

우유단백 항원의 열처리 및 가수분해에 따른 단백질 분포와 항원성 변화

이희선^{1,2,*}, 김미나^{1,2,3,*}, 홍정연^{1,2,3}, 허원일^{1,2,3}, 김경원^{1,2}, 손명현^{1,2,3,4}, 김규언^{1,2,3}, 이경은^{1,2,3,4}, 박중원^{2,3,5}연세대학교 의과대학 ¹소아과학교실 · ²알레르기 연구소 · ³Brain Korea 21 플러스 의학사업단 · ⁴의생명과학부 · ⁵내과학교실

The effect of heat treatment or hydrolysis on cow's milk protein distributions and antigenicities

Hee Seon Lee^{1,2,*}, Mi Na Kim^{1,2,3,*}, Jung Yeon Hong^{1,2,3}, Won Il Heo^{1,2,3}, Kyung Won Kim^{1,2}, Myung Hyun Sohn^{1,2,3,4}, Kyu-Earn Kim^{1,2,3}, Kyung Eun Lee^{1,2,3,4}, Jung-Won Park^{2,3,5}¹Department of Pediatrics, ²Institute of Allergy, ³Brain Korea 21 Plus Project for Medical Science, ⁴Biomedical Science Institute, ⁵Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Cow's milk protein is one of the most common and strongest food allergen. We investigated the effects of heat treatment on the distribution and antigenicities of major allergens from cow's milk. We also compared the protein distribution and antigenicities among cow's milk formula and its substitutes.

Methods: We heated α -casein, β -lactoglobulin (BLG), α -lactalbumin (ALA), and crude extract of cow's milk in 100°C boiling water for 1 hour. We prepared crude extracts from cow's milk formula, partially hydrolyzed milk formula (pHF) and extensively hydrolyzed milk formula (eHF). The protein compositions of all the samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The antigenicities were determined by IgE immunoblotting with pooled serum collected from 11 patients with milk allergy.

Results: After heating, no significant alteration was found in casein, and the aggregates of ALA and BLG were detected with molecular weights of about 30 and 45 kDa, respectively. The antigenicities of newly detected aggregates were increased. The new aggregates of BLG with increased antigenicities were also found in heated milk total protein. Major milk allergens were not found in pHF, and residual components with a molecular weight below 10 kDa did not show IgE-binding activity. We failed to observe the residual components and antigenicities of eHF.

Conclusion: Changes in protein distribution and antigenicity of milk total protein induced by heat treatment may not be significantly different from those of each major allergen. The residual components of pHF could have little IgE-binding capacity, and there may be few or no antigenic components in eHF. (*Allergy Asthma Respir Dis* 2014;2:259-265)

Keywords: Milk protein, Heating, Hydrolysis, Antigenicity

서론

우유는 영양가가 높은 완전식품으로 모유수유만 하는 경우를 제외하고는 사람이 가장 처음 접하게 되는 주된 영양 공급원이나, 항원성(antigenicity)이 강해서 식품알레르기 환자에서 알레르기 증상을 유발하는 주요한 원인 식품 중의 하나이다.¹⁾ 우유 알레르기

는 2세 미만 소아에서 1%~3%의 발생률을 보이며, 증상은 두드러기, 구토, 설사, 아토피피부염, 혈관부종 등에서부터 생명을 위협하는 심각한 анафилакти시스에 이르기까지 다양하다.²⁾ 대부분 1세 이전에 발생하여 5세 이전에 호전된다고 알려져 있으나,²⁻⁴⁾ 최근 우유 알레르기 증상 호전의 속도는 더 느려지고 있으며,⁵⁾ 15%~46%의 환자들이 학동기 이후에도 증상이 지속되는 것으로 보고되었다.⁵⁻⁷⁾

Correspondence to: Kyung Eun Lee

Department of Pediatrics and Institute of Allergy, Biomedical Science Institute, Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel: +82-2-2228-0750, Fax: +82-2-2227-8129, E-mail: KELEE616@yuhs.ac

*These authors contributed equally to this study and should be considered co-first authors.

• This study was supported by a grant from the Korea Healthcare Technology R&D Project, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea (A092076).

Received: November 8, 2013 Revised: April 8, 2014 Accepted: April 14, 2014

© 2014 The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease
The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

또한 유병률이 지속적으로 증가 추세를 보여 우유 알레르기에 대한 관심과 연구가 더욱 중요해지고 있다.⁸⁾

우유단백(cow's milk proteins)은 약 80%의 카제인(casein)과 20%의 유청 단백질(whey protein)으로 이루어져 있으며, 유청 단백질에는 β -lactoglobulin (BLG)과 α -lactalbumin (ALA), immunoglobulin, bovine serum albumin 등이 있다.¹⁾ 이들 중 주요 항원으로 알려져 있는 단백질은 casein, BLG, ALA 등이며, 대부분의 우유 알레르기 환자에서 적어도 2가지 이상의 항원에 대한 특이 IgE 항체가 존재하는 것으로 보고되어 있다.^{1,9,10)} 특히 casein은 전체 우유단백의 약 80%를 차지하는 진단적 가치가 높은 성분항원이며, 우유단백을 가열하였을 때 casein은 비교적 열에 안정적인 반면 BLG과 ALA은 불안정하여 변성이 일어나고 이는 항원성의 변화와 연관이 있다.^{11,12)} 실생활에서 우유는 그 자체로 섭취하기도 하지만 여러 식품들 내에 가열 상태로 존재하는 경우가 많다. 하지만 가열에 의한 변성이 반드시 항원성의 감소를 유발하는 것은 아니며, 열의 온도, 시간 및 단백질끼리의 상호작용에 따라 차이가 발생할 수 있다.^{11,13,14)} 따라서 특정한 가열 조건마다 단백질 분포의 변화를 확인하는 것이 필요하며, 각각의 우유단백을 따로 가열하는 경우와 단백질들이 같이 존재할 때 열처리 변화가 달라질 수 있다.^{11,13)}

우유단백을 가수분해하면 분자량이 작은 단백질들로 잘게 분해되면서 항원성이 감소하며,^{13,15)} 이를 이용하여 우유단백 가수분해물을 이용한 특수분유들이 제조되고 있다. 특수분유는 가수분해의 정도에 따라 완전 가수분해 분유(extensively hydrolyzed cow's milk formula)와 부분 가수분해 분유(partially hydrolyzed cow's milk formula), 가장 저항원성을 가지고 있는 아미노산 분유(amino acid-based formula)로 나눌 수 있다. 부분 가수분해 분유의 경우 예방 목적으로만 권고되고 있으며, 완전 가수분해 분유와 아미노산 분유의 경우 항원성을 극소화시켜 우유 알레르기 환자에게 치료 목적으로 사용된다.^{16,17)} 그러나 몇몇 보고들에 의한 것처럼 완전 가수분해 분유도 알레르기반응을 유발할 가능성을 완전히 배제할 수는 없다.^{18,19)} 또한 인종이나 특정 집단에 따라 가수분해한 우유단백에 대한 감수성의 차이가 존재할 수 있다.¹⁷⁾

본 연구에서는 열처리에 따른 우유단백의 변화를 분석하기 위해 α -casein, BLG, ALA 각각의 단백질과 우유에서 추출한 total protein의 열처리 전후 단백질 분포와 IgE 반응성의 변화를 확인하였으며, 국내 시판 중인 일반 조제분유와 완전 가수분해 및 부분 가수분해 분유의 단백질 분포 및 IgE 반응성을 비교하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 조항원의 제조

시중에서 판매되고 있는 우유 중 120°C–150°C에서 2초간 살균한 고온살균우유(ultra-high-temperature pasteurized milk)와 65°C

에서 30분 살균한 저온살균우유(low-temperature pasteurized milk)를 사용하였으며, 분유는 일반 분유, 완전 가수분해 분유, 부분 가수분해 분유를 사용하였다. 우유와 분유들은 각각 1:4 비율로 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)과 섞고, 4°C에서 48시간 동안 교반시켰다. 이 용액을 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 다시 한 번 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 한 후 상층액을 취하고 여과지를 사용하여 부유물질을 제거하였다. 이렇게 얻은 단백질 용액은 dialysis membrane을 사용하여 4°C에서 2일 동안 하루에 3번 dialysis buffer를 교환하며 투석하였다. 투석이 끝난 후 동결건조하고 사용 전까지 -20°C에서 보관하였다. Bovine milk의 α -casein, BLG, ALA은 모두 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

2. 항체

본 연구에 사용된 IgE 항체는 우유 알레르기 환자들의 혈청을 이용하였다. 우유 알레르기가 확진된 환자들 중 UniCAP (Pharmacia-Upjohn; Uppsala, Sweden)을 이용하여 측정된 혈청 우유 특이 IgE 항체 농도가 높은 환자 11명을 대상으로 하였다(Table 1). 이들 혈청으로 pooled serum을 만들고 1:10으로 희석하여 IgE Immunoblotting에 사용하였다.

3. 열처리

우유단백을 직접 열처리 하기 위해 α -casein, BLG, ALA과 고온 살균우유에서 추출한 total protein을 각각 1 mg/mL 농도로 튜브에 400 μ L씩 넣고 heat block을 사용하여 100°C에서 1시간 동안 가열하였다. 또한 100 mL의 고온살균우유를 먼저 100°C에서 1시간 중탕하여 끓인 후, 가열처리 한 우유에서 위 조항원 제조방법에 따라 total protein을 추출하였다(total protein after boiling).

Table 1. Clinical characteristics of 11 subjects with milk sensitization

No	Sex	Age (yr)	Diagnosis	Total IgE (kU/L)	Milk-specific IgE (kU/L)
1	F	8.12	Atopic dermatitis, food allergy	1,110	73.2
2	F	3.32	Atopic dermatitis, food allergy	1,465	>100
3	F	3.54	Atopic dermatitis, food allergy	1,594	47.8
4	M	2.98	Atopic dermatitis, food allergy	630	80.0
5	M	3.56	Atopic dermatitis, food allergy	310	44.9
6	M	3.43	Atopic dermatitis, food allergy	789	46.0
7	M	4.61	Atopic dermatitis, food allergy	662	49.5
8	M	0.94	Atopic dermatitis, food allergy, asthma	148	37.7
9	M	3.55	Atopic dermatitis, food allergy	1,021	25.5
10	M	0.72	Atopic dermatitis, food allergy	308	40.3
11	M	1.70	Asthma, food allergy	1,950	46.9

4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

각각의 시료들에 loading buffer (60mM Tris-HCl, 25% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate [SDS], 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 첨가한 후, 95°C 이상에서 5분간 반응시켰다. 10% 또는 13.5% polyacrylamide gel에 준비된 시료들을 loading한 후 50/180 V에서 전기영동을 실시한 뒤, coomassie blue로 염색하여 단백질 항원들의 분포를 비교 분석하였다.

5. IgE immunoblotting

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE)를 통해 단백을 분리하고 전기영동이 끝난 gel은 전사 장치를 이용하여 polyvinyl-difluoride (PVDF) membrane으로 전사시킨 후 skim milk가 포함된 PBS 용액으로 실온에서 2시간 blocking 하였다. 우유 알레르기 환자들의 혈청으로 만든 pooled serum을 1:10 희석하여 membrane과 함께 overnight 반응시켰다. 발색을 위해 alkaline phosphatase conjugated human IgE (1:1,000 희석)를 실온에서 2시간 반응시켰으며 각 단계에서 다음 단계로 넘어 갈 때는 0.1% tween을 포함하는 PBS로 세척해 주었다. 마지막으로 발색시약을 통해 IgE 결합 반응 단백띠들을 시각화 하였다.

결 과

1. 우유단백의 분포와 IgE 항체 반응성

고온살균우유에서 추출한 total protein과 따로 구입한 α -casein, BLG, ALA에 대해서 SDS-PAGE 및 immunoblotting을 시행하였다. SDS-PAGE 결과, 실험실에서 추출한 total protein 내에 α -casein, BLG, ALA이 모두 포함되어 있는 것을 확인하였으며, 그 외 다양한 크기의 단백질도 함께 분포하는 것이 관찰되었다(Fig. 1). 우유 알레르기 환자 11명의 혈청으로 만든 pooled serum을 이용하여 immunoblotting한 결과, 우유의 α -casein, BLG, ALA 해당 부위에서 강한 IgE 결합이 관찰되었으며, 그 외 SDS-PAGE에서 확인하였던 나머지 단백질에서도 IgE 반응을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

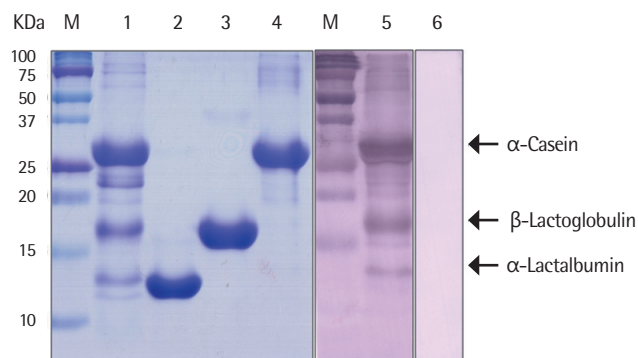


Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblot analysis of milk proteins. M, molecular weight marker. Lane 1: milk total protein; Lane 2: purified α -lactalbumin; Lane 3: purified β -lactoglobulin; Lane 4: purified α -casein; Lane 5: IgE immunoblot of milk total protein with patients serum; Lane 6: IgE immunoblot of milk total protein with control buffer.

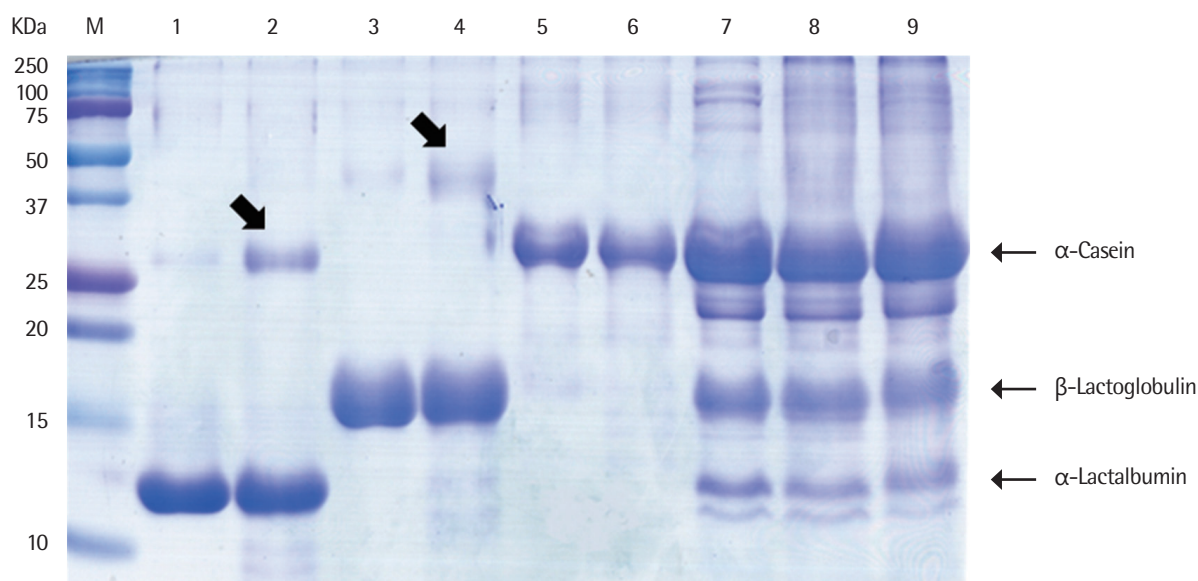


Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of heat treated milk proteins. After heating, The 30 kDa band of ALA and the 45 kDa band of BLG were increased in intensity (arrows). M, molecular weight marker. Lane 1: α -lactalbumin; Lane 2: heat treated α -lactalbumin; Lane 3: β -lactoglobulin; Lane 4: heat treated β -lactoglobulin; Lane 5: α -casein; Lane 6: heat treated α -casein; Lane 7: milk total protein; Lane 8: heat treated milk total protein; Lane 9: milk total protein after boiling.

2. 열처리에 의한 우유단백의 분포 변화

고온살균우유에서 추출한 total protein 및 따로 구입한 α -casein, BLG, ALA를 열처리하고, 고온살균우유를 먼저 열처리한 후 total protein을 추출하여(total protein after boiling) SDS-PAGE를 통해 열처리 전후 단백질의 변화를 확인 및 비교 분석하였다(Fig. 2). 각 단백질의 주요 밴드에서는 약간의 degradation 정도만 확인할 수 있을 뿐 큰 변화를 확인할 수 없었으나, ALA의 약 30 KDa과 BLG의 약 45 KDa의 분자량에 해당하는 부위에 아주 열게 관찰되었던 단백질이 가열 처리 후 진해져 분명하게 관찰되었다(arrows). 반면 α -casein의 경우, 1시간의 가열 처리에도 단백질의 변화를 거의 확인할 수 없었다. Total protein의 경우, 우유를 1시간 가열처리 한 후 단백질을 추출한 것과 우유의 추출 단백질을 직접 1시간 동안 가열처리 한 것의 차이는 거의 관찰할 수 없었고, 두 단백질 모두에서 30 KDa 이상 크기의 단백질에서 degradation이 확인되었다. 단백질을 직접 가열하였을 때 BLG에서 관찰할 수 있었던 약 45 KDa의 단백질은 total protein의 가열처리 후에도 유사하게 확인할 수 있었으며, ALA 가열 후 나타난 약 30 KDa의 단백질은 total protein 가열처리 결과에서 α -casein의 분자량 위치와 겹쳐서 정확히 관찰되지는 않았다.

3. 열처리에 의한 우유단백의 IgE 항체 반응성 변화

가열처리 후 우유단백의 IgE 혈청 반응성이 어떻게 변화하는지를 확인하기 위해 immunoblotting을 시행하였다(Fig. 3). 그 결과 ALA의 경우 가열처리 후 원래 분자량에 해당하는 단백질과의 반응은 다소 약해졌으나 BLG는 크게 변화 없었고, SDS-PAGE상에서 가열처리에 의해 더 진하게 관찰된 단백질들은 환자혈청 내 IgE 결

합에 있어서도 강한 반응을 나타내었다(arrows). α -casein의 경우 가열 처리 전후의 반응 차이를 거의 확인할 수 없었고, milk total protein의 경우 열처리 하였을 때 30 KDa 위쪽 부근에서 관찰되었던 단백질들은 IgE 항체 결합이 열처리 하기 이전보다 약간 더 강해졌음을 확인하였다.

4. 우유 및 분유 종류에 따른 단백질 분포의 비교

우유 및 분유에서 추출한 단백질을 동일한 무게로 맞춘 후 시료를 만들어 SDS-PAGE를 시행하였다(Fig. 4). 우유의 total protein에서

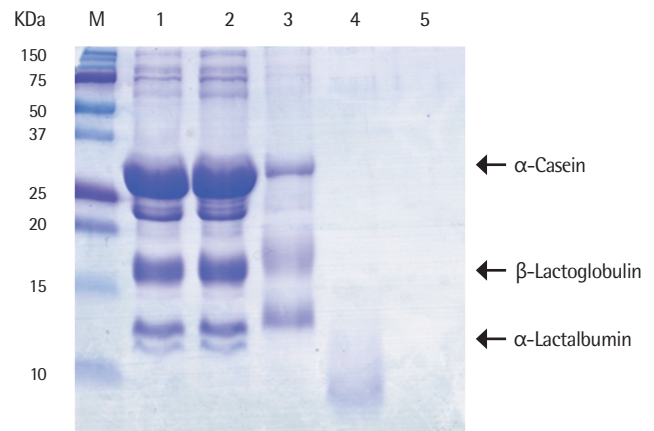


Fig. 4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of milk proteins. M, molecular weight marker. Lane 1: ultra-high-temperature pasteurized milk; Lane 2: low-temperature pasteurized milk; Lane 3: cow's milk formula; Lane 4: partially hydrolyzed cow's milk formula; Lane 5: extensively hydrolyzed cow's milk formula.

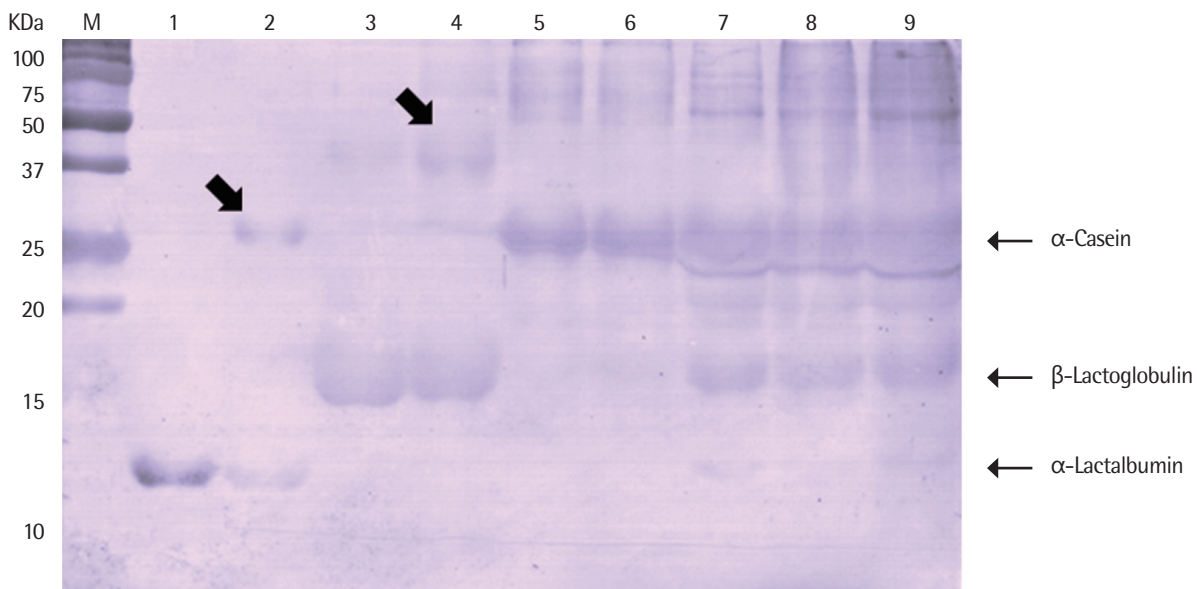


Fig. 3. IgE immunoblot analysis of heat treated milk proteins. M, molecular weight marker. After heating, the 30 KDa band of ALA and the 45 KDa band of BLG were increased in intensity (arrows). Lane 1: α -lactalbumin; Lane 2: heat treated α -lactalbumin; Lane 3: β -lactoglobulin; Lane 4: heat treated β -lactoglobulin; Lane 5: α -casein; Lane 6: heat treated α -casein; Lane 7: milk total protein; Lane 8: heat treated milk total protein; Lane 9: milk total protein after boiling.

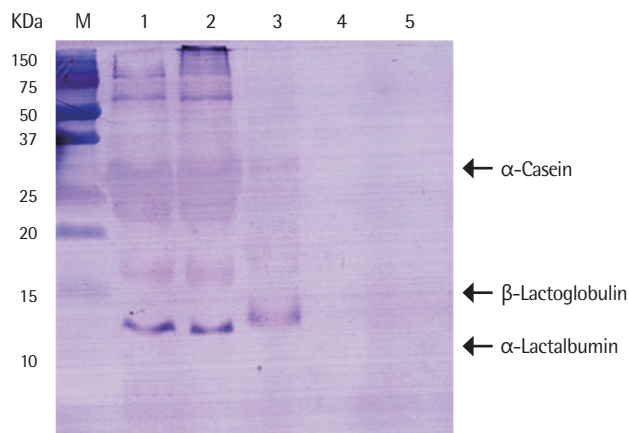


Fig. 5. Immunoblot analysis of milk proteins. M, molecular weight marker. Lane 1: ultra-high-temperature pasteurized milk; Lane 2: low-temperature pasteurized milk; Lane 3: cow's milk formula; Lane 4: partially hydrolyzed cow's milk formula; Lane 5: extensively hydrolyzed cow's milk formula.

우유의 대표 알레르겐인 α -casein, BLG, ALA를 포함하는 다양한 단백질이 관찰되었고 저온살균우유와 고온살균우유의 단백질은 차이가 없음을 확인하였다. 분유의 경우 일반 분유(cow's milk formula)에서는 우유에서와 같이 α -casein, BLG, ALA의 분명한 단백질이 관찰되었다. 그러나 부분 가수분해 분유(partially hydrolyzed cow's milk formula)에서는 이에 해당하는 단백질을 확인할 수 없었고, 대신 10 KDa 부근에서 넓게 퍼져있는 단백질들이 관찰되었다. 완전 가수분해 분유(extensively hydrolyzed cow's milk formula)의 경우 추출된 단백질을 거의 관찰할 수 없었다.

5. 우유 및 분유 종류에 따른 IgE 항체 반응성 비교

여러 우유 및 분유의 IgE 항체 반응을 비교하기 위해 앞서 SDS-PAGE를 통해 단백질을 분리한 것들을 PVDF membrane으로 전사시킨 후 IgE immunoblotting을 시행한 결과(Fig. 5), SDS-PAGE에서 분포를 확인하였던 거의 모든 단백질에서 IgE 항체 반응을 확인할 수 있었다. 그러나 부분 가수분해 분유의 경우 SDS-PAGE에서 확인되었던 10 KDa 부근에 위치한 단백질들이 IgE immunoblot에서는 IgE 혈청 반응을 보이지 않았다. 완전 가수분해 분유의 경우 추출된 단백질이 거의 없어 IgE 반응성도 거의 관찰할 수 없었다.

고 찰

우유에 포함되어 있는 단백질 중 casein과 유청단백의 일종인 BLG, ALA는 우유 알레르기의 원인이 되는 주요 항원으로, 실제로 피부 시험 결과 양성을 보이거나 경구 유발 시험에 의해 증상이 발생하는 것은 주로 casein과 BLG에 의한 것으로 알려져 있다.^{1,20)} 본 연구에서 우유에서 추출한 total protein으로 우유 알레르기 환자 11명의 혈청을 이용하여 immunoblotting을 한 결과 α -casein, BLG, ALA

에 해당하는 부위에 강한 반응을 보였다. 따라서 α -casein, BLG, 그리고 ALA이 실제 우유 알레르기 환자의 혈청 IgE와 결합하는 항원성을 가지고 있음을 확인하였다.

열처리가 식품단백의 항원성에 미치는 영향은 항원의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있다. 열을 가함으로써 항원의 구조, 기능, 소화율 등에 변화가 일어나 항원성이 감소할 수 있지만, 변화가 없거나 오히려 항원성이 증가하기도 한다.^{14,21)} 땅콩의 주요 항원인 Ara h 2의 경우 열처리를 했을 때 일어나는 당화반응(glycation)으로 인해 오히려 항원성이 강해지는 것으로 알려져 있으며,^{22,23)} 반면에 쌀을 100°C 이상의 고열에서 60분간 조리하였을 때에는 IgE 반응성이 거의 사라졌고 실제 쌀알레르기 환자에서도 증상을 유발하지 않는 결과를 보였다.²⁴⁾ 우유단백의 경우, 유청단백은 열에 불안정한 반면 casein은 광범위한 가열에도 항원성을 유지하는 것으로 알려져 있다.^{9,25)} 본 연구에서는 우유단백의 구조와 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 대표적인 우유단백 3가지를 모두 100°C에서 1시간 동안 중탕으로 열처리하였다. 저자들이 시행한 예비연구에서 3가지 우유단백을 100°C 중탕으로 열처리하며 시간에 따른 단백질 분포의 변화를 살펴본 결과, 최소 1시간 가열하였을 때 단백질 분포의 변화가 나타났으며 이전까지 특별한 변화가 관찰되지 않았다. 또한 우유를 중탕하지 않고 직접 가열하는 경우 응고 변화 때문에 정확한 실험을 진행할 수 없었다. 따라서 각각의 단백질과 total protein의 열처리 변화를 비교하기 위해 1시간 중탕하는 방법을 사용하였다. 실제 우유를 1시간 가열하여 그대로 섭취하는 경우는 거의 없으나, 가공식품에 가열 상태로 존재하거나 요리에 사용하게 되는 경우를 고려할 때, 본 연구가 비교적 고열에서 장시간 가열 후 변화를 관찰했다는 점에서 의미를 찾을 수 있다.

Alpha-casein의 경우 1시간의 가열 처리에도 단백질의 변화를 거의 확인할 수 없었으며, 알려진 대로 가열 처리 전후의 IgE 반응성에도 차이를 보이지 않았다. 열에 안정한 casein의 특성과 관련하여, heated milk에 알레르기 증상을 보이는 환자군에서 casein에 대한 특이 IgE 항체 농도가 높게 나타나며, 혈청 casein 특이 IgE를 측정하는 것이 heated milk에 대한 환자의 알레르기 반응 여부를 예측하는데 유용하다는 최근 보고들이 있다.^{26,27)} Casein과는 달리 열에 불안정하다고 알려진 BLG과 ALA는 열처리 후 주요 밴드에서 거의 변화를 확인할 수 없었고 ALA의 경우 30 KDa, BLG의 경우 45 KDa 부위의 단백질이 가열 처리 후 오히려 진해진 것이 관찰되었다. IgE 반응성 변화는 ALA의 원래 분자량에 해당하는 단백질과의 반응은 다소 약해진 것처럼 보이나 BLG는 크게 변화 없었고, 가열처리에 의해 더 진하게 관찰되던 단백질들은 IgE와의 반응에 있어서도 비교적 강한 결합을 나타내었다. Total protein을 가열하였을 때에도 ALA와 BLG의 원래 분자량에 해당하는 단백질 분획의 변화가 거의 보이지 않았으며, BLG을 따로 가열하였을 때 보였던 진해진 단백질 분획이 유사하게 관찰되었다. ALA를 가열하였을 때 발

생한 단백질은 α -casein과 겹쳐 정확히 관찰되지 않았으며, SDS-PAGE 및 IgE immunoblotting의 특성상 비슷한 분자량의 단백질 분획을 정확히 구분할 수 없는 단점이 있어 차이 유무를 단정짓기는 어렵다. 하지만 우유단백을 구성하는 각각의 성분항원들의 열에 의한 변화와 total protein으로 존재할 때의 열에 의한 변화는 100°C 1시간 중탕에서 큰 차이가 없는 것으로 추측할 수 있다. BLG과 ALA는 casein에 비해 열에 취약하다고 알려져 있는데, 연구들에 따르면 약 80°C-100°C에서 15분간 가열하였을 경우 BLG의 IgE 반응성이 감소하였다고 보고하였다.^{28,29)} 그러나 한편에서는 50°C에서 90°C까지는 오히려 ALA와 BLG의 항원성이 증가하다가 90°C보다 높아지면 급격히 감소하는데, 이는 50°C-90°C 사이에서 단백질 입체 구조(conformational structure)가 변하면서 항원성을 가진 항원결정기(epitope)가 노출되기 때문으로 설명하고 있다.^{30,31)} 또한 90°C에서 30분간 가열한 BLG가 동물 실험에서 장점막에 더 심한 면역반응을 일으켰다는 보고도 있다.³¹⁾ 따라서 우유단백의 구조와 항원성에 열처리가 미치는 영향을 한마디로 정의하기는 어려우며,¹³⁾ 가열 온도 및 시간, 열처리가 진행되는 환경과 단백질 간의 상호작용 및 항원성을 나타내는 대상에 따라 다른 결과가 나타날 수 있다.^{11,13,14)} 본 연구에서 casein은 알려진대로 열에 대한 안전성이 확인되었으나, BLG과 ALA의 경우 100°C 중탕에 의해 크게 구조에 영향을 받지 않았으며 열에 의해 분해된 일부 펩티드(peptide)들이 다시 응집되어 각각 약 45 kDa와 30 kDa의 분자량이 비교적 크고 IgE와 강하게 결합하는 항원성을 지닌 구조로 변화했음을 알 수 있었다. 또한 열처리한 total protein 결과에서도 30 kDa 이상의 단백질들이 전반적으로 열화(degradation)되면서 IgE 결합 반응이 약간 증가하는 변화를 보였다. 각각 존재할 때와 달리 total protein에서는 열이 가해질 때 단백질 간의 상호작용이 존재할 수 있으며 가열 시 우유단백은 분해되면서 casein과 결합하고 상호작용한다고 알려져 있으나,^{32,33)} 실제 본 연구 결과에서는 둘 사이에 큰 차이를 관찰할 수 없었다.

가수분해는 우유단백의 항원성을 현저히 떨어뜨리는 것으로 잘 알려져 있다.¹³⁾ 우리 몸에서 일어나는 가수분해는 위산에 포함되어 있는 펩신(pepsin)에 의한 우유단백의 분해가 대표적이며, 이러한 현상은 알레르기성이 높고 분자량이 큰 단백질항원에 대한 직접적인 노출을 막아주는 역할을 한다.³⁴⁾ 고위험 환자에서 알레르기질환 예방을 위해 가수분해 분유를 섭취하는 것도 이와 유사한 의미를 가진다.¹⁶⁾ 본 연구에서 일반분유와 부분 가수분해 및 완전 가수분해 분유의 단백질 분포를 확인한 결과, 부분 가수분해 분유에서는 일반 분유의 주요 단백질이 가수분해 처리에 의해 분해되어 발생한 것으로 보이는 10 kDa 이하의 단백질들을 확인할 수 있었으며 완전 가수분해 분유에서는 단백질이 거의 관찰되지 않아 극히 소량만이 들어있음을 알 수 있었다. 부분 가수분해 분유에서 10 kDa 이하로 남아 있던 단백질들은 IgE와 거의 결합하지 않아 분자량 10 kDa 이하로 분해

된 펩티드들은 IgE 혈청 반응성이 매우 감소하였음을 알 수 있었다. 이는 가수분해를 통해 분자량이 작아질 뿐 아니라 항원성을 가지는 구조가 일부 소실되기 때문으로 보인다.¹¹⁾ 실제로 동물 실험을 통해서 부분 가수분해 분유에 의한 우유단백 감작(sensitization)의 위험성을 연구한 결과 안전한 것으로 보고되어 있다.³⁵⁾ 가수분해 분유의 항원성에 대한 이전 연구들을 보면, immunoblotting 결과에서는 부분 가수분해 분유에서 항원성을 지닌 잔존하는 여러 단백질이나 펩티드들이 발견되고 완전 가수분해 분유에서는 발견할 수 없었으나, enzyme-linked immunosorbent assay와 enzyme allergosorbent test를 통해서 완전 가수분해 분유에서도 우유단백 특이 항체와 결합하는 펩티드들이 잔존함을 확인하여 보고하였다.^{36,37)} 따라서 어떤 면역효소항체법(immunoenzymatic method)을 사용하느냐에 따라 결과가 달라질 수 있으며, 이외 다른 실험적 방법이나 환경도 영향을 미칠 수 있다.³⁶⁾ 본 연구에서 부분 가수분해 분유는 잘게 분해된 잔존하는 단백질들이 존재하지만 항원성은 감소된 상태를 확인하였으며, 완전 가수분해 분유에는 단백질이 극소량 존재하며 항원성은 거의 보이지 않는 것을 알 수 있었다. 따라서 완전 가수분해 분유로 인해 알레르기 증상이 나타날 가능성은 희박하나, 환자 개개인의 항원에 대한 감수성의 차이가 존재할 수 있다.

결론적으로, 100°C 중탕으로 열처리를 하였을 때 α -casein은 단백질의 분포와 항원성에서 변화가 없었고 BLG과 ALA는 가열 전 주요 단백질 부위보다 분자량이 다소 크고 항원성을 가진 새로운 응집체가 형성되었으며, 이 단백질이 실제 알레르기를 일으키는 유발 항원으로써 의미를 가지는데 대해서는 더 연구가 필요할 것으로 생각된다. Total protein을 열처리하였을 때에는 각각의 항원을 열처리하였을 때의 변화와 크게 다르지 않다고 추측되나, 비슷한 분자량의 단백질 분획을 정확히 구분할 수 없어 단정짓기는 어렵다. 또한 가수분해 처리한 분유에서는 일반 분유에 비해 현저한 단백질의 분포와 항원성의 감소를 확인하였다. 부분 가수분해 분유에 잔존하는 단백질들이 우유단백 감작을 유발할 가능성은 낮을 것으로 보이며, 완전 가수분해 분유에서 알레르기 증상을 일으킬 만한 크기와 기능을 가진 항원은 거의 존재하지 않는 것을 알 수 있다. 실제 우유 알레르기 환자들에 대한 열처리한 우유 및 가수분해 분유의 임상적 적용과 관련해서는 연구가 앞으로 더 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Savilahti E, Kuitunen M. Allergenicity of cow milk proteins. *J Pediatr* 1992; 121(5 Pt 2):S12-20.
2. Høst A, Halken S, Jacobsen HP, Christensen AE, Herskind AM, Plesner K. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13 Suppl 15:23-8.
3. Venter C, Pereira B, Grundy J, Clayton CB, Roberts G, Higgins B, et al. Incidence of parentally reported and clinically diagnosed food hypersensitivity in the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1118-24.

4. Hill DJ, Firer MA, Ball G, Hosking CS. Natural history of cows' milk allergy in children: immunological outcome over 2 years. *Clin Exp Allergy* 1993;23:124-31.
5. Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1172-7.
6. Saarinen KM, Pelkonen AS, Makela MJ, Savilahti E. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:869-75.
7. Wood RA, Sicherer SH, Vickery BP, Jones SM, Liu AH, Fleischer DM, et al. The natural history of milk allergy in an observational cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:805-12.
8. Sackesen C, Assaad A, Baena-Cagnani C, Ebisawa M, Fiocchi A, Heine RG, et al. Cow's milk allergy as a global challenge. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:243-8.
9. Gjesing B, Osterballe O, Schwartz B, Wahn U, Lowenstein H. Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow milk and milk substitutes. *Allergy* 1986;41:51-6.
10. Sicherer SH, Sampson HA. Cow's milk protein-specific IgE concentrations in two age groups of milk-allergic children and in children achieving clinical tolerance. *Clin Exp Allergy* 1999;29:507-12.
11. Bu G, Luo Y, Chen F, Liu K, Zhu T. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Sci Technol* 2013;93:211-223.
12. Kilshaw PJ, Heppell LM, Ford JE. Effects of heat treatment of cow's milk and whey on the nutritional quality and antigenic properties. *Arch Dis Child* 1982;57:842-7.
13. Wal JM. Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93(5 Suppl 3):S2-11.
14. Davis PJ, Smales CM, James DC. How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy* 2001;56 Suppl 67:56-60.
15. Singh B, Lee KC, Fraga E, Wilkinson A, Wong M, Barton MA. Minimum peptide sequences necessary for priming and triggering of humoral and cell-mediated immune responses in mice: use of synthetic peptide antigens of defined structure. *J Immunol* 1980;124:1336-43.
16. Chung CS, Yamini S, Trumbo PR. FDA's health claim review: whey-protein partially hydrolyzed infant formula and atopic dermatitis. *Pediatrics* 2012;130:e408-14.
17. Isolauri E, Sütas Y, Makinen-Kiljunen S, Oja SS, Isosomppi R, Turjanmaa K. Efficacy and safety of hydrolyzed cow milk and amino acid-derived formulas in infants with cow milk allergy. *J Pediatr* 1995;127:550-7.
18. de Boissieu D, Matarazzo P, Dupont C. Allergy to extensively hydrolyzed cow milk proteins in infants: identification and treatment with an amino acid-based formula. *J Pediatr* 1997;131:744-7.
19. de Boissieu D, Dupont C. Allergy to extensively hydrolyzed cow's milk proteins in infants: safety and duration of amino acid-based formula. *J Pediatr* 2002;141:271-3.
20. Goldman AS, Anderson DW Jr, Sellers WA, Saperstein S, Kniker WT, Halpern SR. Milk allergy. I: oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children. *Pediatrics* 1963;32:425-43.
21. Huang F, Nowak-Węrzyn A. Extensively heated milk and egg as oral immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;12:283-92.
22. Maleki SJ, Hurlburt BK. Structural and functional alterations in major peanut allergens caused by thermal processing. *J AOAC Int* 2004;87:1475-9.
23. Gruber P, Becker WM, Hofmann T. Influence of the maillard reaction on the allergenicity of rAra h 2, a recombinant major allergen from peanut (*Arachis hypogaea*), its major epitopes, and peanut agglutinin. *J Agric Food Chem* 2005;53:2289-96.
24. Kim TH, Jung HH, Kim ES, Park JY, Kim KW, Sohn MH, et al. A case of rice allergy caused by thin rice porridge during the weaning period. *Pediatr Allergy Respir Dis* 2007;17:149-54.
25. Docena GH, Fernandez R, Chirido FG, Fossati CA. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 1996;51:412-6.
26. Caubet JC, Nowak-Węrzyn A, Moshier E, Godbold J, Wang J, Sampson HA. Titer of casein-specific IgE levels in predicting reactivity to baked milk. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:222-4.e1-4.
27. Nowak-Węrzyn A, Bloom KA, Sicherer SH, Shreffler WG, Noone S, Wanich N, et al. Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:342-7, 347.e1-2.
28. Baldo B. Milk allergies. *Aust J Dairy Technol* 1984;39:120-8.
29. Ehn BM, Ekstrand B, Bengtsson U, Ahlstedt S. Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen beta-lactoglobulin. *J Agric Food Chem* 2004;52:1398-403.
30. Kleber N, Hinrichs J. Antigenic response of β -lactoglobulin in thermally treated bovine skim milk and sweet whey. *Milchwissenschaft* 2007;62:121-4.
31. Bu G, Luo Y, Zheng Z, Zheng H. Effect of heat treatment on the antigenicity of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein isolate. *Food Agric Immunol* 2009;20:195-206.
32. Anema SG, Li Y. Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *J Dairy Res* 2003;70:73-83.
33. Corredig M, Dalgleish DG. The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. *Int Dairy J* 1999;9:233-6.
34. Schmidt DG, Meijer RJ, Slangen CJ, van Beresteijn EC. Raising the pH of the pepsin-catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates. *Clin Exp Allergy* 1995;25:1007-17.
35. van Esch BC, Knipping K, Jeurink P, van der Heide S, Dubois AE, Willemsen LE, et al. In vivo and in vitro evaluation of the residual allergenicity of partially hydrolysed infant formulas. *Toxicol Lett* 2011;201:264-9.
36. Docena G, Rozenfeld P, Fernandez R, Fossati CA. Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy* 2002;57:83-91.
37. Restani P, Velona T, Plebani A, Ugazio AG, Poiesi C, Muraro A, et al. Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. *Clin Exp Allergy* 1995;25:651-8.