충용액(pH 7.0)을 가하여 희석하여 사용하였다. 이때의 단백질 농도는 0.02%이었다. CD spectrum은 1 mm pathlength cell을 사용하여 5회 반복하여 측정하였으며, 얻어진 spectrum은 polynomial fitting curve를 이용하여 smoothing한 후 molar ellipticity(degcm<sup>2</sup>/dmol)로 나타냈으며, 2차구조 함량은 Chang 등의 방법에 따라 Far-UV CD spectrum을 분석하였다<sup>12)</sup>.

**Fluorescence spectroscopy.** 자외선 조사된  $\beta$ -lactoglobulin과 ovalbumin 용액의 트립토판 잔기의 형광스펙트럼은 형광광도계(spectrofluorometer RF-750, Kyoto, Japan)를 이용하여 시료를 280 nm에서 여기(excitation)하고 emission intensity를 측정하였다. 자외선 조사된 ovalbumin 용액은 최적의 emission spectrum을 얻기 위한 농도가 되도록 10 mM 인산완충용액(pH 7.0)을 가하여 희석하였고, 측정농도는 0.05%이었다.

## 결과 및 고찰

**자외선 조사에 의한 ovalbumin의 분자량 분포의 변화.** 자외선 조사가 ovalbumin의 분자량 분포의 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.5% ovalbumin 용액을 제조한 후 4, 8, 16, 32시간 동안 자외선을 조사하고 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 1과 같다. 자외선 조사에 의한 ovalbumin의 분자량 분포는 조사시간이 증가할수록 단백질의 major band의 굵기가 감소하였고 단백질이 분해된 형태의 minor band들이 나타났다. 얻어진 결과를 확인하기 위하여 gel permeation chromatography에서는 자외선 조사에 의하여 단백질이 분해된 형태와 함께 먼저 용출되는 부분 즉 단백질의 중합된 분획이 나타났고 이 분획은 조사시간이 경과할수록 증가하는 경향이었다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 ovalbumin이 자외선 조사에 의하여 단백질 분자가 소편화된 다음 중합체로 전환되는 것을 나타낸다. 감마선 또는

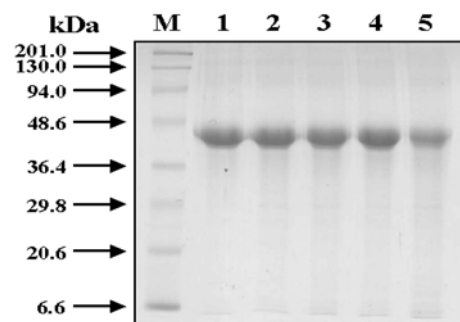


Fig. 1. SDS-PAGE profile of ovalbumin irradiated with UV. Molecular weight marker protein (M); 0 hr (1); 4 hrs (2); 8 hrs (3); 16 hrs (4); 32 hrs (5).

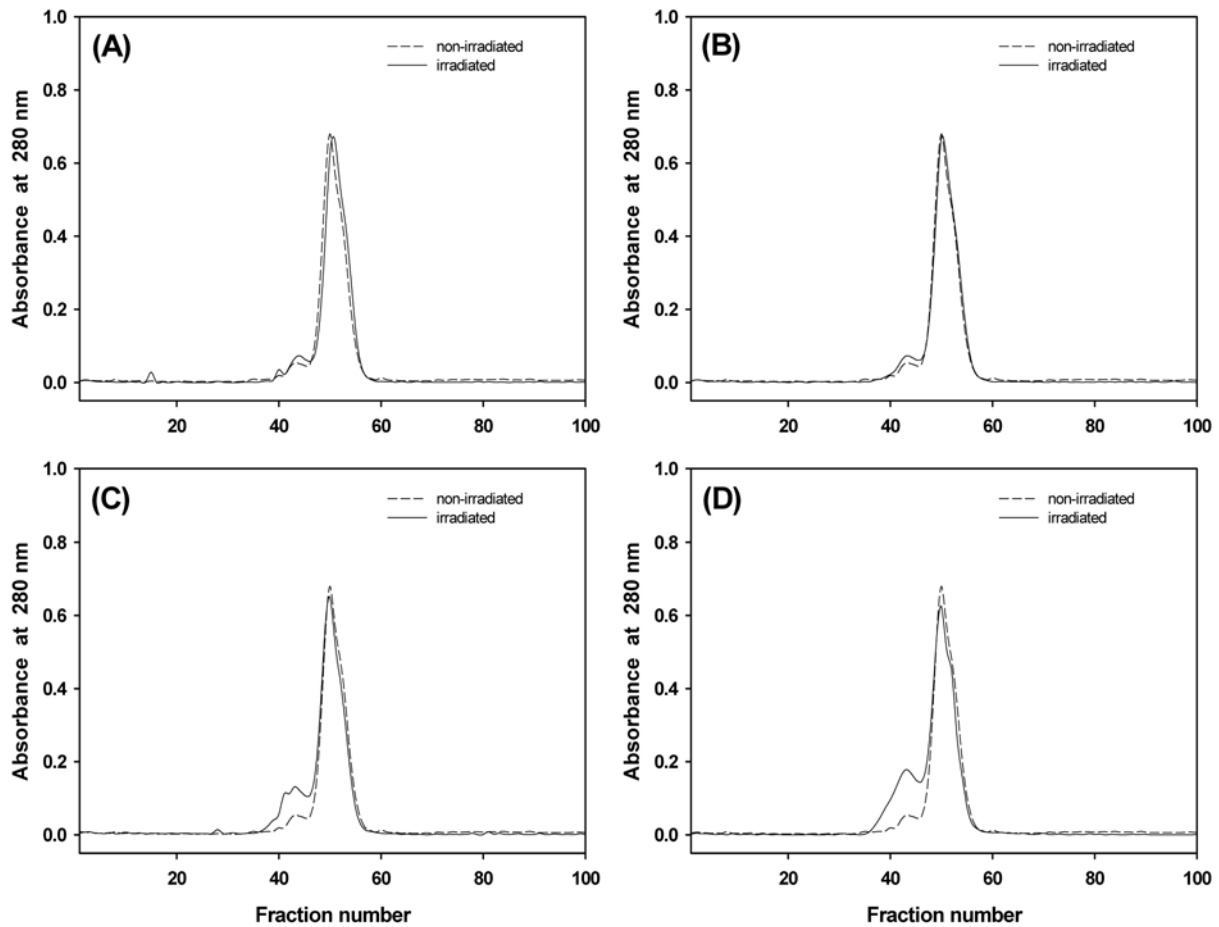


Fig. 2. Gel permeation chromatogram of ovalbumin irradiated with UV. 4 hrs (A); 8 hrs (B); 16 hrs (C); 32 hrs.

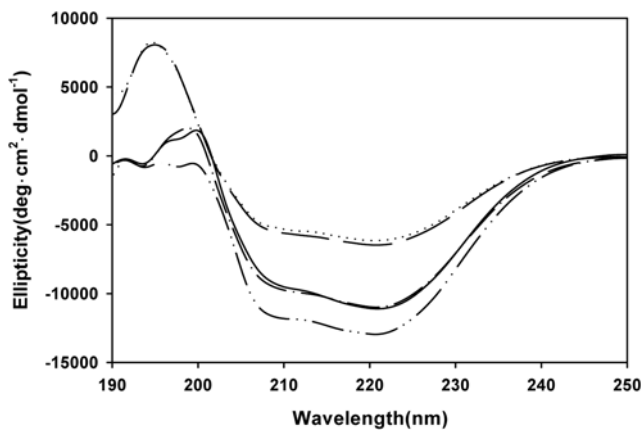


Fig. 3. Circular Dichroism spectra of ovalbumin irradiated with UV. 0 hr: solid; 4 hrs: dotted; 8 hrs: long dash; 16 hrs: dash-dot; 32 hrs: Dash-dot-dot.

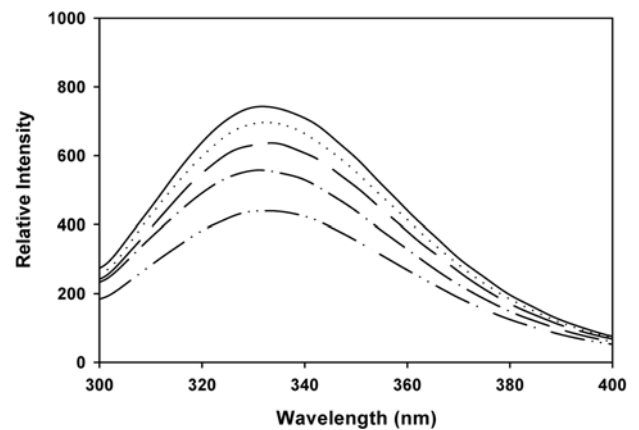


Fig. 4. Fluorescence emission spectra of ovalbumin irradiated with UV. 0 hr: solid; 4 hrs: dotted; 8 hrs: long dash; 16 hrs: dash-dot; 32 hrs: dash-dot-dot.

자외선 조사와 같은 이온화 반응은 자유라디칼의 형성, 아미노산의 산화, 공유결합의 파괴 및 단백질의 재구성 또는 중합반응을 유도한다<sup>5)</sup>. 단백질 손상의 형태는 절단과 중합 두 가지의 형태가 있으며 많은 연구에서도 보고된 바 있다<sup>13-16)</sup>. 단백질은 공유결합이 파괴되면서 분해되는 반면 hydrophobic interaction, electrostatic interaction, inter-protein cross-linking, disulfide

bond가 일어나서 좀 더 높은 분자량의 중합체로 전환된다<sup>17)</sup>. 또한, 중합은 펩티드 사슬 내에서 형성된 아미노산과 유도체들이 다른 단백질의 아미노산 잔기와 cross-link 한다고 한다.

자외선 조사에 의한 ovalbumin의 Far UV CD spectrum의 변화. Far-UV CD spectrum은 단백질의 구조적 특성변화를 보여준다. 특히, 단백질의 펩티드 사슬에서 ordered structure의

**Table 1. Estimation of secondary structure content of ovalbumin irradiated with UV**

Irradiation time (hrs)	$\alpha$ -helix	$\beta$ -sheet	$\beta$ -turn	random coil
	(%)			
0 (control)	30	0	30	40
4	15	60	5	20
8	15	60	5	20
16	30	0	30	40
32	30	0	30	40

변화는 반응 이전의 원래의 단백질의 구조와 쉽게 구별할 수 있다. 또한 2차구조 함량분석은 단백질의 Far-UV CD spectrum의 변화를 객관화하며 일반적으로 random coil의 증가는 단백질의 ordered structure의 파괴를 나타낸다. 자외선 조사가 ovalbumin의 Far UV CD spectrum 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 CD 연구를 수행한 결과는 Fig. 4와 같다. Ovalbumin의 Far UV CD spectrum은 207 nm와 221 nm에서 negative minimum ellipticity를 나타내는 대표적인  $\alpha$ -helix 구조를 보였다. 자외선이 조사된 ovalbumin의 Far-UV CD spectrum은 자외선 조사전후의 차이를 보여 주었고 또한 자외선 조사전후의 ovalbumin의 2차구조 함량분석은 이와 같은 결과를 잘 반영한다(Table 1). 4시간과 8시간을 조사한 경우 ovalbumin의 207 nm와 221 nm의 negative minimum ellipticity가 각각 감소하였다. 이는  $\alpha$ -helix 구조의 변화를 시사하는 것으로 ovalbumin의 helix 구조의 감소는 자외선 조사에 의하여 단백질의 공유결합이 파괴되면서 단백질 분자의 소편화가 형성되기 때문인 것으로 생각된다. 이와 관련하여 Davidson은 자외선 조사는 단백질의 peptide chain을 보다 작은 분자로 절단하며 원래 단백질의 안정화는 파괴된다고 하였다<sup>18)</sup>. 16시간과 32시간 동안 조사한 경우 negative minimum ellipticity에서 차이가 있었으나 원래 단백질과 유사한 Far UV CD spectrum을 보였는데 이는 장시간동안 조사에 의하여 ovalbumin이 compact denature 상태가 되기 때문인 것으로 사료된다. 열에 의해 변성된 ovalbumin의 2차구조는 변성되지 않은 ovalbumin과 큰 차이가 없지만 변성되지 않은 분자에 숨어있던 소수성 부분이 가열 후 몇 군데가 노출되어 열변성된 ovalbumin은 molten globule 상태나 compact denature 상태로 된다고 하였다<sup>19)</sup>. 따라서, 자외선 조사는 ovalbumin의 2차구조의 변화를 야기하며, 이러한 구조적 변화는 이들 단백질의 항원성과 면역조절활성에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 양 등은 ovomucoid에 감마선을 조사한 결과 trypsin inhibiting activity와 antigenicity가 각각 감소하였으며 감마선 조사로 인한 conformational change가 주요한 요인으로 작용하였다고 보고하였다<sup>20)</sup>.

**자외선에 의한 Ovalbumin의 형광스펙트럼의 변화.** 자외선 조사가 ovalbumin의 트립토판 잔기의 형광스펙트럼의 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자외선이 조사된 상기 단백질 용액을 280 nm 파장에서 여기하고 emission intensity를 측정하였다. Ovalbumin의 형광스펙트럼은 자외선 조사시간이 증가할수록 maximum emission intensity가 일관되게 감소되는 결과를 나타냈다(Fig. 4). 이와같은 결과는 자외선 조사가 ovalbumin의

280 nm에서 emission intensity를 소거한 것을 의미한다. 280 nm 자외선 파장은 단백질의 tryptophan과 tyrosine을 여기하며 tryptophan과 tyrosine 주변 환경의 변화를 반영한다<sup>21)</sup>. 또한 자외선 조사에 의한 단백질의 tryptophan과 tyrosine 잔기와 같은 aromatic amino acid residue의 변화를 보여준다. Fujimori는 자외선 조사의 photopolymerization은 단백질의 polypeptide chain의 aromatic residue에 기인된다고 하였다<sup>22)</sup>. 따라서 자외선 조사에 의한 ovalbumin의 형광스펙트럼의 변화는 단백질의 hydrophobic group들의 구조 변화 등 3차 구조에 있어서 변화를 시사하는 것이며 이러한 구조적 변화는 단백질의 기능적 성질에도 영향을 끼칠 것으로 생각된다. 변 등은 ovalbumin에 감마선을 조사한 결과 분자량 등 구조적 특성이 변화하고 항원체 간의 결합능이 감소하였다고 보고하였다<sup>20)</sup>.

결과적으로 ovalbumin은 자외선 조사에 의하여 분자량분포와 2차구조 및 3차구조가 변화하였고 자외선 조사된 ovalbumin은 이미 보고된 감마선 조사된 단백질과 유사한 분자적 특성을 나타냈다. 이는 자외선이 특정단백질에 대하여 감마선과 유사한 작용을 나타내는 것으로 사료되며 자외선 조사가 ovalbumin과 같은 단백질성 allergen의 구조적 특성변화를 유도하고 항원성을 변화시키는 수단으로 이용가능성을 시사하는 결과이다. 다만, 식품 allergy의 억제 및 anti-allergenic food 개발에 자외선 조사기술의 타당성을 확보하기 위해서는 ovalbumin 등 보다 더 다양한 allergen을 대상으로 자외선 조사에 따른 항원성과 allergenicity 변화에 관한 깊이 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 초 록

식품 allergen 저감화 수단으로 자외선 조사의 타당성을 검토하고 자외선조사가 식품 단백질의 분자적 성질에 미치는 영향을 조사하고자 ovalbumin 용액에 자외선을 조사한 후 단백질의 분자량 분포와 2차구조 및 3차구조의 변화를 조사하였다. SDS-PAGE와 Gel permeation chromatography 결과 ovalbumin은 자외선 조사에 의하여 단백질이 분해되고 조사시간이 증가할수록 펩티드가 중합하는 형태를 나타냈다. Circular dichroism 연구는 자외선 조사에 의하여  $\alpha$ -helix 구조가 감소하고 조사시간이 증가할 경우 compact denatured ovalbumin의 구조를 나타내는 2차구조의 변화를 나타냈다. 자외선 조사된 ovalbumin의 형광스펙트럼은 조사시간이 증가할수록 단백질의 maximum emission intensity가 감소하는 3차구조의 변화를 나타냈다. 결과적으로 자외선 조사는 ovalbumin의 분자적 성질을 변화시키며 allergen의 항원성을 변화시키는 수단으로 이용가능성을 시사한다.

**Key words:** 자외선 조사, 오브알부민, 분자량, circular dichroism, emission intensity

## 참고문헌

- Hassen N., Takasugi, M., Yamada, K. and Sugano, M. (1997) Comparison  $\beta$ -lactoglobulin Content in Dairy Products by

- Inhibition ELISA and Immunoblotting. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **3**, 56-60.
2. Ryu, J. H., Lee, J. M. and Son, D. H. (2000) Changes in the antigenicity of chicken egg white by treatment of protease, trifluoromethansulfonic acid, heat and NaOH. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **32**, 720-725.
  3. Grimble, G. K. and Silk, D. B. A. (1989) Peptide in human nutrition. *Nutr. Res. Rev.* **2**, 87-108.
  4. Kato, Y., Uchida, K. and Kawakishi, S. (1992) Oxidative Degradation of Collagen and Its Model Peptide by Ultraviolet Irradiation, *J. Agric. Food Chem.* **40**, 373-379.
  5. Cheftel, J. C., Cuq, J-L. and Lorient, D. (1985) Amino acids, peptides and proteins. in Food Chemistry, 2nd ed., O.R. Fennema(Ed.), Marcel Dekker, Inc. pp 245-369.
  6. Moon, S. A. and Song, K. B. (2001) Effect of g-irradiation on the molecular weight profile of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid. *Food chem.* **74**, 479-483.
  7. Lee, S. H, Lee, S. H. and Song, K. B. (2003) Effect of g-irradiation on the physicochemical properties of porcine and bovine blood plasma proteins. *Food chem.* **82**, 521-526.
  8. Byun, M. W., Seo, J. H., Kim, J. H., Kim, M. R., Oh, N. S. and Lee, J. W. (2004) The comparison of a conformation of ovalbumin irradiated with radiation of gamma and electron beam. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* **33**, 1169-1174.
  9. Cooper, D. R. and Davison, R. J. (1965) The effect of ultraviolet irradiation on soluble collagen. *Biochem. J.* **97**, 139-147.
  10. Wallner-Pendleton, E. A., Sumner, S. S., Froning, G. W. and Stetson, L. E. (1994) The use of ultraviolet reaction to reduce Salmonella and psychrotrophic bacterial contamination on poultry carcasses. *Poultry Sci.* **73**, 1327-1333.
  11. Lammler, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
  12. Chang, C. T., Wu, C. C. and Yang, J. T. (1978) Circular dichroic analysis of protein conformation: Inclusion of  $\beta$ -Turns. *Anal. Biochem.*, **91**, 13-21.
  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. (1997) Lysozyme fragmentation induced by  $\gamma$ -radiolysis. *Int. J. Radiat. Biol.*, **72**, 63-70.
  14. Schuessler, H. and Schilling, K. (1984) Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part II. Bovine serum albumin. *Int. J. Radiat. Biol.*, **45**, 267-281.
  15. Puchala, M. and Schuessler, H. (1993) Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part III. Haemoglobin. *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 149-156.
  16. Hajos, G., Kiss, I. and Halasz, A. (1990) Chemical changes of proteins of irradiated egg white. *Radiat. Phys. Chem.*, **36**, 639-643.
  17. Morr, C. V. and Ha, E. Y. A. (1993) Whey concentrates and isolates: Processing and functional properties, *CRC Rev. Food Sci. Nutr.*, **33**, 431-476.
  18. Davidson, R. J. and Cooper, D. R. (1967) The effect of ultraviolet irradiation on acid-soluble collagen. *Biochem. J.*, **105**, 965-969.
  19. Tani, F., Murata, M., Higasa, T. Goto, M., Kitabatake, N. and Doi, E. (1995) Molten globule state of protein molecule in heat-induced transparent food gels. *J. Agri. Food Chem.* **43**, 2325-2331.
  20. Yang J. S., Kim, J. H., Matsushashi, S. and Kume, T. (1996) Change in biochemical properties of ovomucoid by radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, **48**, 731-735.
  21. Zhang, F., Thottanaiyil, M., Martin, D. L. and Chen, C. H. (1999) Conformational alteration in serum albumin as a carrier for pyridoxal phosphate: A distinction from pyridoxal phosphate-dependent glutamate decarboxylase. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **364**, 195-202.
  22. Fujimori, E. (1966) Ultraviolet light irradiated collagen macromolecules. *Biochemistry*, **5**, 1034-1040.