



# 우유에서의 알레르겐 저감화 방법

하 월 규  
대상주식회사 건강연구소

## Allergenicity Reduction of Milk

Woel-Kyu Ha  
Health R&D Center, Daesang Corp.

### ABSTRACT

This review was written to introduce updated data on the structure and function of the major milk proteins identified as allergens, the characterization of their epitopes in each allergenic milk proteins, and the reduction of milk protein allergenicity. Most mammalian milk protein, even protein present at low concentration, are potential allergens. Epitopes identified in milk proteins are both conformational(structured epitope) and sequential epitopes(linear epitope), throughout the protein molecules. Epitopes on casein and whey proteins are reported to be sequential epitope and conformational epitopes, respectively. Conformational epitopes on whey protein are changed into sequential epitope by heat denaturation during heat treatment. Several methods have been proposed to reduce allergenicity of milk proteins. Most ideal and acceptable method to make hypoallergenic milk or formula, so far, is the hydrolysis of allergenic milk proteins by enzymes that has substrate specificity, such as pepsin, trypsin, or chymotrypsin. Commercial formulas based on milk protein hydrolysate are available for therapeutic purpose, hypoantigenic formula for infants from families with a history of milk allergy and hypoallergenic formula for infants with existing allergic symptoms.

(Key words : allergenic milk protein, epitope, allergenicity reduction, hypoantigenic formula, hypoallergenic formula)

### 우유 단백질(Milk Protein)

우유 중의 단백질은 약 3.5% 함유되어 있으며, 크게 casein 과 유청 단백질로 분리할 수 있다. 탈지유를 약 20°C에서 pH 를 4.6으로 산성화시키면 약 80%의 우유 단백질은 침전되는데, 이것을 카세인(casein)이라고 하며, 수용액 상태로 존재하는 약 20%의 단백질을 유청 단백질(whey protein 혹은 serum protein) 또는 비카세인 단백질(non-casein protein)이라고 한다. 탈지유를 산성화시켜 만든 casein을 isoelectric casein 혹은 acid casein이라고 하며, 때로는 “casein nach Hammarsten” 이라고도 부른다. Acid casein을 제조할 때 생기는 수용액 부분을 acid whey라고 한다. Casein은 응유효소(chymosin) 혹은 rennet로서 응고시켜 생산하기도 하는데, 이러한 방법으로 만든 casein을 rennet casein이라고 하며, 수용액 부분을 rennet whey 혹은 sweet whey라고 한다. 그리고 cheese whey는 치즈 제조에서 생기는 부산물이며, rennet whey와 비슷한 조성을

가지고 있다.

유청 단백질은 탈지유를 산 또는 효소로서 casein을 응고시킨 다음 여과 또는 원심분리하여 응고물을 제거하고 남은 유청을 회수하여 분리, 정제할 수 있다. 유청(whey)에는 유청 단백질뿐만 아니라 유당과 다량의 미네랄이 함유되어 있으며, 유청 단백질을 증류수에 투석하여 유당과 미네랄을 제거하면 순수한 유청 단백질을 만들 수 있다.

포유동물에서 casein과 유청 단백질의 비율은 종간에 큰 차이가 있다. 모유의 경우, casein/유청 단백질 비율은 40:60, 馬乳(mare's milk)는 50:50인 반면에 반추동물의 우유, 산양유(goat's milk), 면양유(sheep's milk), 물소유(buffalo's milk)의 비율은 약 80:20이다.

Casein은 평균 약 0.85%의 무기인을 함유하고 있는 phosphoprotein이며, 인산 잔기는 casein sequence 중에서 serine 잔기의 hydroxyl group에 에스테르화되어 있으며, 이러한 유기인산(organic phosphate)이 casein의 특징을 결정한다. Casein의 인산 잔기는 고열처리할 때 casein의 안정성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. Casein은  $\alpha_{s1}$ -casein( $\alpha_{s1}$ -CN),  $\alpha_{s2}$ -

\*Corresponding author : Woel-Kyu Ha, 125-8, Pyokyo-Ri, Majang-Myun, Icheon-City, Gyungki-Do 467-813, Korea. E-mail : woelkyu@unitel.co.kr

표 1. 우유와 모유단백질의 차이

Constituent	Bovine milk	Human milk
Protein concentration(%)	3.5	1.0
Casein: NCN <sup>1)</sup>	80:20	40:60
Casein types	$\alpha_{s1} = \beta > \alpha_{s2} = \kappa$	$\beta > \kappa > \alpha_{s1}$ <sup>2)</sup>
$\beta$ -lactoglobulin	50% of NCN	None
Lactoferrin	Trace	20% of TN
Lysozyme	Trace	Very high(6% TN; 3000×bovine)
Glycopeptide	Trace	High
NPN <sup>3)</sup> (as % TN <sup>4)</sup> )	3	20
Taurine	Trace	20
Lactoperoxidase	High	Low
Immunoglobulins(Ig)	Very high	Lower
Ig type	IgG <sub>1</sub> >IgG <sub>2</sub> >IgA	IgA>IgG <sub>1</sub> >IgG <sub>2</sub>

<sup>1)</sup> NCN: Non-casein nitrogen.

<sup>2)</sup> A low level of  $\alpha_{s1}$ -casein has recently been demonstrated in human milk(Martin *et al.*, 1996).

<sup>3)</sup> NPN: Non-protein nitrogen.

<sup>4)</sup> TN: Total nitrogen.

casein( $\alpha_{s2}$ -CN),  $\beta$ -casein( $\beta$ -CN),  $\kappa$ -casein( $\kappa$ -CN)이 casein micelle라고 하는 콜로이드성 마이셀 형태로 우유에 존재한다.

유청 단백질을 구성하는 주요 단백질은  $\beta$ -lactoglobulin( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactalbumin( $\alpha$ -LA) 그리고 serum albumin(SA)이고 총 유청 단백질 중에서 각각 약 50%, 20%, 10%를 차지하며, 이 밖에 소량의 immunoglobulin, lactoferrin(LF), lysozyme 그리고 효소들로 구성되어 있다.

## 우유 단백질의 이화학적 및 구조적 특징

### 1. Casein

처음에는 casein이 동질성 단백질로 인식되었으나, 1939년 Mellander가 free boundary electrophoresis를 이용하여 전기영동상의 이동 거리가 짧은 것부터  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\gamma$ -casein으로 분리하였다. 1956년 Waugh와 von Hippel은 calcium sensitive casein인  $\alpha_s$ -casein(s=sensitive)과 calcium ion에 의해서 침전되지 않는  $\kappa$ -casein을 발견하였다. 그 이후에  $\alpha_s$ -casein은  $\alpha_{s1}$ -casein과  $\alpha_{s2}$ -casein으로 분리되었다. 따라서 우유 casein에는 특징적인 유전물질로서  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\alpha_{s2}$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein이 각각 약 37%, 10%, 35%, 12%로 구성되어 있다는 것이 밝혀졌다. 1960년대 초에 Urea-PAGE와 SDS-PAGE가 소개된 다음부터 이러한 방법이 casein 분석의 표준기술로서 사용되고 있다.

네 개의 casein 분자 중에도 미세이질성(microheterogeneity)이 존재한다. Casein은 단백질 mole 당 인산화(phosphorylation)된 잔기수가 다르다. 즉,  $\alpha_{s1}$ -casein은 주로 8 mole의 인

산 잔기가 serine에 결합되어 있으나 유전적 차이에 의해서 경우에 따라서 9 mole의 인산 잔기가 결합된 경우도 있다.  $\alpha_{s2}$ -Casein은 유전적 차이에 따라서 10~13 mole의 인산 잔기가 결합되어 있다.  $\beta$ -Casein은 본래 5 mole의 인산 잔기가 결합되어 있으나 4 mole이 결합된 경우도 있다.  $\kappa$ -Casein은 1 mole의 인산 잔기가 결합되어 있으나, 경우에 따라서 2 mole의 인산 잔기가 결합된 것도 존재한다. 주요 casein인  $\alpha_{s1}$ -casein과  $\beta$ -casein은 cysteine을 함유하지 않지만  $\alpha_{s2}$ -casein과  $\kappa$ -casein은 mole 당 2개의 cysteine이 분자 사이의 disulfide 결합을 유지하고 있다.  $\alpha_{s2}$ -Casein은 disulfide 결합된 dimer로 존재하는 반면에  $\kappa$ -casein은 일련의 disulfide 결합으로서 dimer부터 decamer까지 존재한다.  $\gamma$ -Casein은  $\beta$ -casein이 plasmin에 의해 가수분해된 peptide라는 것이 확인되었다. 보통  $\gamma$ -casein은 총 casein 중 약 3% 정도 차지하고 있다.

모든 casein의 1차 구조 상의 특징은 특이한 인산화 메카니즘에 의해서 serine에 결합되어 있는 유기인산이 밀집되어 있어 극성과 비극성 잔기가 균일하게 분포되어 있지 않고 한 부분에 소수성(hydrophobic)과 친수성(hydrophilic)이 밀집되어 있다. 이러한 특징때문에 casein을 유화제(emulsifier)로 사용하기도 한다. 인산 잔기는  $Ca^{2+}$ 와 강력하게 결합한다.  $\beta$ -Casein은 casein 중에서 소수성이 가장 강한 반면에  $\alpha_{s2}$ -casein은 친수성이 가장 강하다.  $\kappa$ -Casein의 C-terminal 영역에는 많은 당쇄가 존재하고 비극성 잔기와 방향족 잔기가 거의 없기 때문에 친수성이 아주 강한 반면에 N-terminal 영역은 소수성이 아주 강하다.  $\kappa$ -Casein의 이러한 detergent-like structure(세제와 같은 구조)가 casein micelle 안정화에 중요

한 역할을 한다. Casein은 포유동물의 젖에서 유래하는 단백질 중에서 진화론적으로 가장 다양하게 구성되어 있는 단백질이다. 따라서 다양한 포유동물 젖에서 분리한 casein의 중간 상동성(homology)은 매우 낮으며, 우유와 모유의  $\beta$ -casein sequence간의 상동성은 47% 수준이다.

우유 casein은 약 0.85%의 인(phosphorus)을 함유하며  $\alpha_{s1}$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein은 각각 1.1, 0.6, 0.16%의 인을 함유한다. 인산 잔기는 다량의  $Ca^{2+}$ 과  $Zn^{2+}$  그리고 다른 다가 금속성 양이온과도 결합할 수 있기 때문에 영양학적으로 매우 중요하다. 그리고 인산 잔기는 casein의 용해성을 높여 줄 수 있으며, casein이 고열처리에 대해 안정성을 유지하는데 기여한다. Casein에 결합된 인산 잔기는 단백질에 공유결합되어 있기 때문에 매우 강한 열처리나 높은 pH 혹은 phosphatase에 의해서만 제거될 수 있다.

$\alpha_{s1}$ -Casein과  $\alpha_{s2}$ -casein,  $\beta$ -casein은 탄수화물 잔기를 가지고 있지 않지만  $\kappa$ -casein은 N-acetylneuramic acid, galactose, N-acetylgalactosamine으로 구성된 약 5%의 탄수화물 잔기를 가지고 있다. 탄수화물 잔기는  $\kappa$ -casein에 대해서 아주 높은 수용성과 친수성을 부여한다.  $\kappa$ -Casein의 탄수화물 부분은 주로  $\kappa$ -casein의 131번 threonine에 O-threonyl 결합되어 있는 3당(trisaccharide) 혹은 4당(tetrasaccharide)으로 존재한다.  $\kappa$ -Casein 분자의 당화 변이성은 9~10개의 다른 분자 모형을 만들 수 있다.

Casein은  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -sheet를 파괴하는 아미노산인 proline을 많이 함유하기 때문에 2차 구조와 3차 구조의 비율이 비교적 낮은 단백질이다.  $\alpha_{s1}$ -Casein은  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -sheet의 비율이 낮고,  $\beta$ -casein은  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -sheet의 비율이 각각 10%와 13%이고 unordered structure가 77%이며, 가장 구조가 복잡한 것은  $\kappa$ -casein으로  $\alpha$ -helix와  $\beta$ -sheet가 각각 23%와 31%의 비율로 구성되어 있다.

## 2. 유청 단백질(Whey Protein)

우유 단백질의 약 20%는 유청 단백질이며, 약간의 casein에서 유래되는 peptide를 함유한다. Acid whey에는 proteose-peptone이 함유되어 있고, rennet whey에는 proteose-peptone과 glycomacropeptide를 동시에 함유되어 있다.

유청 단백질은 포화(saturated)  $MgSO_4$  혹은 반포화(half saturated)  $(NH_4)_2SO_4$ 을 이용하여 두 개의 단백질 분획으로 분리할 수 있다. 침전되는 분획은 lactoglobulin이라고 하고, 침전되지 않는 단백질은 lactalbumin이라고 한다. Lactoglobulin 분획은 주로 immunoglobulin(IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA, IgM)으로 구성되어 있다. 그리고 lactalbumin 분획은  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin 그리고 serum albumin의 3개 단백질로 구성되어 있으며, 구성비율은 각각 약 50%, 20%, 10% 그리고 소량의 lactoferrin, transferrin 그리고 수종의 효소를 함유하고 있다.

반추동물인 면양유, 산양유 그리고 물소유의 유청 단백질은 우유의 단백질 구성비와 비슷하지만 모유의 유청 단백질과는 아주 다르다. 유청에는 casein에서 유래하는 peptide도 함유되어 있다. 이러한 peptide는 plasmin과 같이 우유중에 존재하는 단백질 분해효소에 의해서  $\beta$ -casein이 제한적으로 가수분해되어 생성된 것으로서  $\gamma$ -casein이라고 하며, 이보다 더 작은 peptide를 proteose-peptone이라고 부른다.  $\gamma$ -Casein과 proteose-peptone은  $\beta$ -casein 분자의 N-terminal 부분에 상응하는 peptide이며, 유청 중에 용해된 상태로 존재한다. 또한, 우유를 chymosin으로 응고시키고 남은 유청에는  $\kappa$ -casein에서 유래하는 peptide가 용해된 상태로 존재한다. 우유 단백질을 chymosin으로 응고시키면  $\kappa$ -casein이 소수성 para- $\kappa$ -casein(f1-105)과 아주 높은 극성을 띠는 glycomacropeptide(f106-169)라는 두 개의 polypeptide로 분해되는데, glycomacropeptide만 유청에 용해된 상태로 존재하고, para- $\kappa$ -casein은 casein 응고물에 존재한다.

최근 약 20여 년 간 유청 단백질을 상업적인 규모로 생산하는 다양한 기술들이 개발되어 유아식을 포함한 식품산업에 다양한 용도로 이용되고 있다. 여기서 가장 널리 사용되는 유청 단백질 생산기술에 대해서 간단히 소개하면 다음과 같다.

### 1) Ultrafiltration/Diafiltration

Acid whey나 rennet whey에서 분자량이 작은 유당은 제거하고 유청 단백질의 비율을 선택적으로 높이는 막여과(membrane filtration) 기술이며, 이러한 기술로 제조된 것을 whey protein concentrate(WPC)라고 한다. WPC에는 단백질의 함량에 따라 30~80%까지 다양한 제품을 만들 수 있는 기술로서 가장 실용적으로 이용하는 기술이다.

### 2) Ion-exchange Chromatography

보통 실험실에서 사용하는 ion-exchange chromatography와 동일한 원리를 이용하여 생산용량을 산업적 규모로 고도로 정제된 단백질을 분리하는 방법이다. 제조공정은 유청을 column을 통과시키면서 먼저 단백질을 이온교환수지에 흡착시키고 유당과 미네랄은 제거한 다음 pH를 조정하여 column으로부터 단백질을 용출시키는 기술이며, 순도 약 95%의 유청 단백질을 제조할 수 있다.

### 3) Thermal Denaturation

유청을 열처리하고 침전시킨 다음 여과하거나 원심분리하여 유청 단백질을 분리하는 방법이며, 이러한 기술로 제조된 유청 단백질은 lactalbumin이라고 한다. 이 기술로 제조된 유청 단백질은 용해성이 매우 나쁘고 고유의 기능성이 불활성화되기 때문에 최근에는 잘 이용하지 않는 방법이다.

$\beta$ -Lactoglobulin은 162개의 아미노산으로 구성되어 가지

고 있고, 두 개의 disulfide 결합과 하나의 free SH를 가지고 있으며, 보통 우유에는 분자량 36,700 dalton의 dimer로 존재한다.  $\beta$ -Lactoglobulin에는 4개의 유전적 변이체(genetic variant)가 존재한다. 우유의 유청 단백질 중에서 가장 함량이 높은  $\beta$ -lactoglobulin은 모유에는 발견되지 않는 이중 단백질이다. 본래  $\beta$ -lactoglobulin은 반추동물의 젖에만 존재하며  $\beta$ -lactoglobulin의 소수성 영역과 분자당 2개의 retinol 분자가 결합되어 있어 retinol이 산화되지 않고 소장까지 수송하는 역할을 하는 retinol carrier protein이다.

$\beta$ -Lactoglobulin은 매우 고차원 구조로 이루어진 단백질이며, pH 2~6의 범위에서  $\alpha$ -helix 10~15%,  $\beta$ -sheet 43% 그리고 약 unordered structure가 47%의 비율로 구성되어 있다.  $\beta$ -Lactoglobulin은  $\beta$ -barrel-type 구조와 calyx에  $\beta$ -sheet가 존재하는 매우 단단 globular protein이기 때문에 열에 강하고 강산성에서도 구조가 변화되지 않아 위에서 pepsin에 의해서 잘 소화되지 않는다.

$\alpha$ -Lactalbumin는 132개의 아미노산 잔기로 이루어진 single peptide chain이며, 4개의 disulfide 결합을 가지고 있고 2개의 유전적 변이체가 존재한다.  $\alpha$ -Lactalbumin는 mole 당 4개의 tryptophan 잔기를 함유하고 있다.  $\alpha$ -Lactalbumin은

유당(lactose) 생합성의 최종단계에 관여하는 효소인 lactose synthetase의 subunit 중 하나로서 대체로 유당 함량이 가장 높은 모유에 가장 많이 함유되어 있다.

$\alpha$ -Lactalbumin은 metalloprotein이며 4개의 aspartic acid 잔기로 구성된 pocket에 mole 당 1개의  $Ca^{2+}$  이온이 결합되어 있다. 칼슘 결합 단백질은 열에 아주 안정하여 열처리에 의해 변성된 이후에도 단백질이 다시 본래의 구조로 재복귀(renaturation)되는 특징이 있다. 따라서  $\alpha$ -lactalbumin은 우유를 열처리한 이후에 냉각하거나 칼슘이온을 첨가하면 가역적으로 재복귀한다. 그러나  $\alpha$ -lactalbumin은 칼슘에 의해 안정화된 3차 구조를 유지하지만 pH 5.0 이하에서 aspartic acid 잔기는 양성자를 얻어 칼슘과 결합하는 능력을 상실하여 칼슘이온이 해리되고 결국 단백질 분자가 unfold 상태로 변화되기 때문에 pepsin에 의해 쉽게 분해될 수 있다.

또한, 우유에 존재하는  $\alpha$ -lactalbumin의 1차 구조는 lysozyme과 아주 유사하며 난백의 lysozyme과도 매우 유사하다. 총 123개의 아미노산 잔기 중에서 54개가 동일하며, 23개는 구조적으로 유사하다.  $\alpha$ -Lactalbumin는 26%가  $\alpha$ -helix, 14%가  $\beta$ -structure 그리고 60%는 unordered structure로 구성되어 있다. 우유와 모유에서 유래하는  $\alpha$ -lactalbumin 사이에는 약

표 2. 주요 우유 단백질의 항원적 특징

Proteins	Caseins				Whey proteins				
	$\alpha_{S1}$ -CN	$\alpha_{S2}$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN	$\beta$ -LG	$\alpha$ -LA	SA	LF	
Concentration(g/liter) in milk	12~15	3~4	9~11	2~4	3~4	0.6~1.5	~0.4	-	
M.W(kDa)	23.6	25.2	24.0	19.0	18.3	14.2	66.3	80	
No. amino acid residues per molecule	199	207	209	169	162	123	582	703	
No. S-S bridges residues per molecule	-	1	-	1	2 (1 free SH)	4	17 (1 free SH)	16	
No. phosphate residues per molecule	8(9)	10~13	5	1	-	-	-	-	
Isoelectric point	4.9~5	5.2~5.4	5.1~5.4	5.4~5.6	5.3	4.8	4.9~5.1	8.7	
Secondary structure (% of total chain)	$\alpha$ -helix	5~10	?	10	23	10~15	26	34	?
	$\beta$ -sheet	4~15	?	13	31	43	14 ( $\beta$ -structure)	50	?
	Unordered structure	?	?	77	?	47	60	?	?
Antigenicity	++	++	++	++	+++	++	+	?	
Type & No. Epitopes	Sequential /6	Sequential /?	Sequential /?	Sequential /?	Conformational/4	Conformational/?	Conformational/6	Conformational/?	
% Cow's milk allergy	60*				60~80	50	50	?	
Sequence homology(%) bovine vs. human	?	?	47	Low	Not found in human milk	72	80	?	

\* Occurrence rate of CMA against total casein.

72%의 아미노산 서열 상동성이 존재한다.

## 우유 단백질의 Antigenicity/Allergenicity

우유 단백질은 매우 다양한 이질성 단백질로 이루어져 있다. 그리고 우유 단백질에는 사람에게 있어서 특이 항체를 생산할 수 있는 단백질이 18~25개 정도 존재한다. 우유 단백질 중에서  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, serum albumin 그리고 immunoglobulin과 같은 유청 단백질이 casein보다 항원성과 allergenicity가 더 강한 것으로 보고되고 있다(Gjesing 등, 1986).

$\alpha_{s1}$ -Casein과  $\alpha_{s2}$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein 사이에는 아미노산 서열의 상동성이 없고 기능적인 특성도 다르다.  $\alpha_{s1}$ -Casein과  $\alpha_{s2}$ -casein,  $\beta$ -casein은  $Ca^{2+}$ 에 아주 민감하지만  $\kappa$ -casein은  $Ca^{2+}$ 에 대해 안정한 특징이 있다. Casein은 고도로 인산화된 단백질이지만 수용액 중에서 느슨한 3차 구조의 random coil 상태로 존재하기 때문에 소화되는 동안 단백질 분해효소에 의해 빠르고 광범위하게 분해되어 면역원성(immunogenicity)이 낮은 단백질로서 인식되고 있다. Casein의 항원 결정기 형태는 sequential epitope으로서  $\alpha_{s1}$ -casein과  $\beta$ -casein에 각각 6개 그리고  $\kappa$ -casein에는 5개의 항원 결정기가 존재한다. 우유의 casein은 다른 반추동물의 젖에도 비슷한 양상으로 존재하며, 우유 casein과는 80~90%의 고도의 아미노산 서열 상동성을 가지고 있다. 이러한 특징이 우유에 알레르기 반응을 보이는 환자가 대체식으로서 면양이나 산양유를 먹으면 역시 알레르기 반응을 일으킬 수 있다.

Casein에 대해 알레르기 반응을 보이는 대부분의 환자는 모든 casein 분자와 반응한다. IgE와 반응하는 강도는 casein 분자 간에 차이가 있으며, casein의 구성 비율과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(Bernard 등, 1998). 이러한 현상은 소화되는 동안 casein micelle이 붕괴된 이후 각 casein 성분에 의해 동시감작(co-sensitization)의 결과로 추측되고 있다. 그리고 어떤 환자의 혈청에는 whole casein보다 각 casein에 대한 IgE titer가 훨씬 높게 나타나는 경우도 있어 때문에 polysensitization이 cross-sensitization에서 기인할 수 있다는 가능성이 제기되고 있다. 이와 같은 사실은 하나의 특이 IgE 항체가 각 casein과 교차반응할 수 있다는 것을 의미한다.

또한, casein의 주요 인산화 영역이 소화효소에 의해 쉽게 분해되지 않고 면역 반응성이 높은 영역이기 때문에 인산화 영역이 casein의 항원성도 중요한 역할을 할 것으로 추측되고 있다(Bernard 등, 2000).

우유 단백질 중에서 항원성이 가장 강력한 것은  $\beta$ -lactoglobulin으로서 모유에는 존재하지 않고 반추동물의 젖에만 존재하는 외래성 단백질(foreign protein)이다. 그리고  $\beta$ -lactoglobulin은 가수분해에 의해 쉽게 분해되지 않으며, 항원

결정기의 구조는 conformational epitope로서 4개의 항원 결정기가 존재한다.  $\alpha$ -Lactalbumin과 serum albumin, immunoglobulin의 항원성은 casein과 비슷한 수준이며, 항원 결정기의 구조는 conformational epitope으로서 serum albumin에는 6개의 epitope이 존재한다.

$\beta$ -Lactoglobulin 분자 중 90% 이상의 우유 알레르기 환자에 의해서 인식되는 peptide는 f(41~60), f(102~124), f(149~162)의 세가지 단편이며, 전체  $\beta$ -lactoglobulin 분자에 각 peptide 단편의 면역반응성은 각각 약 10~15% 정도이다. 이들 중에서 peptide f(41~60)과 f(102~124)은 수소결합 혹은 disulfide 결합에 의해 안정화된 loop를 형성한다(Brownlow 등, 1999). 그리고  $\beta$ -lactoglobulin 분자 중에서 친수성 영역인 f(124~134)가 항원성이 매우 높은 것으로 알려지고 있으며, 이 영역은  $\beta$ -lactoglobulin의 표면에 위치한다(Adams 등, 1991).

주요 우유 단백질에 대한 allergenicity를 확인하기 위한 일련의 연구에서 우유 알레르기 환자의 혈청과 정제된 우유 단백질 분획을 투여한 결과, 우유 알레르기 아기의 약 60~80%가  $\beta$ -lactoglobulin에 양성반응을 보이며, casein의 경우 약 40%,  $\alpha$ -lactalbumin 약 40~50%, serum albumin은 약 18~50%가 양성반응을 보인 것으로 보고되었다(Goldman 등, 1963; Freier 등, 1969; Kuitunen 등, 1975; Lebenthal, 1975).

## 우유 단백질의 Allergenicity 저감화 방법

### 1. 열처리(Heat Treatment)

Casein은 열처리를 포함한 물리적 처리에 대해 매우 안정한 특징이 있다. Casein은 우유의 pH인 6.7에서 100°C, 24시간 열처리해도 응고되지 않고 안정하며, 140°C에서 20분 동안 가열하여도 물리적 변화를 일으키지 않는다.

유청 단백질은 2차 구조와 3차 구조의 비율이 매우 높은 globular protein이기 때문에 90°C에서 10분간 열처리하면 불가역적으로 변성되고 conformational epitope이 파괴되어 새로운 sequential epitope를 만든다. 열처리에 의해  $\beta$ -lactoglobulin 본래의 항원성은 낮아지지만 또 다른 새로운 항원성 단백질이 생성되어 결국은 항원성이 낮아진다고 단정하기 어렵다. 따라서 유청 단백질을 30분간 끓이면 항원성과 면역원성을 현저히 낮출 수 있으나, 우유 알레르기 유아는 이 정도 수준으로 가열처리한 유청 단백질에도 반응할 수 있다.

유청 단백질을 열처리하여 유청 단백질의 allergenicity 저감화가 가능한 것으로 보고된 바 있다. Kilshaw 등(1982)은 가열처리한 유청 단백질을 이용하면 non-sensitizing 유아용 우유의 생산이 가능하다고 하였다. Heppell 등(1984)은 유청 단백질의 allergenicity은 열처리에 의해서 없어질 뿐만 아니라 열처리하지 않은 우유로 감작시킨 실험동물에 대해 열처리 유청 단백질의 감작능력은 현저히 낮아졌다고 하였다.

표 3. 열처리에 의한 유청단백질의 항원성 비교\*

			Pasteurised whey	Whey heated 100°C 30 min	Whey heated 115°C 30 min
Fatal anaphylaxis after i.v. injection of fed preparation (no. affected/total)			4/4	0/10	0/5 <sup>a</sup>
<i>In vivo</i>	Serum antibodies (mean IgG titres <sup>b</sup> ) to:	$\beta$ LG <sup>c</sup>	7.6(6.5)	Negative(2.2)	
		$\alpha$ LA	0.2(0.6)	Negative	Negative(0.5)
		BIgG <sub>1</sub>	7.0	Negative	Negative
		BSA	0.4	Negative	Negative
<i>In vitro</i> (by ELISA) <sup>d</sup>	Level of residual antigenic protein:	$\beta$ LG	1(1/2)	1/2048	1/8192(<1 $\mu$ g/mL)
		$\alpha$ LA	1	1/32	1/512
		BIgG <sub>1</sub>	1(1/2)	None detected	None detected
		BSA	1	<1/64	<1/64

Where results of duplicate experiments differed, these are shown in brackets.

\* Data from Heppell *et al.*(1984).

<sup>a</sup> Animals given i.v. injection of skimmed milk.

<sup>b</sup> Number of doubling dilutions from 1/20.

<sup>c</sup>  $\beta$ LG,  $\beta$ -lactoglobulin;  $\alpha$ -lactalbumin; BIgG<sub>1</sub>, bovine IgG<sub>1</sub>; BSA, bovine serum albumin.

<sup>d</sup> Fraction to the nearest doubling dilution of level in unheated skimmed milk.

이러한 일련의 연구결과, 열처리한 유청 단백질을 이용하여 hypoallergenic milk를 제조할 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 그러나 열처리하여 유청 단백질 고유의 conformational epitope은 파괴할 수 있지만, 새로운 sequential epitope이 출현될 가능성이 있다.

유청 단백질과 유당 혼합액을 열처리하면  $\beta$ -lactoglobulin과 유당의 amino carbonyl 반응에 의해 생성되는 반응산물이 새로운 allergen이 될 수 있으며 고유의  $\beta$ -lactoglobulin에 비해 수십 배 더 높은 allergenicity를 나타낼 수 있다(Bleumink와 Berren, 1966; Bleumink와 Young, 1968). Otani group은 일련의 연구를 통해  $\beta$ -lactoglobulin과 유당을 함께 열처리하여 생성된 epitope은  $\beta$ -lactoglobulin 고유의 epitope과 완전히 다르며  $\beta$ -lactoglobulin에 대한 특이항체와도 결합하지 않는 새로운 sequential epitope이 만들어진다고 하였다.

따라서 열처리는 단백질의 고차원 구조를 파괴할 수 있지만 단백질의 잠재적 allergenicity까지 낮추는 것은 불가능하다. 반대로 열처리에 의해 단백질 응집물이 형성되면 allergenicity를 오히려 증가시킬 수도 있다. 따라서 가열처리가 우유 단백질의 allergenicity를 줄일 수 있지만 유청 단백질에만 매우 제한적으로 적용할 수 있다. 따라서 우유나 infant formula의 제조에 사용하는 살균처리를 이용해서 hypoallergenic milk 혹은 hypoallergenic infant formula를 제조하는 것은 불가능하다.

3. 효소가수분해

Trypsin, chymotrypsin, pepsin과 같은 endopeptidase와 미생물 유래 단백질 분해효소로 우유 단백질을 가수분해하여 분자량을 작게 하면 항원성과 allergenicity를 크게 낮출 수 있다. 단백질이 가수분해되면 새로운 이온화된 amino group과 carboxyl group이 생성되어 conformational epitope이 붕괴되며, 계속해서 가수분해하면 sequential epitope까지 제거할 수 있다. 아직까지 peptide의 면역원성에 대한 분자량의 한계가 명확하지 않지만 분자량 5,000 dalton 이하의 polypeptide는 약한 면역성을 나타내며 oligopeptide는 면역원성이 없는 것으로 간주되고 있다.

Casein과 유청 단백질은 아미노산의 일차구조가 잘 밝혀져 있기 때문에 trypsin이나 chymotrypsin에 의해 분해될 수 있는 이론적 부위의 수를 계산해 보면 100잔기 당 7~14 부위가 분해될 수 있다. 만약 casein과 유청 단백질에서 모든 부위가 효소에 의해 분해된다면 trypsin 분해 peptide는 평균 약 10개 잔기의 peptide로서 분자량은 800~1,600 dalton의 범위가 될 것으로 추정된다. 면역원성의 관점에서 이와 같은 peptide는 면역원성의 한계 이하이지만 과민반응을 유발할 수 있는 polyvalent antigen도 어느 정도 존재할 수 있다.

Casein은 구조적으로 phosphoserine이 집중된 고도 산성 영역이 비교적 단백질 분해효소에 대하여 저항성이 강한 영역이지만 전체적으로 생체내 단백질 분해효소가 쉽게 접근해서 분해할 수 있기 때문에 우유 단백질의 약 80%를 차지함에도 불구하고 고향원성으로 분류되지 않는다. 그러나 유

표 4. 효소 가수분해에 대한 우유단백질의 분해 특성

Property	Caseins				Whey proteins			
	$\alpha_{S1}$ -CN	$\alpha_{S2}$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN	$\beta$ -LG	$\alpha$ -LA	BSA	IgG
$\Sigma$ residues/mole	199	207	209	169	162	123	582	470/200
Mean residue weight <sup>a</sup>	119	122	115	112	113	115	114	~115
$\Sigma$ lysine, arginine/mole	20	30	15	4	18	12~13	82	nd <sup>b</sup>
Mean molecular weight, tryptic peptide <sup>c</sup>	1,184	842	1,602	4,732	1,017	1,132	809	
Mean molecular weight, tryptic/chymotryptic peptide <sup>d</sup>	592	505	829	1,051	654	577	510	
Hydration(g H <sub>2</sub> O/g protein)	>3		>6		<1	<1	<0.5	nd
Observed <i>in vitro</i> digestibility <sup>e</sup>	High	nd	High	Limited	High	High	Limited	Limited
Formation of plurivalent antigens during tryptic <i>in vitro</i> digestion	+ <sup>f</sup>	nd	+ <sup>f</sup>	nd	+ <sup>g</sup>	- <sup>h</sup>	+++ <sup>i</sup>	+++ <sup>j</sup>

<sup>a</sup> Molecular weight/residue per mole.

<sup>b</sup> nd, not determined.

<sup>c</sup> [ $\Sigma$  residual per mole/ $\Sigma$ (Lys, Arg)] $\times$ mean residue weight.

<sup>d</sup> [ $\Sigma$  residual per mole/ $\Sigma$ (Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe)] $\times$ mean residue weight.

<sup>e</sup> Trypsin pH 8, 40°C, 4 hr.

<sup>f</sup> Precipitating antiprotein antibodies in a quantitative immunoprecipitation test.

<sup>g</sup> Precipitation arc in agar gel.

<sup>h</sup> Pancreatin instead of trypsin.

<sup>i</sup> High-molecular weight antigenic fragments obtained.

<sup>j</sup> Fragments corresponding to Fab, Fab', and Fc.

청 단백질의 경우 endopeptidase로 분해할 때 분해되는 부위의 수는 전체의 이론적인 부위의 수보다 적을 수 있으며, endopeptidase 분해에 대한 단백질의 구조적 저항성은 peptide 단편을 보호하는 disulfide 결합에서 기인하는 것으로 추측하고 있다. 이러한 사실은 disulfide 결합을 17개 가지고 있는 serum albumin에서 더 명확히 확인할 수 있으며, trypsin과 다른 단백질분해효소에 의해 disulfide 결합에서 기인하는 고분자의 항원단편이 만들어진다는 것이 확인되었다(Peters, 1985). Monti 등(1986)은  $\beta$ -lactoglobulin의 trypsin 가수분해 peptide의 항원적 특성을 규명하기 위해서 tosyl-phenylalanine chloromethyl ketone(TPCK) 처리된 trypsin으로  $\beta$ -lactoglobulin을 가수분해한 결과, 이론적인 18개의 가수분해 부위 중에서 11개의 부위가 분해되었으나, 나머지 7개 부위는 매우 낮은 비율로 분해되거나 전혀 분해되지 않았다고 하였다. 그리고 우유 유래 immunoglobulin을 분해하면 항원 결합능력이 있는 Fab- type의 peptide가 생성된다(Fang and Mukkur, 1976).

최적 조건에서 endopeptidase로 globular protein을 가수분해한다고 해도 균일한 분자량의 peptide로 구성된 가수분해물을 만드는 것을 거의 불가능하다. 이러한 결과는 주로 기질 단백질의 구조적 특징에서 기인하며 대표적인 일례가 유청 단백질이다. 그러나 유청 단백질은 효소가 쉽게 접근할 수 있도록 먼저 가열처리나 고압처리하여 단백질을 unfolded protein으로 만들면 더욱더 효과적으로 가수분해시킬 수 있

다. 이와 같은 전처리 이외에도 최근에는 단백질을 효소가 수분해한 이후 membrane filtration 기술을 이용하여 고분자 peptide 혹은 분해되지 않은 항원성 단백질을 효과적으로 제거하여 고도의 다가 항원(polyvalent antigen)성 peptide가 단백질 가수분해물에 혼입되지 못하게 하는 방법도 이용되고 있다.

또한, 단백질이 가수분해되어 peptide화 되면 삼투압이 높아지며 분자량이 작아질수록 삼투압이 더욱더 높아진다. 특히 free amino acid의 비율이 증가하면 단백질 가수분해물의 삼투압이 더욱더 높아진다. 따라서 효소 가수분해에 의한 단백질의 항원성 저감화 기술로서 또 하나의 중요한 것이 free amino acid의 함량이 낮고 면역원성이 없는 균일한 분자량의 peptide로 된 단백질 가수분해물을 생산하는 것이다. Membrane filtration 기술은 단백질 가수분해물에서 free amino acid를 제거하기 위해서도 유용하게 사용되고 있다.

효소 가수분해의 가장 큰 단점은 단백질 가수분해물의 쓴맛이다. 쓴맛은 단백질을 가수분해하는 과정에서 생성되는 bitter peptide에 의해서 생성된다. 쓴맛은 단백질의 종류, 사용한 효소 그리고 가수분해 정도에 따라서 다르며 우유 단백질의 경우 casein 가수분해물이 유청 단백질 가수분해물보다 쓴맛이 강하다. 그러나 최근에는 효소적 방법과 활성탄 여과와 같은 기술을 이용하여 쓴맛이 아주 낮은 가수분해물의 제조가 가능하다.

표 5. 유청단백질 가수분해물의 항원활성

Preparation	Activity RIA <sup>a</sup> ( $\mu$ g $\beta$ -LG/mg)	Precipitation arc(Ouchterlony) <sup>b</sup>			Allergenicity(guinea pig) <sup>c</sup>		
		anti- $\beta$ -LG	anti- $\alpha$ -LA	anti-BSA	Oral sensitization (positive/total)	Eliciting capacity (PCA)	
						A	B
Whey protein concentrate <sup>d</sup>	280±50	+(1/1,024)	+(1/256)	+(1/64)	+(9/9)	+	+
Trypsin-hydrolyzed WPC <sup>e</sup>	~1.0	±(1/1)	-	+(1/8)	-(0/11)	-	-
Heated(20 min/80°C) hydrolysate <sup>f</sup>	0.4~1.0	-	-	-	nd <sup>g</sup>	-	-
Heated(120 sec/125°C) hydrolysate <sup>h</sup>	0.4~1.0	-	-	-	(0/8)	-	-
Ultrafiltrated hydrolysate(permeate) <sup>i</sup>	0.03~0.15	-	-	-	-(0/8)	-	-
Pancreatic hydrolysate(soluble fraction) <sup>j</sup>	0.02~0.10	-	-	-	-(0/8)	-	-
For comparison: human milk whey <sup>k</sup>	0.06~0.10	-	-	+	nd <sup>g</sup>	nd <sup>g</sup>	nd <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Solid-phase RIA(Pahud *et al.*, 1985).

<sup>b</sup> Initial antigen concentration 50 ng/mL.

<sup>c</sup> Guinea pig model described in ref. 26. Donor sera from whey-sensitized animals (A) and from skim-milk-sensitized animals (B)

<sup>d</sup> Essentially undenatured WP produced by ultrafiltration of sweet whey. Protein content 84% total dry solids.

<sup>e</sup> Porcine trypsin(2% weight/weight), pH 7.5, 55°C, 4 hr.

<sup>f</sup> Hydrolysates heated batchwise.

<sup>g</sup> nd: not determined.

<sup>h</sup> Hydrolysate heated continuously.

<sup>i</sup> Hydrolysate ultrafiltrated and diafiltrated on membranes with normal cut-off 10,000; permeate fraction recovered.

<sup>j</sup> Pancreatin(5% weight/weight), pH 7.5, 55°C, 4 hr. Heat coagulation (20 min/80°C), separation of insolubles by deslugger and filtration.

<sup>k</sup> Pool of several wheys dialyzed to remove lactose and salts. Protein: 75% on total dry solids.

## Hypoallergenic Formula(저알레르기 Formula)

### 1. 우유 알레르기 치료용 Hypoallergenic Formula

우유 알레르기를 치료하는 기본적인 효과적 방법은 우유 단백질을 완전히 제거하는 것이다. 유아기와 성인식을 먹을 수 없는 소아 초기의 우유 알레르기 환자는 hypoallergenic formula 대체식이 필요하다. 대체식으로서 soy formula와 산양유가 이용되고 있지만 고분자 항원성 단백질을 함유하고 있는 이러한 대체식은 잠재적으로 알레르기를 일으킬 수 있다. Soy formula도 적어도 우유 단백질만큼 알레르기를 일으킬 수 있으며, 소아 초기에 soy protein 알레르기 발생비율은 17~47%로 보고되고 있다(Host 등, 1999; Zeiger 등, 1999). 따라서 일반적으로 soy formula는 우유 알레르기 환자에게 권장되지 않는다. 그리고 대부분의 산양유 단백질은 우유 단백질과 거의 같다. 따라서 우유 알레르기 환자는 산양유에 처음 노출되어도 반응할 수 있으며 산양유는 우유 알레르기 환자에게 권장되지 않아야 한다.

이미 가수분해 casein을 단백질원으로 상업적인 hypoallergenic formula가 개발되어 이용되고 있으며, 임상시험에서 우유 알레르기 환자의 치료용으로 안전한 것으로 보고되고 있다(Sampson 등, 1991; Suzanne 등, 2002). 그리고 유청 단백

질 가수분해물을 이용한 hypoallergenic formula도 이용되고 있으며, casein hydrolysate formula 만큼 안전한 것으로 보고되고 있다(Halken 등, 1993; Businco 등, 1993; Host 등, 1999). 고도로 가수분해한 단백질로 만든 formula(extensively hydrolyzed formula, EHF)는 우유 알레르기 아기의 치료에 권장되고 있다. 미국에서는 약 60년간 이상 casein hydrolysate formula가 우유 알레르기 아기에게 광범위하게 사용되어 왔으며, 이러한 제품을 “hypoallergenic formula”라고 한다. EU에서는 1993년 다음과 같이 “hypoallergenic formula” 혹은 “hypoantigenic formula”의 기준을 정하였다(Commission of the European Community, 1993).

1. 단백질은 SDS-PAGE, immunodiffusion, ELISA, RIA 및 다른 이에 상응하는 감도의 방법으로 분석하여 면역 반응 단백질의 양을 formula 중 질소 함유 물질의 1% 이하로 유지하여야 한다.
2. 단백질의 아미노산 조성이 적절하여야 한다.
  - ① Chemical index는 적어도 모유단백질의 80%
  - ② 아미노산 조성이 모유단백질과 적어도 같아야 함
  - ③ Protein efficiency coefficient(PER)과 net protein utilization(NPU)가 적어도 casein과 같아야 함
3. 임상시험을 실시하기 전에 실험동물을 이용한 provocation test에서 감작능력이 없는 것이 증명되어야 한다.



4. 임상시험 결과, 95%의 신뢰구간에서 알레르기 아기의 90% 이상이 단백질 가수분해물에 대해 관용을 나타낸다는 것이 증명되어야 한다.

**2. 우유 알레르기 예방을 위한 Hypoallergenic Formula**

아직까지 우유 알레르기 예방을 위한 hypoallergenic formula에 대한 기준은 없지만 상업적으로 판매되고 있는 우유 알레르기 예방용 formula는 부분적으로 가수분해한 단백질 (partial protein hydrolysate)로 제조하기 때문에 아주 낮은 알레르기 활성을 가지고 있다(Vandenplas 등, 1992). 이와 같은 formula는 알레르기 고위험 가족에서 태어난 신생아 혹은 제대혈 검사에서 알레르기 소인이 있는 것으로 진단된 신생아에게 알레르기를 예방하거나 알레르기 발생을 지연시킬 목적으로 개발되었다. AAP(2000)는 알레르기를 예방하거나 지연용으로 부분적으로 가수분해한 단백질로서 제조한 formula(partial hydrolysate formula, PHF)를 수유한 유아는 우유로 만든 formula를 수유한 유아에 비해서 통계적으로 유의하게 알레르기 발생 빈도를 낮출 수 있어야 한다고 하였다.

한국에서도 PHF를 고위험 유아를 대상으로 6개월간 수유한 결과, 아토피성 피부염의 누적 발생율과 발생 빈도가 standard formula에 비해서 통계적으로 유의하게 감소하였고, 그리고 흥미로운 것은 PHF 수유가 모유 수유보다 아토피성 피부염의 누적 발생율과 발생 빈도가 낮게 나타난 것이다. 또한, 알레르기 발생 지연 효과도 PHF가 standard formula와 모유 수유보다 좋은 것으로 보고된 바 있다(Han 등, 2003).

표 6. 고위험 우유 알레르기 유아에 대한 PHF의 임상적 효과\*

	PHF group	SF group	BM group
Total number (male/female)	15(5/10)	32(17/15)	22(10/12)
Parent's serum total IgE (kU/L)	412(200~2,000)	293(200~981)	303(200~831)
Number of AD parents	7	25	15
Onset age (month)	2.9±2.1	1.8±1.5	1.8±1.2
SASSAD score at month	2.0±1.0	5.3±3.4	4.2±4.3

\* Data from Han *et al.*(2003).

<sup>1)</sup> Onset age and SASSAD score were expressed as mean±standard deviation.

<sup>2)</sup> Total serum IgE was expressed as geometric mean with range in the parentheses.

<sup>3)</sup> PHF group, partially hydrolyzed formula group; SF group, standard formula group; BM, breast milk feeding group.

<sup>4)</sup> AD: atopic dermatitis.

<sup>5)</sup> SASSAD: six area, six symptoms in atopic dermatitis.

그렇지만 우유 알레르기 고위험군에 속하는 아기에게는 안전성을 고려하여 EHF를 신생아부터 수유하는 것이 알레르기 발병의 지연뿐만 아니라 근본적으로 예방할 수 있는 방법일 것이다.

**참고문헌**

1. AAP. 2000. Committee on nutrition. Hypoallergenic infant formulas. *Pediatr.* 106:346.
2. Adams, S. L., Barnett, D., Walsh, B. J., Pearce, R. J., Hill, D. J. and Howden, M. E. 1991. Human IgE-binding synthetic peptide of bovine  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. *In vitro* cross-reactivity of the allergens. *Immunol. Cell Biol.* 69:191.
3. Bernard, H., Creminon, C., Yvon, M. and Wal, J. M. 1998. Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 115:235.
4. Bernard, H., Meisel, C., Creminon, C. and Wal, J. M. 2000. Post-translational phosphorylation of the IgE binding capacity of caseins. *FEBS Letters* 467:239.
5. Bleumink, E. and Berren, L. 1966. Synthetic approaches to the biological activities of  $\beta$ -lactoglobulin in human allergy to cow's milk allergy. *Nature.* 212:541.
6. Bleumink, E. and Young, E. 1968. Identification of the atopic allergen in cow's milk. *Int. Arch. Allergy.* 34:521.
7. Brownlow, S., Morraiz Cabral, J. H. and Cooper, R. 1997. Bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 1.8Å resolution-still an enigmatic lipocalin. *Structure.* 481:495.
8. Businco, L., Dreborg, S., Einarsson, R., Giampietro, P. G., Host, A. and Keller, K. M. 1993. Hydrolysed cow's milk formulae. Allergenicity and use in treatment and prevention. An ESPACI position paper. *Pediatr. Allergy Immunol.* 4:101.
9. Commission on the European Communities. 1993. Reports of the scientific committee for food(28th series). Reports on infant formulae claimed to be hypoallergenic or hypoantigenic.
10. Fang, W. D. and Mukkur, T. K. J. 1976. Physicochemical characterization of proteolytic cleavage fragments of bovine colostrum immunoglobulin G1. *Biochem. J.* 155:25.
11. Freier, S., Kleter, B., Gery, I. and Geifman, Lebenthal E. 1969. Intolerance to milk protein. *J. Pediatr.* 75:623.
12. Goldman, A. S., Sellar, W. S., Halpern, S. R., Anderson, D. W., Furlow, T. E. and Johnson. 1963. Milk allergy. II. Skin testing of allergic and normal children with purified milk

- proteins. *Pediatr.* 32:572.
13. Gjesing, B., Osterballe, O., Schwartz, B., Wahn, U. and Lowenstein, H. 1986. Allergen-specific IgE antibodies against components in cow's milk and substitute. *Allergy.* 41:51.
  14. Halken, S., Host, A., Hansen, L. G. and Osterballe, O. 1992. Effect on an allergy prevention programme on incidence of atopic symptoms in infancy. A prospective study of 159 "high risk infants. *Allergy.* 47:545.
  15. Han, Y. S., Park, H. Y., Ahn, K. M., Lee, J. S., Choi, H. M., and Lee, S. I. 2003. Short-term effect of partially hydrolyzed formula on the prevention of development of atopic dermatitis in infants at high risk. *J. Kor. Med. Sci.* 18:547.
  16. Heppel, L. M., Cant, A. J. and Kilshaw. 1984. Reduction in the antigenicity of whey proteins by heat treatment: a possible strategy for producing a hypoallergenic infant milk formula. *British J. Nutr.* 51:29.
  17. Host, A., Koletzko, B., Dreborg, S., Muraro, A., Wahn, U., Aggett, P., Bresson, J. L., Hernell, O., Lafeber, H., Michaelsen, K. F., Micheli, J. L., Rigo, J., Weaver, L., Heymans, H., Strobel, S. and Vandenplas, Y. 1999. Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. Joint statement of the European Society for Pediatric Allergy and Clinical Immunology(ESPACI) Committee on Hypoallergenic Formulas and European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition(ESPGHAN) Committee on Nutrition. *Arch. Dis Child.* 81:80.
  18. Kilshaw, P. J., Heppel, L. M. and Ford, J. E. 1982. Effect of heat treatment of cow's milk and whey on the nutritional quality and antigenic properties. *Arch. Dis. Child.* 57:842.
  19. Kuitunen, P., Visakorpi, J. K., Savilahti, E. and Pelkonen, P. 1975. Malabsorption syndrome with cow's milk intolerance. Clinical findings and course in 54 cases. *Arch. Dis. Child.* 50:351.
  20. Lebenthal, E. 1975. Cow's milk protein allergy. *Pediatr. Clin. North Am.* 22:827.
  21. Martin, P., Brignon, G., Furet, J. P. and Leroux, C. 1996. The gene encoding  $\alpha_{s1}$ -casein is expressed in human epithelial cells during lactation. *Lait.* 76:523.
  22. Monti, J. C., Jost, R., Pahud, J. J. and Hughes, G. 1886. Antigenic sites in bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Abstr Experimentia.* 42:670.
  23. Otani, H. and Hosono, A. 1987. Location of antigenic sites in a browning products between  $\beta$ -lactoglobulin and lactose. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 58:474.
  24. Otani, H., Morita, S. and Tokita, F. 1984. Antigenic reactivity of S-carboxymethylated  $\beta$ -lactoglobulin with antiserum to  $\beta$ -lactoglobulin from UHT processed milk. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 55:287.
  25. Otani, H., Morita, S. and Tokita, F. 1985. Studies on the antigenicity of browning product between  $\beta$ -lactoglobulin and lactose: Antigenic activities of peptides 25-61 and 62-107. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 56:341.
  26. Otani, H. and Tokita, F. 1982. Contribution of the sugar moiety in the browning products between  $\beta$ -lactoglobulin and lactose as a antigenic determinant. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 53:344.
  27. Pahud, J. J., Monti, J. C. and Jost, R. 1985. Allergenicity of whey protein: its modification by tryptic *in vitro* hydrolysis of the protein. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4:408.
  28. Peters, T. H. 1985. Serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 37:161.
  29. Sampson, H. A., Bernhisel-Broadbent, J., Yang, E. and Scanlon, S. M. 1991. Safety of casein hydrolysate formula in children with cow milk allergy. *J. Pediatr.* 118:520.
  30. Terheggen-Largo, S. W., Khouw, I. M., Schaafsma, A. and Wauters, E. A. 2002. Safety of new extensively hydrolyzed formula in children with cow's milk protein allergy: a double blind crossover study. *BMC Pediatr.* 2:10.
  31. Vandenplas, Y., Hauser, B., Van den Borre, C., Sacre, L. and Dab, I. 1992. Effect of a whey hydrolysate prophylaxis of atopic disease. *Ann. Allergy.* 68:419.
  24. Zeiger, R. S., Sampson, H. A., Bock, S. A., Burk, A. W. Jr and Noones, Harden K. 1999. Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow's milk allergy. *J. Pediatr.* 134:614.