

가열처리에 따른 우유와 달걀의 Allergenicity의 변화와 소화율에 관한 연구

정은자

서울보건대학 식품영양과

Changes in Allergenicity and Digestibility of Egg and Milk by Heat Treatment

Eun Ja Jeong

Department of Food and Nutrition, Seoul Health College

Abstract

The first purpose of this study was to determine the changes in the allergenicity of milk and egg with heat treatment. The allergenicity of milk and egg is known to have a strong antigen. The second purpose of this study was to observe changes of digestibility of milk and egg after heat treatment.

For this study, passive cutaneous anaphylaxis(PCA) inhibition experiment by using guinea pig and non protein nitrogen(NPN)experiment were attempted. The result were following:

1. The allergenicity of both milk and egg was reduced by heat treatment.
2. The degree of hydrolysis and PCA inhibition increased with longer heating time.
3. The increase in both the degree of hydrolysis and PCA inhibition of milk was higher than that of egg.
4. Egg contained a greater amount of allergen than milk after heat treatment.
5. The digestibility of both milk and egg was reduced by heat treatment.
6. The digestibility was reduced further by increasing heating time.
7. The digestibility of egg was lower than that of milk after the treatment.

Key words: heat treatment, allergenicity, *in vitro* protein digestibility.

I. 서 론

우유와 달걀은 영양가가 높은 완전식품으로 인간 식사에 있어 중요한 양질의 단백질 급원식품으로 균형된 영양소를 공급하는 식품이다. 그러나 우유와 달걀은 강한 항원성으로 여러가지 allergy질환을 일으

키는 요인이 된다. 이¹⁾는 우리나라 소아의 atopy성 피부염의 원인식품으로 우유와 달걀이 가장 많다고 하였고 Cant 등²⁾도 allergy질환을 가지고 있는 유아들이 주로 우유와 달걀의 allergy였다고 보고하였다. 또한 館野幸司³⁾ 등은 우유와 달걀은 대두와 함께 식품 allergy를 유발하는 3대 주 원인식품이라고 하였다.

Allergy증상은 신체 어느 부위에서도 나타날 수 있으며⁴⁾ 가장 흔한 부위는 소화기계, 피부 및 호흡기로 기관지천식, 비염, 구토, 복통, 두드러기, 습진, 설사 등⁵⁾의 증상을 나타내며 주로 영·유아기에 많이 나타난다. 우유와 달걀에 대한 allergy도 성인보다 유·소아기에 많고 습진, 두드러기, 천식 및 위장장애의 원인이 될 수 있으며 흔히 우유 allergy와 달걀 allergy가 잘 동반되어 나타난다.^{6,7)}

이들 우유와 달걀의 allergenicity는 인체에서 항체를 생성할 수 있는 항원성 단백질들에 기인하며 우유에서는 β -lactoglobulin과 casein^{8,9)} 달걀에서는 난백단백질인 ovalbumin과 ovomucoid가¹⁰⁾ 강한 allergen 인 것으로 알려져 있다¹¹⁾

식품 allergen의 항원성 결정부위는 특이한 분자구조에 의한다. 그러므로 우유에 들어있는 열에 불안정한 단백질인 bovine serum albumin, bovine r-globulin, α -lactalbumin은 가열에 의한 변성으로 그들의 allergenicity를 감소시킬 수 있으며^{12,13)} 달걀에서 가장 풍부하고 강력한 Allergen인 ovalbumin은 열에 불안정하므로 가열에 의해 allergenicity를 감소시킬 수 있다¹¹⁾. 그러나 Matsuda¹⁴⁾ 등은 100°C에서 45분간 가열하여도 ovomucoid의 항원성이 소실되지 않았다고 보고하였다.

protein 및 peptide의 allergenicity에 대한 연구는 *in vitro*와 *in vivo* 기법을 이용하여 연구되어 왔는데 *in vitro*와 provocation test에 의해 얻어진 결과 사이의 상관성이 낮은 것으로 보고되어 있고¹⁵⁾ *in vitro* 실험은 생체내에서 일어나는 현상을 반드시 반영한다고 볼 수 없으므로¹⁶⁾ *in vivo* assay인 guinea pig를 이용한 passive cutaneous anaphylaxis(PCA) test는 여러 가지 물질들의 allergenicity를 평가할 때 *in vitro* method보다 확실한 반응을 일으켜 널리 이용되고 있다^{17,18)}

본 논문은 우유와 달걀의 일반성분과 아미노산 조성을 분석한 후 우유와 달걀의 가열방법 및 시간에 따른 allergenicity의 감소효과를 guinea pig를 이용한 passive cutaneous anaphylaxis(PCA) inhibition 실험과 가수분해율로 측정하여 우유와 달걀의 allergenicity를 비교하였고, 이들 처리가 소화율에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 소화율 실험을

행하였다. 본 실험을 통하여 가열처리시 allergenicity를 감소시킬 수 있는 방법을 모색함으로써 allergy 질병치료를 완화시킬 수 있는 기초자료를 제공하고 자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 우 유

본 실험에 사용한 우유는 전북대학교 농과대학 부속목장에서 건강한 Holstein종 젖소에서 착유하여 원심분리한 후 탈지하여 사용하였다.

2) 달걀

사용한 달걀은 전북 고창 양계 주식회사에서 구입한 신선한 난을 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 실험동물

한일 양토장에서 구입한 New Zealand white 종의 체중 2.3kg의 토끼와 250~300g의 Guinea pig와 6~8주된 250~350g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐와 20~30g의 mouse를 고형 사료(화성사료 주식회사)와 풀로 사육하여 본 실험에 사용하였다.

3. 실험재료의 분석

수분, 회분, 조지방, 조단백질 시험은 A.O.A.C법¹⁹⁾에 의해 정량하였으며 당질은 네가지 성분을 구한 후 차인법으로 계산하였다.

1) 아미노산 조성 및 정량

질소정량에 의하여 시료를 1ml중 1ml의 질소를 함유하도록 희석하여 21ml의 가수분해 병에 넣고 12N HCl 1ml를 가하여 진공상태에서 봉한 후 110°C에서 24시간 가수분해한 후 증발 건조시켜 amino acid 자동분석기(LKB 4150 Alpha, Sweden)에서 분석 정량하였다.

4. 실험방법

1) 가열방법

(1) 열처리

우유와 달걀을 autoclave에서 120°C로 10분, 20분, 40분, 60분 가열한 후 냉각시켰다.

(2) Microwave 처리

우유와 달걀을 비금속 용기에 100ml를 넣어서 microwave oven 에서 30분간 가열한 후 시료로 사용하였으며 전자렌지의 내부온도는 65°C로 하였다.

2) Allergenicity 측정방법

(1) 가수분해율(degree of hydrolysis)의 측정

Allergenicity의 감소처리를 한 단백질들의 가수분해율은 시료와 동량의 24% 삼염화 식초산 처리를 하여 단백질을 침전시킨 후 여과하여 여액에서 총질소를 정량한 후 총질소(NT)중 비단백태 질소(NPN)의 비율(%)로 하였다.

(2) PCA(passive cutaneous anaphylaxis) inhibition 실험

가. 항혈청 제조

신선한 달걀을 균질기에서 잘 섞어 원료난액을 단백질 농도가 5mg/ml가 되도록 조정한 후 동량의 Complete Freund's Adjuvant(Sigma 社)와 유화액을 만들어 2.3kg의 토끼의 양 뒷발 대퇴부 근육에 1ml씩 주사하였다. 7일 간격으로 10회 행하고 4주 후부터 각각 주사하기 전날에 귀정맥에서 부분 채혈하여 immuno diffusion을 실시하여 항체가 생긴 것을 확인하였다. 최종 주사일로부터 1주일 후에 전부 채혈하여 회석법에 의하여 PCA역가를 구하였다²⁰⁾. 채혈한 혈액을 37°C에서 1시간, 4°C에서 하루밤 방치한 후 원심분리(4°C, 3,000rpm, 30분)하여 혈청을 얻었다. 얻어진 혈청을 56°C에서 30분간 가열하여 補體(complement)를 불활성화 시킨 후 -80°C의 냉동고에 보관하였다.

나. PCA(passive cutaneous anaphylaxis) inhibition 실험

약 250~300g의 건강한 Guinea pig의 등에 200배로 희석한 상기 혈청 0.1ml를 주사하고 4시간 후 저 allergy 처리된 항원단백질 0.5ml(단백질 5mg/ml)와 PBS(phosphate buffer saline) 완충용액에 용해시킨 1% Evan's blue 0.5ml를 혼합하여 정맥에 주사하였다. 30분 후 회생시켜 반점의 blue spot를 katayama법²¹⁾으로 색소를 침출시킨 후 control의 흡광도와 비교하였다. 색소의 침출은 색소가 나타난 피부조각에 1 N KOH를 1ml 가하여 37°C에서 하룻밤(12시간) 두었다가 0.6N H₃PO₄와 acetone(5:13)의 mixture 9ml를 가한 후 수초동안 심하게 흔들어 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상정액을 Spectrophotometer(CECIL 343, Grating Spectrophotometer) 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Anaphylactic shock score

Mouse 5마리를 한군으로 하여 원료달걀을 10일간 무제한 급여한 후 10일후 꼬리정맥에 저 allergy 처리된 항원을 주사하여 anaphylactic shock를 30분간 관찰한 후 4단계로 분류하여 평가하였다.

0 : 변화없음

+ : 약한 anaphylactic reaction 으로 온몸을 떨며 피로워하다 회복

++ : 온몸에 경련과 호흡곤란 등으로 눈을 감고 피로워함

+++ : 강한 anaphylactic shock 로 신음하다 즉시 사망

3) 소화율 측정실험

단백질의 열처리 는 소화에 영향을 미치므로 *in vitro* 단백질 소화에서 소화율 측정을 1차 pepsin과 2차 pancreatin 소화를 행하는 Mauron²²⁾의 방법을 사용하였다. 1% 단백질이 되는 시료에 5ml의 pepsin 용액(20mg pepsin/0.2N NaOH)을 잘 혼합한 후 37°C의 incubator에서 4시간 소화시킨 후 5ml의 0.2N NaOH를 가하였다. 그 다음에 미생물 증식억제를 위하여 0.04%의 merthiolate와 55.33mg%의 pancreatin이 들어있는 0.05M 인산완충용액(pH 8)을 제조하여

Table 1. Analysis of composition of raw materials

(unit: %)

Food item	Moisture	Ash	Lipid	Protein	Carbohydrate
Milk	86.94	0.87	3.40	3.33	5.46
Egg	74.24	0.92	11.21	13.21	0.42

Table 2. Amino acid compositions of egg and milk

(unit: mg amino acid/100mg protein)

Amino acids	Milk	Egg
Aspartic acid	7.51	11.23
Threonine	4.71	5.18
Serine	5.23	9.21
Glutamic acid	21.70	15.85
Proline	9.23	5.42
Glycine	2.17	4.50
Alanine	3.63	7.15
Valine	6.71	9.53
Methionine	2.40	4.03
Isoleucine	6.53	8.52
Leucine	9.91	11.32
Tyrosine	4.94	5.54
Phenylalanine	5.16	7.42
Histidine	2.76	3.18
Lysine	8.06	6.82
Arginine	3.54	8.43

5ml 가한 다음 24시간 소화시켜서 동량의 24% 삼염화식초산을 가하여 단백질을 침전시킨 후 여액에서 질소를 정량하여 non protein nitrogen(NPN)을 구하여 total nitrogen중 NPN(%)을 구하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 실험재료의 일반성분

우유와 달걀의 일반성분은 Table 1과 같다. 원유는 수분이 86.94%이고 회분이 0.87%, 지방이 3.40%, 단백질이 3.33%, 탄수화물이 5.46%였으며 달걀은 수분이 74.24%, 회분 0.92%, 지방 11.21%, 단백질 13.21%, 탄수화물이 0.42%였다.

2. 우유와 달걀의 아미노산 조성

우유와 달걀단백질의 아미노산 조성을 100mg 단백질당 각 아미노산의 mg으로 표시하였다(Table 2).

우유 단백질중 가장 많은 아미노산은 glutamic acid

로 21.70mg을 함유하고 있었고 가장 적은 것은 glycine으로 2.17mg이었다. 달걀단백질도 glutamic acid의 함량이 15.85mg으로 가장 높았고 histidine이 3.18mg으로 가장 낮았다.

3. 가열처리에 따른 allergenicity의 변화

Table 3은 우유와 달걀시료에 가열방법을 달리하였을 때의 가수분해율과 PCA inhibition test의 결과이다. 단백질의 가수분해는 효소, 산, 알칼리에 의해서 일어나나 본 연구에서는 그 이외의 처리인 microwave의 照射 후에 일반적인 삼염화식초산에 의한 단백질 정량을 실시하여 가열 처리 후 12% 삼염화식초산의 가용성 질소를 정량하므로 단백질의 변성도를 가수분해율로 표시하였다. 이것은 일부 물리적 처리에서는 가수분해보다 변성에 의한 침전성의 변화 척도라고 보아야하며 단백질이나 가열 처리 등에 의하여 유도된 단백질 변화 척도가 PCA inhibition과 상관 관계가 있을 것으로 보여지기 때문이다.

우유 casein의 변성온도가 120°C 이상이고 whey protein의 변성온도는 55°C 부근이므로 우유의 열에 의한 변성은 120°C 이상에서 이루어지므로 우유는 120°C에서 가열하였다. 달걀도 100°C에서 15분간 가열하여도 상당한 량의 면역반응이 남아 있다는 보고²³⁾로 120°C를 기준으로 하였다. autoclave에서 120°C를 기준으로 시간을 변화시켜 가열처리 하였다. 가열방법에 의한 가수분해율은 우유에서는 5.24~21.82%로 가열시간의 경과에 따라 증가하였고 달걀에서는 0.35~5.10%로 시간경과에 따라 증가하였으나 우유보다 상당히 낮은 NPN만 유리시킨 것으로 나타났다. 고온에서의 가열은 우유 등의 NPN을 증가시킨다²¹⁾. 그러므로 가수분해율의 증가는 allergenicity의 저하를 나타낸다고 사료된다. 가열처리를 달리한 이들 시료에 대한 PCA inhibition test의 결과는 우유가 12.31~56.21%, 달걀이 0.08~12.82로 시간경과에 따라 가수분해율과 같은 경향을 보여 NPN증가에 따라 증

Table 3. Changes of allergenicity according to heat treatment in milk and egg

Food item	Heat treatment	Heating time (min)	Degree of hydrolysis (%)	PCA inhibition (%)
Milk	Autoclaving 120°C	10	5.24	12.31
		20	8.01	28.72
		40	14.70	29.38
		60	21.82	56.21
	Microwave 65°C	30	24.48	11.25
Egg	Autoclaving 120°C	10	0.35	0.08
		20	0.82	2.86
		40	1.76	1.12
		60	5.10	12.82
	Microwave 65°C	30	1.07	8.76

가하는 것으로 나타났다.

그러나 우유에 비해 달걀의 PCA inhibition은 낮은 수치를 보여 가열처리에 의해 상당량의 allergen이 남아있는 것으로 나타났다. 이는 Gu 등²⁵⁾이 행한 연구에서 삶은 달걀의 ovomucoid는 주요 allergen으로 100 °C에서 45분간 가열하여도 사람의 IgE와의 면역반응을 완전히 제거할 수 없다는 보고와 久富 등²³⁾이 행한 달걀의 低抗原化를 위한 연구에서 120 °C에서 40분간 가열처리하여도 항원성의 감소가 無處理卵의 1/10에도 미치지 못한다는 보고와 일치한다. 이러한 결과는 달걀단백질은 우유단백질보다 가열처리에 대한 저항성이 크며, 이러한 가열처리에서도 PCA inhibition에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

1980년대 이후 microwave에 의한 전자렌지의 개발로 보급이 증가되고 있으나 allergenicity에 미치는 영향을 전혀 보고된 바 없다. 그러나 단백질을 변성시켜 NPN을 유리시 allergenicity를 저하시키는 것으로 나타났다. microwave에 의한 照射 처리시에 가수분해율이 우유단백질은 24.48%, 달걀단백질은 1.07%였으며 PCA inhibition은 각각 11.25%, 8.76%의 저해율을 나타내었다.

본 연구에서 hypoallergenicity의 평가에 사용된 anaphylactic shock model의 사용과 PCA inhibition

test는 radioallergosorbent test(RAST)나 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법보다 유의성이 크다고 생각된다. 그 이유는 ELISA는 동물이나 사람의 해당혈청과 단백질의 면역적 반응성을 나타내므로 반응성이 곧 allergenicity를 의미하지는 않기 때문이다²⁶⁾. 그러므로 앞으로도 PCA나 anaphylactic shock model이 적용되어 hypoallergenicity protein개발에 이용되어야 한다고 사료된다

4. 가열처리에 따른 anaphylactic shock score

In vivo 측정을 위한 passive cutaneous anaphylaxis 실험에서 guinea pig를 mouse로 대체했을 때 두 종류의 동물의 sensitivity가 비슷했다는 보고로²⁷⁾ mouse를 사용하여 anaphylactic shock score를 관찰하였다. mouse에게 우유와 달걀을 10일간 급여하여 oral 면역시킨 후 가열 처리한 우유와 달걀을 단백질이 1%가 되도록 생리식염수에 희석시켰다. 희석액을 mouse의 꼬리 정맥에 주사한 후 30분간 관찰한 결과를 Table 4에 나타내었다.

가열처리한 우유에 있어서는 모두 ++의 score를 나타내었다. 가열시간에 관계없이 모두 호흡곤란, 경련 등을 일으켰다. 달걀은 더욱 심한 반응을 나타내어 열처리를 가한 달걀을 주사한 결과 10분과 20분 처리한 달걀에 있어서는 강한 반응을 나타내어 온몸의 경련과 호흡곤란으로 괴로워 하였고 40분간 처리한 달걀과 60분 처리한 달걀을 주사한 mouse는 anaphylactic shock 를 일으켜 주사 후 곧 죽었다. 이는 달걀이 가열에 의해 allergenicity의 감소가 어렵다는

Table 4. Anaphylactic shock score of milk and egg after heat treatment

Heat treatment	Heating time(min)	Anaphylactic shock score	
		Milk	Egg
Control		+++	+++
Autoclaving 120°C	10	++	++
	20	++	++
	40	++	+++
	60	++	+++
Microwave, 65°C	30	+	++

Table 5. *In vitro* protein digestibility with different heat treatment and heating time

Heat treatment	Heating time (min)	Milk (%)	Egg (%)
Control		89.35	70.76
Autoclaving, 120°C	10	83.19	67.20
	20	78.04	68.25
	30	75.29	56.67
	40	72.69	63.87
	60	66.80	64.18
Microwave, 65°C	30	64.96	65.12

것 즉, 가수분해율이나 PCA inhibition이 낮다는 것을 뒷받침하여 준다. microwave로 처리한 우유에서는 약한 반응을 일으켜 + score를 나타내었고 달걀에 있어서는 ++의 반응을 나타내어 microwave에 의한 열처리에서도 달걀의 allergenicity가 우유보다 저하되지 않았음을 보여주었다.

5. 소화율의 측정

우유와 달걀의 allergenicity를 감소시키기 위한 열처리가 소화에 어떻게 영향을 미치는가를 알아보기 위해 소화를 실험을 행한 결과는 Table 5와 같다.

Table 5에서 보는바와 같이 우유의 소화율은 66.80%~83.19%로 대조군(89.35%)에 비해 소화율이 감소했으며 가열처리시 가열시간이 길어짐에 따라 소화율도 감소되었다. microwave 조사시에도 64.96%의 소화율을 나타내었다. 달걀은 우유보다 소화율이 낮아서 56.67%~68.25%였는데 우유와 마찬가지로 가열처리시 대조군(70.76%)에 비해 소화율이 감소하는 경향을 보였으며 열처리시간이 길어짐에 따라 소화율이 더욱 감소하였다. microwave 조사시에는 65.12%로 우유와 비슷한 소화율을 나타내었다. 가열처리시 우유보다 달걀의 소화율이 낮게 나타나 같은 조건일 때 우유는 달걀보다 소화율을 감소시키지 않으면서 allergenicity를 저하시키는 것으로 나타났다.

IV. 요약

강한 항원성을 가진 우유와 달걀의 Allergenicity가 여러 가지 가열처리에 의한 변화와 가열처리 후

소화율의 변화를 살펴보고저 우유와 달걀의 가열처리후 Guinea pig를 이용한 Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA) inhibition실험과 Non Protein Nitrogen(NPN)정량을 통한 가수분해율의 측정, pepsin과 pancreatin을 사용한 소화율의 측정결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

우유와 달걀의 allergenicity는 가열에 의해 감소하였으며 가열시간이 길수록 단백질 가수분해율및 PCA inhibition을 증가시켰다. 달걀보다 우유의 단백질이 가수분해율과 PCA inhibition의 증가율이 높아서 달걀은 우유보다 가열처리에 의한 저항성이 강해 상당량의 allergen을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

우유와 달걀의 소화율실험 결과 대조군에 비해 소화율이 감소했으며 가열시간이 길어짐에 따라 소화율이 더욱 감소되었고 달걀의 소화율이 우유보다 낮았다.

V. 참고문헌

1. Lee, K. Y.: Food Allergy of Delayed Type. Allergy, 12(2): 151-159, 1992.
2. Cant, A., Marsden, R. A. and Kilshaw, P J.: Egg and Cow's milk hypersensitivity in exclusively breast fed infants with eczema and detection of egg protein in breast milk. British Medical J., 291: 932-935, 1985.
3. 館野幸司, 岸 菊子: 子どもの 食物アレルギー, 22-23, 1981.
4. Kjellman, N. I. M. and Johnansson, S. G. O.: IgE and atopic allergy in newborns and infant with a family history of atopic disease. Acta Pediatr. Scand., 65: 465-471, 1976.
5. Cant, A. J.: Food allergy in childhood. Human nutrition. Applied nutrition, 39A: 277-293, 1985.
6. Langeland, T.: Clinical and immunologic study of allergy to hen's egg white, Clin. Allergy, 40: 314-322, 1978.
7. Park, K. B., Eun, H. C. and Lee, Y. S.: A Case with Milk and Egg Allergy. Allergy, 6 (1): 1-54, 1986.

8. Goldman, A. S., Anderson, D. W., Sellers, W.A., Seperstein, S., Kniker, W. T. and Halpern, S. R.: Milk Allergy. I. Oral challenge with milk and isolated proteins in allergic children. *Pediatrics*, 32: 425-443, 1963.
9. Kuitunen, P., Visakorpi, J. K., Savilahti, E. and Pekonen, P.: Malabsorption syndrome with cow's milk intolerance. Clinical findings and course in 54 cases. *Arch. Dis., Child*, 50: 351-356, 1973.
10. Langeland, T.: A Clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. III. Allergens in hen's egg white studied by crossed radio-immunoelectrophoresis. *Allergy*, 37: 521-530, 1982.
11. Hoffman, D. R. and Granville, N. C.: Immunological identification of the allergens in egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 71: 481-486, 1983.
12. Bahna, S. L. and Gandi, M. D. L: Milk hypersensitivity. I. Pathogenesis and symptomatology. *Ann. Allergy*, 50: 218-223, 1983.
13. Heppell, L. M. J., Cant, A. J. and Kilshaw, P. T.: Reduction in the antigenicity of whey proteins by heat treatment. A possible strategy for producing a hypoallergic infant milk formula. *Br. J. Nutr.*, 51: 29-36, 1984.
14. Matsuda, T., Gu, J., Tsuruta, K. and Nakamura, R.: Immunotractive glycopeptides separated from peptic hydrolysate of chicken egg white ovomucoid. *J. Food Science*, 50: 592-594, 1985.
15. Lowenstein, H., Krastlnikoff, D. A., Bjerrum, O. T. and Gudmund, H. E.: Occurrence of specific precipitations against bovine whey proteins in serum from children with gastrointestinal disorders. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, 55: 514-525, 1977.
16. 足立 達, 伊藤尙敏: 母乳と乳児用調製乳, 東京同文書院, 82-83, 1987.
17. Takase, M., Fukuwatari, Y., Kawase, K., Ogasa, K., Suzuki, S. and Kuroume, T.: Antigenicity of casein Enzymatic Hydrolysate. *J. Dairy Sci.*, 62: 1570-1576, 1979.
18. Lui, C. T., Das, B. R. and Maurer, P. H.: Immunochemical studies of the tryptic chymotryptic and peptides of heat denatured bovine serum albumin. *Immunochemistry*, 4: 1-10, 1967.
19. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C.: 15th Edition, 1990.
20. Otani, H., Dong, X. Y. and Hosonho, A.: Preparation of low-immunogenic peptide fragments from cow milk casein. *Milchwissenschaft*, 45(4): 217-220, 1990.
21. Katayama, S., Shionoya, H. and Ontake, S.: A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on Passive cutaneous anaphylaxis in guinea pig and rat. *Microbiol. Immunol.*, 22(2): 89-101, 1978.
22. Mauron, J., Mottu, F., Bujard, E. and Hegli, R.: The availability of lysine, methionine and tryptophan in condensed milk and milkpowder *in vitro* digestion studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 59-64, 1955.
23. 久富道江, 木村 守, 犬飼 進, 押田一夫: 卵の低抗原化に関する研究, *アレルギー*, 40(12): 1454-1463, 1991.
24. Sarwar, G., Peace, R. W. and Botting, H. G.: Difference in protein digestibility and quality of liquid concentrate and powder forms of milk-based infant formulas fed to rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49: 806-813, 1989.
25. Gu, J., Matsuda, T. and Nakamura, R.: Antigenicity of ovomucoid remaining in boiled shell eggs. *J. Food Sci.*, 51: 1448-1450, 1986.
26. Grana, B., Marioni, L. and Rubaltelli, F. F.: Evaluation of guinea pigs of the allergenic capacity of two infant formulae based on hydrolyzed milk proteins. *Biol. Neonate*, 48: 122-124, 1985.
27. Poulsen, O. M. and Hau, J.: Murine passive

cutaneous anaphylaxis test for the 'all or none' determination of allergenicity of bovine whey proteins and peptides. *Clinical Allergy*, 17: 75-81, 1987.