

저항원성 조제분유의 개발과 특징

하월규,¹ 이정민,¹ 김규연²¹매일유업(주) 중앙연구소, ²연세대학교 의과대학 소아청소년과학교실

Development and properties of hypoallergenic infant formula

Woel-Kyu Ha,¹ Jeongmin Lee,¹ Kyu-Earn Kim²¹Research and Development Center, Maeil Dairies Co., Ltd., Pyeongtaek; ²Development of Pediatrics, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Milk proteins are composed of casein, further classified into α S1-casein, α S2-casein, β -casein, and κ -casein, and whey protein, which is separated into α -lactalbumin, β -lactoglobulin, serum albumin, and some minor proteins, such as lactoferrin and immunoglobulin. To reduce the allergenicity of protein, heat treatment and enzymatic protein hydrolysis by endopeptidase are necessarily required. Additionally, membrane technology should be applied to produce a protein hydrolyzate, which has consistent molecular weight of peptide and low in free amino acid without allergenic peptide or protein. Extensive casein hydrolyzate and whey protein hydrolyzate are used for protein source of mainly extensively hydrolyzed protein formula (eHF) intended for the treatment of cow's milk allergy. Also, partially hydrolyzed formula (pHF) is developed, which is using a single protein source e.g., whey protein hydrolyzate. The allergenicity of infant formula can be determined according to molecular weight profile and antigenicity reduction compared to intact protein. More than 90% peptides are present in eHF have a molecular weight of < 3,000 Da. Peptide molecular weight profiles of pHF range mainly between 3,000 and 10,000 Da, but have a small percentage of > 10,000 Da. Generally, antigenicity reduction in eHF and pHF is 10^{-6} and 10^{-3} , respectively. Even if protein hydrolyzate is manufactured under strict quality control, there is still a risk of cross contamination of allergenic milk components through environmental conditions and the shared manufacturing process. Thus, quality assessment of protein hydrolyzate formula must be performed routinely. (*Allergy Asthma Respir Dis* 2017;5:63-72)

Keywords: Major milk allergen, Enzymatic hydrolysis, Antigenicity, Allergenicity, Hypoallergenic infant formula

서론

세계보건기구(World Health Organization, WHO)를 비롯한 여러 국제 유관 기관에서 출생 후 최소 6개월 동안의 영아에게 완전 모유수유를 권장하고 있지만 완전모유수유가 불가능한 영유아는 모유를 대신할 수 있는 조제유(infant milk) 혹은 조제분유(infant formula)를 이용한다. 미국에서 우유를 원료로 상업적인 조제유가 만들어진 것은 1867년이고 조제분유는 1915년에 상품화되었다는 기록으로 보면 조제분유는 약 100년 이상의 역사를 가지고 있다.² 그런데 조제분유의 단백질원으로 가장 널리 사용하고 있는 우유 단백질(bovine milk protein)은 아이러니하게도 영아의 주요 식품 알레르겐 중 하나이다. 우유단백질은 다양한 단백질로 구성되어 있는 동질이상의 단백질복합체이며 그 중 25개 이상의 단백질이 사

람에게 항원으로 작동할 수 있다고 알려져 있다.³ 그 중 조제유의 주요 알레르겐은 α S1-casein과 β -lactoglobulin과 같이 모유에는 존재하지 않는 외인성 항원이며 우유와 모유에 다 같이 존재한다고 하더라도 모유단백질과의 구조적 이질성이 알레르기 반응을 일으키는 원인이 되기도 한다.^{4,5}

우유단백질은 조제분유의 제조공정에서 가해지는 열처리에 의해서 항원성이 약간 낮아지기는 하지만 알레르기 발현을 낮출 수 있는 수준은 아니며,⁶⁻¹⁰ 유의하게 단백질의 항원성을 낮출 수 있는 가장 효과적인 방법은 가수분해하는 것이다.¹¹⁻¹³ 단백질가수분해물에서 항원성 펩타이드나 단백질을 효과적으로 제거하기 위해서 막분리(membrane technology)기술이 도입되어 유리아미노산 함량이 낮고 고분자의 펩타이드가 제거된 일정하게 펩타이드 분자량을 유지하는 유단백가수분해분유의 제조가 가능해졌다.^{14,15} 최초의

Correspondence to: Woel-Kyu Ha  <http://orcid.org/0000-0003-1104-7325>
Research and Development Center, Maeil Dairies Co., Ltd., 63 Jinwiseo-ro Jinwi-myeon,
Pyeongtaek 17714, Korea
Tel: +82-31-612-3974, Fax: +82-31-668-0247, E-mail: woelkyu@naver.com
Received: September 29, 2016 Revised: January 2, 2017 Accepted: January 3, 2017

© 2017 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/4.0/>).

상업화된 저항원성 분유는 Mead Johnson이 1942년 완전카제인가 수분해물(extensive casein hydrolyzate)을 단백질원으로 구성하여 개발한 Nutramigen이다. 이후에 동일한 단백질원에 일부분의 탄수화물원과 지방공급원을 각각 덱스트린(dextrin)과 중쇄지방(medium chain triglyceride)으로 대체한 완전가수분해분유를 출시하였고 유청단백가수분해물(whey protein hydrolyzate)을 사용한 완전가수분해분유와 부분가수분해분유도 생산되고 있다.

여기서는 우유단백질의 항원적 특징과 단백질 가수분해기술, 글로벌시장에서 판매되고 있는 대표적인 저항원성 분유의 역사와 특징에 대해서 살펴보고자 한다.

우유단백질의 조성

우유단백질은 우유의 약 3.5%를 구성하며, 탈지유로부터 크게 카제인(casein)과 유청단백질(whey protein)을 분리할 수 있다. 즉, 탈지유를 약 20°C에서 pH를 4.6으로 산성화시키면 약 80%의 우유단백질은 불용화되어 침전되는데, 이것을 카제인이라고 하며, 나머지 수용액을 유청(whey)이라고 한다. 유청에 포함되어 있는 단백질은 유단백질의 약 20%를 차지하며, 유청단백질 또는 비카제인태단백질(noncasein protein)이라고 한다. 유청단백질을 구성하는 주요 단백질은 β -lactoglobulin, α -lactalbumin 그리고 serum albumin 이고 총 유청단백질 중에서 각각 약 50%, 20%, 10%를 차지하며 이 밖에 소량의 면역글로불린, 락토페린, 라이소자임 그리고 다양한 효소들로 구성되어 있다. 탈지유를 산성화시켜 만든 카제인을 등전점카제인(isoelectric casein) 혹은 산카제인(acid casein)이라고 하며, 때로는 “casein nach Hammarsten”이라고도 부른다. 또한 산카제인을 제조할 때 생기는 수용액 부분은 산유청(acid whey)이라고 한다. 치즈 제조에서와 같이 카제인은 응유효소(chymosin 혹은 rennin)로써 카제인을 응고시켜 생산하기도 하는데, 이러한 방법으로 만든 카제인을 렌넷카제인(rennet casein)이라고 하며 수용액 부분을 렌넷유청(rennet whey) 혹은 감성유청(sweet whey)이라고 한다. 한편, 포유동물 젖에서 카제인과 유청단백질의 비율은 중간에 큰 차이가 있다. 모유의 경우 카제인과 유청단백질 비율은 40:60, 마유(mare's milk)는 50:50인 반면에 반추동물인 산양유(goat's milk), 면양유(sheep's milk), 물소유(buffalo's milk)의 비율은 우유와 비슷한 약 80:20의 비율로 존재한다. 카제인은 평균 약 0.85%의 무기인을 함유하고 있는 인산단백질(phosphoprotein)이다. 인산잔기는 카제인 아미노산사슬 중에서 세린의 수산기에 에스테르화되어 있으며 카제인의 안정성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 카제인은 α _{s1}-casein, α _{s2}-casein, β -casein 그리고 κ -casein이 카제인마이셀(casein micelle)라고 부르는 콜로이드성 마이셀 형태로 우유에 존재한다. 여기서 S의 의미는 sensitive의 약자이며 α s-casein은 calcium ion sensitive casein를 의미한다.¹⁶⁻¹⁸

우유단백질의 항원성

소아에서 우유알레르기는 식이제한으로 인한 영양학적인 문제 뿐만 아니라 보호자와 환자의 삶의 질을 저하시킨다. 특히 완전모유수유가 불가능한 경우에는 조제분유 수유를 해야 하지만 우유알레르기가 이미 발현된 영아에게는 일반적으로 조제분유 수유가 불가능하므로 대체식이 꼭 필요하다. 실제로 선진국 영아 약 0.8%~4.9%는 조제분유 수유 중에 우유알레르기를 진단 받고 대체 식이를 필요로 한다.¹⁹⁻²¹

앞서 기술한 바와 같이 우유단백질에는 사람에게 대해서 특이항체를 생산할 수 있는 단백질이 18~25개 정도 존재한다.³ (Table 1) 우유단백질 중 β -lactoglobulin은 모유에 존재하지 않아 우유알레르기의 주 항원으로 생각되어왔으나,²² 현재는 카제인을 주 항원으로 받아들이고 있다. 그러나 대부분의 우유알레르기 환자는 여러 개의 단백질에 감각되며, 약 50% 이상의 환자가 카제인, α -lactalbumin 그리고 β -lactoglobulin 중 한 개 이상의 항원과 반응하는 것으로 알려져 있다.^{17,22-24} 소수 우유항원성 단백질 중에서는 lactoferrin도 종종 우유알레르기를 유발하는 단백질로 분류되기도 한다.²⁵

World Health Organization-International Union of Immunological Societies 알레르기명명 소위원회가 'Bos d 8'로 명명²¹ 카제인은 고도로 인산화된 단백질로서 주요 인산화영역은 소화효소에 의해 쉽게 분해되지 않고 면역반응성이 높은 영역이기 때문에 인산화영역이 카제인의 항원성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.²⁶ 특히 4개의 카제인 분자 중에서 α S1-casein은 지속형 우유알레르기에 관여하며, 예후가 나쁜 우유알레르기 환자에서 감각률이 높은 가장 강력한 면역원성단백질이라는 것이 확인되었다.²⁵⁻²⁹

우유의 카제인은 산양유와 같은 다른 반추동물의 카제인과 비슷한 단백질로 구성되어 있으며 우유 카제인과 다른 반추동물 카제인 간에는 80%~90%의 고도의 아미노산서열 상동성이 있다.²³ 이러한 특징 때문에 우유에 알레르기 반응을 보이는 환자가 대체식으로 면양유나 산양유를 먹어도 역시 알레르기 반응을 일으키게 된다. 한편 IgE와 교차반응 하는 강도는 카제인 분자 간에 차이가 있으며 카제인의 구성 비율과도 밀접한 관계가 있다.²⁴ 이러한 현상은 소화되는 동안 카제인 마이셀이 붕괴된 후 각각의 카제인 성분에 의해 동시에 감각된 결과로 추측되고 있다. 그리고 어떤 환자의 혈청에는 전카제인(whole casein)보다 각각의 카제인분자에 대한 IgE titer가 훨씬 높게 나타나는 경우도 있어 다감작(multiple sensitization)은 각각의 카제인 간 교차감작에서 기인한다고 할 수 있다.²⁴

유청단백질의 약 20%를 차지하는 α -lactalbumin은 123개의 아미노산 잔기로 이루어져 있으며 62%가 필수아미노산으로 구성되어 있다.¹⁸ α -Lactalbumin은 8개의 시스테인 잔기가 4개의 이황화결합을 형성하고 있으며, α -lactalbumin을 구성하는 알파헬릭스와 베타시트영역은 강력한 칼슘결합력을 가지고 있는 칼슘결합환

Table 1. Structural properties of antigenic milk proteins

Properties of protein	Casein				Whey protein			
	α S1-casein	α S2-casein	β -casein	κ -casein	β -lactoglobulin	α -lactalbumin	Serum albumin	Lactoferrin
Concentration in milk (g/L)	12–15	3–4	9–11	2–4	3–4	0.6–1.5	0.4	Trace
Molecular weight (Da)	23.6	25.2	24.0	19.0	18.3	14.2	66.3	80
No. of amino acid residues/molecule	199	207	209	169	162	123	582	703
No. of S-S bridge residues/molecule	0	1	0	1	2 (1 free SH)	4	17 (1 free SH)	16
No. of phosphate residues/molecule	8 (9)	10–13	5	1	0	0	0	0
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								
α -helix	5–10	?	10	23	10–15	26	34	?
β -sheet	4–15	?	13	31	43	14(β -structure)	50	?
Unordered structure	?	?	77	?	47	60	?	?
Antigenicity	++	++	++	++	+++	++	+	?
Allergen name	Bos d 9	Bos d 10	Bos d 11	Bos d 12	Bos d 5	Bos d 4	Bos d 6	Bos d Lf
Type of Epitope	Sequential	Sequential	Sequential	Sequential	Conformational	Conformational	Conformational	Conformational
Cross reaction to blood serum from CMA baby (%)	60 (total casein)	-	-	-	60–80	50	50	?
Sequence homology human vs. bovine (%)	None human	None human	47	Low	None human	72	80	
Σ residues/mole	199	207	209	169	162	123	582	
MW/residue per mole	119	122	115	112	113	115	114	
Σ lysine, arginine/mole	20	30	15	4	18	12–13	82	
Mean MW of tryptic peptide	1,184	842	1,602	4,732	1,017	1,132	809	
Mean MW of tryptic and chymotryptic peptide	592	505	829	1,051	654	577	510	

CMA, cow's milk allergy; MW, molecular weight; SH, sulfhydryl group.

(calcium binding loop)과 결합되어 있다. 그리고 칼슘결합부위에는 마그네슘, 망간, 나트륨, 칼륨이온도 결합할 수 있으며 이러한 양이온 결합 때문에 α -lactalbumin은 가열처리 하여도 변성되지 않고 안정한 구조를 유지할 수 있다.³⁰

유청단백질의 65%를 차지하는 β -lactoglobulin은 반추동물의 젖에만 존재하는 외래성 단백질로서^{4,5,23} 162개의 아미노산잔기로 이루어져 있다. 그 중에서 5개의 시스테인 잔기가 존재하는데 2개의 이황화결합과 1개의 유리황화수소 상태로 존재한다.³¹ β -lactoglobulin에 존재하는 1개의 유리황화수소잔기는 우유를 가열처리되는 동안 κ -casein에 결합되어 있는 1개의 황화수소잔기와 이황화결합하여 또 다른 새로운 알레르기성 단백질을 만들 수도 있다.

과거 주요 우유단백질에 대한 항원성을 확인하기 위한 일련의 연구에서 우유알레르기 환자의 혈청과 정제된 우유단백질 분획 간의 교차반응 시험 결과 우유알레르기 환자의 약 60%–80%가 β -lactoglobulin에 양성반응을 보이고 카제인의 경우 약 40%, α -lactalbumin은 약 40%–50%, serum albumin은 약 18%–50%가 양성반응을 보인 것으로 보고되었지만 최근의 연구에서는 우유단백질의 감작 빈도는 유청단백질이 낮아지는 대신에 카제인의 감작 빈도가 증가하는 경향을 보인다.^{32–36} 유단백질의 감작 빈도는 피부시험에서 카제인에 90%, α -lactalbumin에 88.8%, β -lactoglobulin에 대해

87.5%의 순으로 관찰되었으며 CAP 시험에서는 카제인에 77.5%, α -lactalbumin에 76.3%, β -lactoglobulin에 대해 72.5%의 감작 빈도를, immunoblot 실험에서 카제인에 63.8%, α -lactalbumin에 62.5%, β -lactoglobulin에 대해 35%의 감작률을 보였다.³⁷ 국내에서는 유단백질 특이 IgE 양성인 아토피피부염 소아에 대한 Unicap 시험 결과 카제인 감작이 가장 빈번했을 뿐만 아니라 지속되는 우유 알레르기 환자에서 주요 감작 단백질로 확인되었다.³⁴ 이러한 현상에 대해 단정하기는 어렵지만 우유와 유제품 제조공정의 변화와 알레르기 환자의 소비 습관의 변화가 유단백질에 대한 감작 양상의 변화를 가져온 것으로 추정하고 있다.¹⁷

카제인은 연속항원결정인자(sequential [linear] epitope)를 가지고 있으며 유청단백질은 대부분 구조의존항원결정인자(conformational [structured] epitope)를 가지고 있다(Table 2). 연속항원결정인자는 단백질의 아미노산 잔기의 1차 구조에 의해서 결정되지만 구조의존항원결정인자는 단백질의 아미노산서열이 아닌 폴리펩타이드의 접힘에 의한 복잡한 2차구조와 3차구조에 의해 결정된다.^{38–40} 조리하거나 섭취 후에 소화과정을 거치면서 구조의존항원결정인자는 거의 대부분 연속항원결정인자 형태로 바뀌는데^{38,41} 연속항원결정인자는 주로 단백질의 소수성(hydrophobic) 영역에 위치하거나 구상단백질의 3차구조 내부에 숨겨져 있기 때문에

Table 2. Sequential IgE-binding epitopes in caseins and whey proteins

Milk proteins	IgE-binding sequential epitope (No. of amino acid sequence)	Techniques	Reference
αS1-casein	17–36, 39–48, 69–78, 83–102, 109–120, 123–132, 139–154, 159–174, 173–194	SPOT membrane and microarray	85
	1–31, 65–100, 134–167	Microarray	29
αS1-casein	31–44, 43–56, 83–100, 93–108, 105–114, 117–128, 143–158, 157–172, 165–188, 191–200	SPOT membrane and microarray	86
	1–20, 13–32, 67–86, 181–207	Microarray	87
β-casein	1–16, 45–54, 55–70, 83–92, 107–120, 135–144, 149–164, 167–184, 185–208	SPOT membrane and microarray	88
	25–50, 52–74, 154–173	Microarray	87
κ-casein	9–26, 21–44, 47–68, 67–78, 95–116, 111–126, 137–148, 149–166	SPOT membrane and microarray	85
	34–53	Microarray	87
α-lactalbumin	1–16, 13–26, 47–58, 93–102	SPOT membrane	89
	1–19, 15–34, 105–123, 45–64, 60–79, 90–109	Microarray	90
β-lactoglobulin	1–16, 31–48, 47–60, 67–78, 75–86, 127–144, 141–152	SPOT membrane and microarray	89
	58–77	Microarray	87

쉽게 분해하기 어려울 뿐만 아니라 IgE 항체가 접근하기도 어렵다. 카제인의 주요 항원인 αS1-casein에는 연속항원결정인자와 구조의 존항원결정인자가 모두 존재한다.²⁹

단백질가수분해물에 의한 알레르기성의 변화

우유단백질의 아미노산 사슬을 기준으로 트립신과 키모트립신이 가수분해할 경우 이론적으로 생성될 수 있는 펩타이드의 분자량을 계산해 보면 거의 모든 항원성이 제거될 수 있다. 특히 트립신 단독으로 사용할 때 보다 트립신과 키모트립신을 같이 사용하면 펩타이드 분자량이 더 작아질 수도 있다. 상업적으로 가수분해단백질 제조에는 기질특이성이 있는 펩신, 트립신과 키모트립신과 같은 펩타이드 중간 분해효소(endopeptidase)가 주로 사용된다. 펩신은 기질단백질의 트립토판, 티로신, 페닐알라닌, 류신, 아이소류신 잔기에 특이성을 가지고 있으며 트립신은 라이신과 아르기닌 부분을 그리고 키모트립신은 페닐알라닌, 티로신, 트립토판 잔기 부분을 특이하게 분해한다.^{42,43} 미생물 유래 단백질분해효소와 식물 유래 단백질 분해효소는 펩타이드 외부 분해효소(exopeptidase)로서 아미노산사슬에 대한 기질특이성 없이 무작위로 분해되기 때문에 항상 일정한 크기와 분자량분포를 가지고 있는 단백질가수분해물을 생산할 수 없다. 따라서 효소로 제조한 가수분해물에는 유리아미노산 비율이 높고 고분자 폴리펩타이드가 존재할 수도 있기 때문에 안전한 저항원성분유를 만들 수 없다.⁴⁴ 이러한 이유로 저항원성 분유의 단백질원인 단백질가수분해물의 생산에는 펩타이드 중간 분해효소가 주로 이용된다.

가수분해에 대한 연구는 1970년대 후반부터 Nestle에서 연구되었으며, 유청단백질을 돼지펩신(porcine pepsin)으로 가수분해하여 가수분해율 8%의 유청단백질가수분해물 생산이 가능하다고 보고하였다.⁴⁵ 그러나 한가지 종류의 동물성 단백질분해효소로써

유청단백질의 가수분해도를 높이기 어렵기 때문에 펩신과 치즈 프로테아제를 동시에 사용하여 항원성이 낮은 단백질가수분해물을 생산하기 위한 연구가 1980부터 1990년대 초기까지 활발하게 진행되었다.⁴⁶⁻⁴⁸ 동물시험이나 우유알레르기 환자의 특이 IgE와의 교차 반응시험에서 효소조합으로 생산된 가수분해물에도 항원성이나 면역원성이 여전히 존재한다는 것이 확인되었으며⁴⁸⁻⁵⁰ 현재는 막분리 기술과 효소조합 가수분해 기술을 시스템화하여 고분자의 항원성 펩타이드를 제거한 단백질가수분해물을 생산하고 있다.⁵¹ 또한 한외여과로 유청단백가수분해물에서 분해되지 않은 고분자의 알레르기원을 제거한 결과 항원성을 6배 이상 낮추었다.^{52,53}

유청단백질가수분해물 중에서 펩타이드가 면역반응을 유발하는 최소 분자량은 3,000–5,000 Da 사이이며⁵⁴ 시험관실험에서 IgE와 결합하는 최소 분자량은 970–1,400 Da 사이이다.⁵⁵ 그러나 시험관실험에서 최소 분자량이 체내 감작과 그 이후 일어나는 면역반응에 어느 정도 영향을 미치는지는 아직까지 명확하지 않다. 미국소아과학회는 저항원성 분유는 우유알레르기가 확진된 90%의 환자에서 먹일 때 이상반응이 없어야 한다고 정의하였다.⁵⁶ 미국소아과학회 기준에 적합한 저항원성분유를 우유알레르기 소아에게 안전하게 수유해왔지만 일부 민감한 소아는 여전히 감작되거나 알레르기 반응을 일으키기도 한다. 그리고 저항원성 분유에 존재하는 단백질 단편을 인식하는 혈중 IgE 항체가 우유알레르기 소아에게서 발견된 사례도 있다.⁵⁷ 이러한 결과는 단백질가수분해분유를 수유할 때 나타나는 심각한 면역과민반응에 대한 설명이 될 수 있고 안전성을 의심할 수 있는 원인이 되기도 한다.

저항원성 분유 개발의 역사

일반적으로 효소 가수분해하여 항원성을 낮춘 단백질가수분해물이나 아미노산을 단백질원으로 사용하는 제품을 저항원성 분

Table 3. Properties of extensively hydrolyzed protein formula

	Brand name						
	Alfare	Alimentum	MA-1	Pepti junior	Pregestimil	Maeil HA	Nutramigen
Manufacturer	Nestle	Ross	Morinaga	Nutricia	Mead Johnson	Maeil Dairies	Mead Johnson
Reconstitution (g/100 mL)	15	Liquid	15	13.1	15	14	15
Energy (kcal/100 mL)	72	67.6	70.1	66	67	64.5	67
Protein (g/100 kcal)	3.5	2.73	3.4	2.8	2.8	2.8	2.8
Fat (g/100 kcal)	5	5.5	3.9	5.6	4	3.9	3.9
Carbohydrate (g/100 kcal)	10.8	10.2	12.9	10.2	13.5	13.4	13
Protein source	WPH	CNH	CNH	WPH	CNH	CNH	CNH
Amino acid added	None	Cys, Tyr, Trp	Tau	None	Tyr, Cys, Trp, Car, Tau	Cys, Tyr, Trp, Tau	Tyr, Trp, Cys
Carbohydrate total (g)	10.8	10.2	12.9	10.2	13.5	10.2	13
Sucrose (g)	None	6.7	1.1	None	None	?	None
Dextrin and starch (g)	10.6	3.3	11.8	10	13.5	?	13
Fat total (g)	5	5.5	3.9	5.6	4	3.9	3.9
MCT oil (g)	2.4	2.8	None	2.8	1	?	0
Linoleic acid (mg)	540	1,600	1,070	1,360	1,300	1,946	2,200
Osmolarity (mosmol/L)	200	300	?	190	310	240	245
Hydrolysis enzyme	Trypsin	Pancreatic enzyme	Animal & microbial enzyme	Trypsin, chymotrypsin	?	Pancreatic Ez, microbial Ez	?

WPH, whey protein hydrolysate; CNH, casein hydrolysate; Cys, cysteine; Tyr, tyrosine; Trp, tryptophan; Tau, taurine; Car, carnitine; MCT, medium chain triglyceride; Ez, enzyme.

유라고 한다. 저항원성 분유는 단백질의 가수분해 정도와 잔존하는 펩타이드의 평균 분자량에 따라서 완전가수분해분유와 부분 가수분해분유로 분류된다. 최초의 완전가수분해분유는 1942년부터 생산되기 시작한 미국 Mead Johnson의 Nutramigen이며,⁵⁷ 현재에 이르기까지 약 70년 이상 우유알레르기로 확진된 환자의 치료 식으로 이용하고 있다.⁵⁸ (Table 3) 1971년 Mead Johnson은 Nutramigen과 동일한 완전가수분해카제인을 사용하지만 영양성분 조성이 다른 Pregestimil을 출시하였다. 이 제품의 주요 특징은 탄수화물은 텍스트린을 사용하고 지방의 약 50%를 중쇄지방으로 대체하여 췌장부전증, 단장증후군과 같은 소화흡수 장애가 있는 환자에게까지 사용할 수 있도록 개발되었고 제품의 유형은 특수의료용도식품(dietetic food for special medical use)으로 분류된다.⁵⁹ 단백질가수분해분유의 가장 큰 장점은 아미노산과 단쇄 펩타이드가 혼재하는 semielemental formula라는 것이며 아미노산을 조합한 아미노산분유보다 단백질 이용효율이 높으며, 장기간 먹이기에 맛이 더 좋다는 장점이 있다. 일본에서는 Morinaga 유업이 완전카제인가수분해물을 사용하여 1977년 MA-1을 출시하였다.⁶⁰ 그리고 1980년 후반 미국 Abbott는 액상 완전카제인가수분해물 조제유인 Alimentum을 출시하였다. 한편 1980년대 초 Nestle는 다른 개념의 완전유청단백가수분해분유인 Alfare를 출시하였으며, 그 특징을 유리아미노산이 함량이 낮고 저분자량 펩타이드로 구성된 것이라고 소개한 바 있다. 비슷한 시기에 Nutricia도 완전유청단백가수분해분유인 Pepti junior를 개발하였다.⁶¹

우리나라에서는 1993년 2월 완전카제인가수분해물을 사용한

저항원성 분유인 매일HA를 최초로 개발하여 20년 이상 이용하고 있으며, 현재는 애플루트 베이비웰 HA라는 제품명으로 판매하고 있다.⁶² 1990년대 초에 매일유업에서는 독일 Milupa의 Pregomin을 도입하기 위해서 국내에서 임상시험을 검토하고 있었다. 당시 Milupa의 기술진은 매일유업 측에 단백질 분석장비를 비롯한 기술 부족과 공장의 교차오염을 막을 수 있는 장치 부족 때문에 매일HA의 생산이 불가능하다는 의견을 제시했지만 이후 매일유업 중앙연구소의 자체 기술로써 개발에 성공하게 된다.⁶² 또한 매일유업 연구진은 당시 식품공전에 해당 기준 규격이 없어 완전카제인가수분해물 조제유를 출시할 수 없었기 때문에 국립보건원(현재 식품의약품안전처)에서 자가 규격을 취득하고 식품첨가물공전에서 허용되지 않았던 식품첨가물인 호박산전분은 신규 식품첨가물로서 등재한 이후 제품 출시에 성공하였다.

초기 개발단계에서 매일HA는 식품알레르기와 만성설사 아기의 영양공급을 위한 제품으로 사용하였으며 Nutramigen과 Pregestimil의 특징적인 개념을 섞어놓은 제품이었다. 단백질원으로 완전카제인가수분해물을 사용한 이유는 비록 Nestle가 완전유청단백가수분해물을 사용한 Alfare를 출시하였지만 당시의 유가공 기술로서 유당이 전혀 들어있지 않은 유청단백질의 생산이 어려웠기 때문이었다. 또한 만성설사 아지에서 유당을 함유하지 않는 단백질이면서 인단백질로서 칼슘의 흡수에 리간드 역할을 하는 casein phosphopeptide가 함유되어 안전하게 미네랄을 공급할 수 있을 것으로 판단되었기 때문에 완전카제인가수분해물을 채택하게 되었다. 현재는 영양적으로 부족한 것이 없지만 초기 이 제품에는

식품첨가물로 허가되지 않은 비타민 K를 첨가할 수 없었다. 비타민 K는 장내유산균에 의해서 합성이 가능하지만 장내유산균총이 파괴된 만성설사 아기에게 중요한 영양성분이었다. 따라서 제품에 비타민 K는 결핍될 경우 주사로 공급하라는 표시를 하였다. 매일HA는 국내 대학병원의 소아소화기와 소아알레르기 전문 교수의 자문과 시제품을 이용한 환자 대상의 임상시험을 거친 후에 국내에서 최초로 저항원성 분유로서 출시되었다.

1980년대 후반 유럽에서는 유단백질 가수분해물이 아닌 단백질원을 사용한 저항원성 분유제품도 연이어 출시되었다. 독일 Milupa는 대두단백 가수분해물과 콜라겐 가수분해물로 만든 Pregomin을 출시하였고, 독일의 Humana는 대두단백 가수분해물과, 콜라겐 가수분해물, 그리고 유청단백질 가수분해물을 조합한 Humana HA를 출시하였다. 이 밖에 영국 SHS가 아미노산분유로서 저항원성 분유인 Neocate를 1983년 상업화한 제품으로 유럽과 미국에서 출시하였다.⁶³

우유알레르기 환자용 저항원성 분유는 항원성저하가 일반분유 대비 $1/10^6$ 이상 낮은 카제인가수분해물과 유청단백 가수분해물을 사용한다. 초창기에 개발된 분유는 유리아미노산의 함량이 높은 단백질 가수분해물을 사용하여 삼투압이 높았다. 그러나 1980년 후반기부터 단백질 가수분해물 조제기술의 발달과 더불어 유리아미노산의 함량이 10% 이하로 낮고, 주로 저분자 펩타이드로 구성된 단백질 가수분해물을 사용하였기 때문에 일반분유와 삼투압이 비슷한 저항원성 분유의 제조가 가능해졌다. 저항원성 분유에 대한 안전성과 영양학적 적합성에 대한 초기 연구는 대부분 Nutramigen과 Pregestimil에 대한 연구로서, 이 두 제품의 단백질 가수분해물은 1,200 Da 이하의 펩타이드로 구성되어 기니피그를 이용한 동물시험에서 감작되지 않고 아나필락시스가 유발되지 않았다.⁶⁴⁻⁶⁹ 그리고 Nestle의 Alfare도 면역관용을 유도하며 알레르기 환자에게 치료식으로서 효능을 입증하였다.^{44,70,71} 아미노산분유의 안전성은 중증 우유알레르기 및 여러 식품에 알레르기가 있는 환자에게 입증되었으며 일부 기관에서는 중증 식품알레르기 환자에서 우선 사용하는 것을 권고하기도 한다.⁷² 국내 제품인 앵솔루트 HA에 대한 소규모의 면역관용획득에 대한 단일기관 임상 연구도 있다. 연구 결과에 의하면 국내 제품으로 식이제한을 시행한 모유시행에 비해 영아 우유알레르기 환자에서 면역관용 획득이 빠르게 관찰되었다.⁷³

한편, 1987년 Nestle는 단백질원으로 유청단백질 부분 가수분해물 하나만 사용한 부분 가수분해 분유를 출시하였다. 부분 가수분해 분유는 우유알레르기가 확진된 환자가 아닌 알레르기 질환 발생 위험군에서 출생한 영아에게 완전모유수유가 어려운 경우 모유를 대체하여 우유알레르기 발생을 예방하거나 지연시킬 목적으로 개발되었다. 개발 당시의 브랜드명은 Beba HA와 Aletemil HA로서 유럽에서 판매되기 시작한 이후에 Nutricia, Milupa, Humana가 이어서 제품을 출시하였다. 미국에서는 Nestle가 Good Start라는 부

분 가수분해 분유를 출시하였다. 후발로 참여한 조제분유 회사는 카제인가수분해물과 유청단백 가수분해물을 20:80 비율로 혼합한 부분 가수분해 분유를 출시하기도 했지만 최근에는 유청단백질 부분 가수분해물 하나로 구성된 제품이 주류를 이루고 있다. 이들은 영양적으로 적합하고 관능적으로 맛이 좋은 장점이 있다. 우리나라에서도 1994년 매일유업에서 맘마 HA-21이라는 제품명으로 카제인가수분해물과 유청단백질 가수분해물을 20:80비율로 혼합한 부분 가수분해물 분유를 출시했지만 제품의 쓴맛이 강하여 현재는 유청단백질 부분 가수분해물만 제조하고 있다.⁶² 이 제품은 현재 앵솔루트 센서티브라는 상품명으로 판매되고 있다. 이들 제품들도 hypoallergenic infant formula라고 표시하지만 엄격히 말하면 hypoantigenic infant formula라는 표현이 더 적합하다고 할 수 있을 것 같다. 부분 가수분해 분유는 제품의 항원성이 일반조제분유 보다 $1/10^2$ 이상 낮은 것을 제외하면 영양성분은 일반분유와 비슷하다. 보통 세계시장에서 판매되고 있는 부분 가수분해 분유는 항원성을 일반분유 대비 $1/10^3$ 이상 낮추었다는 것을 특징으로 하고 있다. 미국소아과학회의 정의에 따르면 저항원성 분유는 적어도 아래의 3가지 기준을 충족하여야 한다. 첫째, 단백질의 항원성이 낮추어져야 한다. 둘째, 우유알레르기 환자에게 사용할 수 있어야 하며, 세 번째, 제품의 면역원성이 반드시 낮아져야 한다. 이 정의에 따르면 완전 가수분해 분유만을 저항원성 분유로 분류할 수 있다.⁵⁶ 또 다른 조제분유의 항원성을 구분하는 방법은 단백질의 분자량 분포이다. 부분 가수분해 분유의 펩타이드 분자량은 3,000-10,000 Da 사이지만 완전 가수분해 분유의 펩타이드 분자량은 90% 이상이 3,000 Da 이하이다. 6,000 Da 이상의 펩타이드를 많이 함유하는 부분 가수분해 분유는 완전 가수분해 분유나 아미노산분유에 비해 피부반응시험에서 양성반응을 나타낼 가능성이 높다.⁷⁴⁻⁷⁶

부분 가수분해 분유가 제품으로 출시된 이후 다양한 알레르기 질환 예방 효과에 대한 임상적인 검증이 이루어지고 있으며 현재까지는 알레르기 고위험군에서 생후 4개월까지 완전모유수유가 불가능한 경우 부분 가수분해 분유를 수유하는 것이 우유알레르기와 식품알레르기 예방 효과가 있을 수도 있다는 연구 결과가 보고된 바 있다.⁷⁷ 부분 가수분해 분유에 알레르기 예방이라는 표시를 하기 위해서는 제품을 고위험군 아기에게 적어도 6개월 동안 무작위로 수유하고, 이후에도 계속해서 18개월 동안 수유한 다음 알레르기 발생 빈도가 일반분유보다 통계적으로 유의하게 낮아졌다는 것이 확인되어야 가능하다고 미국소아과학회에서는 권고하고 있다.⁵⁶ German Infant Nutritional Intervention (GINI) 연구는 부분 가수분해 분유와 완전 가수분해 분유를 일반분유수유와 비교한 결과 부분 가수분해 분유와 완전 카제인가수분해 분유는 아토피피부염 발생 위험을 낮추었으며, 그 효과는 10년까지 지속되었다고 보고하였다.⁷⁸ 그러나 완전 유청단백 가수분해 분유는 아토피피부염 발생 위험을 낮추지 못하였는데 어떤 요인 때문이었는지는 기술되지 않

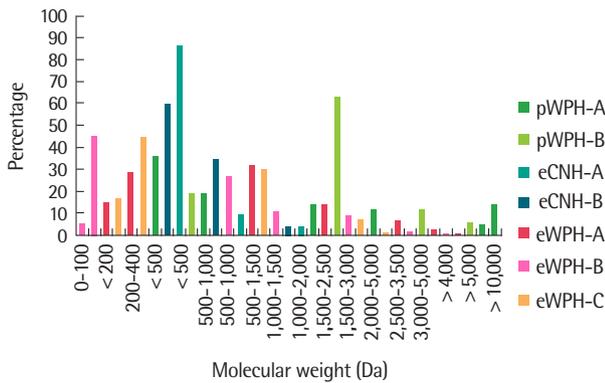


Fig. 1. Peptide chain length of global commercial partial and extensive protein hydrolysate formula. pWPH, partial whey protein hydrolysate; eCNH, extensive casein hydrolysate; eWPH, extensive whey protein hydrolysate; Da, Dalton.

았다. 매일 맘마 HA-21에 대한 단일기관 임상시험 결과 아토피피부염 발생을 낮추는 효과가 있었지만 장기간 추적 연구는 없다.⁷⁹

저항원성 분유의 잔류 항원성

부분가수분해분유의 펩타이드 분자량은 3,000–10,000 Da 정도이다.⁸⁰ 이러한 부분가수분해분유는 우유알레르기가 확진된 환자의 증상을 완화해 줄 수 없기 때문에 미국소아과학회의 저항원성 분유의 기준에 적합하지 않고 우유알레르기 치료에 권장되지는 않는다.⁵⁶ 완전가수분해분유는 펩타이드의 분자량 3,000 Da 이하로 분류되지만 완전카제인가수분해분유 다양한 임상시험에서 분자량 1,200 Da 이하의 펩타이드로 구성되어 비항원성인 것이 확인되었다.⁸¹ 그러나 단백질가수분해물 제조 중 단백질 항원결정인자가 가수분해되어 펩타이드화되어가는 과정에서 항원성이 파괴되었다고 하더라도 저항원성 분유의 제조공정, 제조공장의 환경적 요인이나 공유하는 유제품 제조공정 중 교차오염에 의해서 알레르겐이 함유될 가능성은 항상 존재한다(Fig. 1).

조제분유의 잔류 알레르겐은 펩타이드의 분자량, 화학적 복잡성, 외래성, 잔류하는 펩타이드 그리고 노출경로 등에 영향을 받는다.⁸² 유럽에서 상업적으로 판매되고 있는 12종류의 단백질가수분해분유를 이화학적 및 면역화학적 방법으로 분석한 결과 단백질 응집물이나 복합체를 함유하고 있지는 않았지만 겔여과, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 분석 결과 완전가수분해분유와 부분가수분해분유 모두 잠재적인 알레르겐을 포함하고 있었다. 완전유청단백가수분해분유가 완전카제인가수분해분유보다 고분자 펩타이드와 β -lactoglobulin 검출량이 높으며 겔여과에 의한 펩타이드의 분자량을 분석한 결과 완전가수분해분유에는 10,000 Da 이상의 펩타이드는 없었으나 거의 모든 부분가수분해분유에는

10,000 Da 이상의 펩타이드가 검출되었다.⁸³ 단백질가수분해분유와 아미노산분유에서 β -lactoglobulin 잔류량을 조사한 결과 부분가수분해분유에서 완전가수분해분유보다 2,400–52,000배 더 높은 β -lactoglobulin이 검출되었으며, 완전유청단백가수분해분유와 완전카제인가수분해분유는 비슷한 수준이었다.⁷² 또한 아미노산분유는 제조회사에 따라서 20배 높게 β -lactoglobulin이 검출되는 경우도 있었고,⁷² 저항원성 분유에서 카제인 항원결정인자가 ELISA 분석에서 검출된 경우도 있었으며⁸⁴ 대두단백분유에서 β -lactoglobulin이 검출되는 경우가 있었다.⁸⁵ 한편, 우유성분을 포함하지 않는 대두단백가수분해물과 콜라겐가수분해물로 제조한 저항원성 분유에서도 카제인이 검출되는 사례가 있었다.⁸⁴ 생산 배치에 따라 카제인이 다른 농도로 검출되고, 특히 전혀 다른 단백질원을 사용한 제품에서도 카제인과 β -lactoglobulin과 같은 주요 알레르겐이 검출되는 등, 배치마다 적게는 2배에서 많게는 10배 정도 오염 정도가 차이가 나기 때문에 단백질가수분해물의 품질관리뿐만 아니라 저항원성 분유 제조과정 중 교차오염을 예방하기 위한 관리가 그 무엇보다 중요하다고 하겠다.

결론

저항원성 분유에서 가장 중요한 것은 유단백질가수분해물의 항원성과 특이면역반응을 유발하는 면역원성이라고 할 수 있다. 유단백질가수분해물의 항원성은 펩타이드의 분자량에 의해서 좌우된다고 볼 수 있다. 원료선택 단계에서 단백질은 펩타이드의 분자량에 대한 평가를 하여 용도에 따라서 완전가수분해분유는 3,000 Da 이하 그리고 부분가수분해분유는 10,000 Da 이상의 펩타이드는 존재하지 않는 유단백가수분해물을 선택하여야 한다. 또한 완전가수분해분유용 단백질가수분해물은 최소한 동물감작시험을 통해 *in vivo* 항원성을 평가하여야 하겠다. 더욱 중요한 것은 적합한 단백질가수분해물을 선택했다고 하더라도 제조시설 내부에서 공기를 통한 식품항원의 교차오염과 저항원성 분유가 아닌 분유들과 공유하는 생산공정에서 교차오염이 잔류 항원성을 결정하는 중요한 단계이기 때문에 제조공장 내부에서의 교차오염 방지는 중점적으로 관리되어야 한다.

REFERENCES

1. World Health Organization. Report of an expert consultation on the optimal duration of exclusive breastfeeding. Geneva (Switzerland): World Health Organization, 2012.
2. Institute of Medicine (U.S.), Committee on the Evaluation of the Addition of Ingredients New to Infant Formula, Food and Nutrition Board. Infant formula: evaluating the safety of new ingredients. Washington, DC: National Academies Press, 2004.22-42.
3. Aas K. The Biochemistry of food allergens: what is essential for future re-

- search? In: Schmit E, editor. Food allergy. New York: Vevey/Raven Press, Ltd., 1998:1-14. (Nestle Nutrition Workshop Series; v. 17).
4. Zeiger RS, Heller S, Mellon M, O'Connor R, Hamburger RN. Effectiveness of dietary manipulation in the prevention of food allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol* 1986;78(1 Pt 2):224-38.
 5. Schoch G. Milk protein and clinical nutrition. In: Barth CA, Schlimme E, editors. Milk proteins: nutritional, clinical, functional and technological aspects. Darmstadt: Stenikoff. 1988:299-301.
 6. Heppell LM. Determination of milk protein denaturation by an enzyme-linked immunosorbent assay. In: Morris BA, Clifford MN, editors. Immunoassay in food analysis. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1985:115-23.
 7. Ratner B, Dworetzky M, Oguri S, Aschheim L. Studies on the allergenicity of cow's milk. I. The allergenic properties of alpha-casein, beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin. *Pediatrics* 1958;22:449-52.
 8. Ratner B, Dworetzky M, Oguri S, Aschheim L. Studies on the allergenicity of cow's milk. II. Effect of heat treatment on the allergenicity of milk and protein fractions from milk as tested in guinea pigs by parental sensitization and challenge. *Pediatrics* 1958;22(4 Part 1):648-52.
 9. 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.
 10. Ratner B, Dworetzky M, Oguri S, Aschheim L. Studies on the allergenicity of cow's milk. III. Effect of heat treatment on the allergenicity of milk and protein fractions from milk as tested in guinea pigs by sensitization and challenge by the oral route. *Pediatrics* 1958;22(4 Part 1):653-8.
 11. Jakobsson I, Lindberg T, Benediktsson B. In vitro digestion of cow's milk proteins by duodenal juice from infants with various gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1982;1:183-91.
 12. Asselin J, Aniot J, Gauthier SF, Maurad W, Hebert J. Immunogenicity and allergenicity of whey protein hydrolysates. *J Food Sci* 1988;53:1208-11.
 13. Asselin J, Hebert J, Amiot J. Effect of in vitro proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J Food Sci* 1989;54:1037-9.
 14. Pahud JJ, Monti JC, Jost R. Allergenicity of whey protein: its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the protein. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985;4:408-13.
 15. Okamoto M, Rikimaru H, Enomoto A, Kaminogawa S, Yamauchi K. High pressure digestion of food proteins: selective elimination of β -lactoglobulin in bovine milk whey concentrate. *Agric Biol Chem* 1991; 55:1253-7.
 16. Schmidt DG. Association of caseins and casein micelle structure. In: Fox PF, editor. Development in dairy chemistry. London: Applied Science, 1982:61-86.
 17. Wal JM. Cow's milk proteins/allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89(6 Suppl 1):3-10.
 18. Farrell HM Jr, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, et al. Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J Dairy Sci* 2004;87:1641-74.
 19. Steinke M, Fiocchi A, Kirchlechner V, Ballmer-Weber B, Brockow K, Hischenhuber C, et al. Perceived food allergy in children in 10 European nations. a randomised telephone survey. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 143:290-5.
 20. Park M, Kim D, Ahn K, Kim J, Han Y. Prevalence of immediate-type food allergy in early childhood in seoul. *Allergy Asthma Immunol Res* 2014;6:131-6.
 21. Høst A, Husby S, Osterballe O. A prospective study of cow's milk allergy in exclusively breast-fed infants. Incidence, pathogenetic role of early inadvertent exposure to cow's milk formula, and characterization of bovine milk protein in human milk. *Acta Paediatr Scand* 1988;77:663-70.
 22. Gjesing B, Osterballe O, Schwartz B, Wahn U, Løwenstein H. Allergen-specific IgE antibodies against antigenic components in cow milk and milk substitutes. *Allergy* 1986;41:51-6.
 23. Restani P, Ballabio C, Di Lorenzo C, Tripodi S, Fiocchi A. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. *Anal Bioanal Chem* 2009;395:47-56.
 24. Bernard H, Créminon C, Yvon M, Wal JM. Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;115:235-44.
 25. Gaudin JC, Rabesona H, Choiset Y, Yeretsian G, Chobert JM, Sakanyan V, et al. Assessment of the immunoglobulin E-mediated immune response to milk-specific proteins in allergic patients using microarrays. *Clin Exp Allergy* 2008;38:686-93.
 26. Bernard H, Meisel H, Creminon C, Wal JM. Post-translational phosphorylation affects the IgE binding capacity of caseins. *FEBS Lett* 2000; 467:239-44.
 27. Shek LP, Bardina L, Castro R, Sampson HA, Beyer K. Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy* 2005;60:912-9.
 28. Ruiters B, Trégoat V, M'rabet L, Garssen J, Bruijnzeel-Koomen CA, Knol EF, et al. Characterization of T cell epitopes in alphas1-casein in cow's milk allergic, atopic and non-atopic children. *Clin Exp Allergy* 2006;36: 303-10.
 29. Schulmeister U, Hochwallner H, Swoboda I, Focke-Tejkl M, Geller B, Nystrand M, et al. Cloning, expression, and mapping of allergenic determinants of alphaS1-casein, a major cow's milk allergen. *J Immunol* 2009; 182:7019-29.
 30. Permyakov EA, Berliner LJ. alpha-Lactalbumin: structure and function. *FEBS Lett* 2000;473:269-74.
 31. Sawyer WH. Complex between beta-lactoglobulin and kappa-casein. A review. *J Dairy Sci* 1969;52:1347-55.
 32. Goldman AS, Sellars WA, Halpern SR, Anderson DW Jr, Furlow TE, Johnson CH Jr. Milk allergy. II. Skin testing of allergic and normal children with purified milk proteins. *Pediatrics* 1963;32:572-9.
 33. Freier S, Kletter B, Gery I, Lebethal E, Geifman M. Intolerance to milk protein. *J Pediatr* 1969;75:623-31.
 34. Lee JM, Yoon JS, Jeon SA, Lee SY. Sensitization patterns of cow's milk and major components in young children with atopic dermatitis. *Asia Pac Allergy* 2013;3:179-85.
 35. Lebethal E. Cow's milk protein allergy. *Pediatr Clin North Am* 1975;22: 827-33.
 36. Clement G, Boquet D, Frobert Y, Bernard H, Negroni L, Chatel JM, et al. Epitopic characterization of native bovine beta-lactoglobulin. *J Immunol Methods* 2002;266:67-78.
 37. Tsabouri S, Douros K, Priftis KN. Cow's milk allergenicity. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2014;14:16-26.
 38. Vila L, Beyer K, Järvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Sampson HA. Role of conformational and linear epitopes in the achievement of tolerance in cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1599-606.
 39. Lin J, Sampson HA. The role of immunoglobulin E-binding epitopes in the characterization of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9:357-63.
 40. Nowak-Węgrzyn A, Fiocchi A. Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9:234-7.
 41. Hartmann R, Wal JM, Bernard H, Pentzien AK. Cytotoxic and allergenic potential of bioactive proteins and peptides. *Curr Pharm Des* 2007;13: 897-920.
 42. Alder-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. New York: Ap-

- plied Science, 1986;57:131.
43. Fersht A. Enzyme structure and mechanisms. San Francisco: Freeman, 1999:38-43.
 44. De Masi RV, Dragonetti A, Florino G. Multiple food intolerance: dietary management with a new formula characterized by low allergenic activity and low osmolarity. *Riv Ital Pediatr* 1985;11:273-9.
 45. Jost R, Monti JC. Partial enzymatic hydrolysis of whey protein by trypsin. *J Dairy Sci* 1977;60:1387-93.
 46. Porter DH, Swaisgood HE, Catignani GL. Characterization of a immobilized digestive enzyme system for determination of protein digestibility. *J Agric Food Chem* 1984;32:334-39.
 47. Jost R, Monti JC, Pahud JJ. Whey protein allergenicity and its reduction by technological means. *Food Technol* 1987;41:118-21.
 48. Turgeon SL, Gauthier SF. Whey peptide fractions obtained with a two step ultrafiltration process: Production and characterization. *J Food Sci* 1990;55:106-10.
 49. Monti JC, Jost R, Pahud JJ, Hughes G. Antigenic sites in bovine beta-lactoglobulin [abstract]. *Experimentia* 1986;42:670.
 50. Ha WK, Juhn SL, Kim JW, Lee SW, Lee JY, Sohn DW. Reduction of the antigenicity of whey protein by enzymatic hydrolysis. *Korean J Food Sci Technol* 1994;26:74-80.
 51. Görtler I, Urbanek R, Forster J. Characterization of antigens and allergens in hypo-allergenic infant formulae. *Eur J Pediatr* 1995;154:289-94.
 52. Nakamura T, Sado H, Syukunobe Y. Antigenicity of whey protein hydrolysates fractionated with ultrafiltration membrane. *J Japan Soc Food Sci Technol* 1992;39:113-6.
 53. Simensma AD, Weijer WJ, Bak HJ. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends Food Sci Technol* 1990;4:16-21.
 54. Van Beresteijn EC, Peeters RA, Kaper J, Meijer R, Robben A, Schmidt D. Molecular mass distribution, immunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. *J Food Prot* 1994;57:619-25.
 55. Van Hoeyveld EM, Escalona-Monge M, de Swert LF, Stevens EA. Allergenic and antigenic activity of peptide fragments in a whey hydrolysate formula. *Clin Exp Allergy* 1998;28:1131-7.
 56. American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. Hypoallergenic infant formulas. *Pediatrics* 2000;106(2 Pt 1):346-9.
 57. Mead Johnson & Company. International direction of company histories [Internet]. Evansville (IN): Mead Johnson & Company; c2016 [cited 2016 Aug 30]. Available from: <http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-348000067.html>.
 58. Plebani A, Albertini A, Scotta S, Ugazio AG. IgE antibodies to hydrolysates of cow milk proteins in children with cow milk allergy. *Ann Allergy* 1990;64:279-80.
 59. Cordano A. Infant formula – clinical evaluation, its uses, and current feeding practices in the United States and developing countries. In: Vitale JJ, Broitman SA, editors. *Advances in human clinical nutrition*. London: Martinus Nijhoff, 1982:54-62.
 60. Morinaga Milk Industry Co., Ltd. Research history [Internet]. Tokyo: Morinaga Milk Industry Co., Ltd.; c2016 [cited 2016 Aug 30]. Available from: <http://morinagamilk.co.jp/research/about/history.html>.
 61. Nutricia - Expert in Early-life nutrition. Our long-standing history in science [Internet]. Schiphol (Netherlands): Danone Nutricia Early Life Nutrition; c2016 [cited 2016 Sep 12]. Available from: <http://www.nutriciael.com.hk/en/about>.
 62. Kim BY. Pioneering Korea's dairy industry: Maeil's first 33 years. Seoul: Maeil Dairy Industry Co. Ltd., 2005.
 63. Nutricia – Advanced medical nutrition. a history we are proud of [Internet]. Schiphol (Netherlands): Danone Nutricia Early Life Nutrition; c2015 [cited 2016 Sep 12]. Available from: <http://www.nutricia.com/about/our-history>.
 64. McLaughlan P, Anderson KJ, Coombs RR. An oral screening procedure to determine the sensitizing capacity of infant feeding formulae. *Clin Allergy* 1981;11:311-8.
 65. Knights R, Manes JD. Composition, molecular weight and antigenicity of casein hydrolyzates used in a formula for food allergic and malabsorptive infants. In: Candra RK, editor. *Food allergy*. St. John's New Foundland: Nutrition Research Education Foundation, 1985:273-85.
 66. Cordano A, Gastanaduy AS, Graham GG. Absorption and retention from an iso-osmol casein hydrolysates infant formula. *Nutr Res* 1988;8:1353-62.
 67. Galeano NF, Lepage G, Leroy C, Belli D, Levy E, Roy CC. Comparison of two special infant formulas designed for the treatment of protracted diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7:76-83.
 68. Walker-Smith JA, Digeon B, Phillips AD. Evaluation of a casein and a whey hydrolysate for treatment of cow's-milk-sensitive enteropathy. *Eur J Pediatr* 1989;149:68-71.
 69. Zeiger RS, Heller S, Mellon MH, Forsythe AB, O'Connor RD, Hamburger RN, et al. Effect of combined maternal and infant food-allergen avoidance on development of atopy in early infancy: a randomized study. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:72-89.
 70. Loeb H, Mozin MJ. Prevention of chronic diarrhea: nutritional implications. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983;2 Suppl 1:S328-34.
 71. Bertele-Harms RM, Harms HK. Experience with hypoallergenic formulas in the treatment of food allergy in infancy. In: Harms HK, Wahn U, editors. *Food allergy in infancy and childhood*. Berlin: Springer Verlag; 1989:177-87.
 72. Isolauri E, Sütas Y, Mäkinen-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.
 73. Cho J, Suh J, Lee JH, Han Y, Ahn K, Lee SI. Comparison of the effects of breast milk feeding with maternal restriction and hypoallergenic milk feeding on the acquisition of tolerance to cow milk. *Pediatr Allergy Respir Dis* 2011;21:207-14.
 74. Fritsche R. The role of immune tolerance in allergy prevention. In: HERNELL O, SCHMITZ J, editors. *Feeding during late Infancy and early childhood: Impact on Health*. Basel: Karger; 2005;56:1-14. (Nestle Nutrition Workshop Series Pediatric Program; v. 56).
 75. Bindels JG, Boerma JA. Hydrolysed cow's milk formulae. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5:189-90.
 76. Miraglia Del Giudice M, D'Auria E, Peroni D, Palazzo S, Radaelli G, Comberati P, et al. Flavor, relative palatability and components of cow's milk hydrolysed formulas and amino acid-based formula. *Ital J Pediatr* 2015;41:42.
 77. Host A, Halcken S. Hypoallergenic formulas: when, to whom and how long: after more than 15 years we know the right indication! *Allergy* 2004;59 Suppl 78:45-52.
 78. von Berg A, Koletzko S, Grühl A, Filipiak-Pittroff B, Wichmann HE, Bauer CP, et al. The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of life: the German Infant Nutritional Intervention Study, a randomized double-blind trial. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:533-40.
 79. Han YS, Park HY, Ahn KM, Lee JS, Choi HM, Lee SI. Short-term effect of partially hydrolyzed formula on the prevention of development of atopic dermatitis in infants at high risk. *J Korean Med Sci* 2003;18:547-51.
 80. Hays T, Wood RA. A systematic review of the role of hydrolyzed infant formulas in allergy prevention. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005;159:810-6.
 81. Knights RJ. Processing and evaluation of protein hydrolysates. In: Lifshitz

- F, editor. Nutrition for special needs. New York: Marcel Dekker, 1985: 105-15.
82. Cordle CT. Control of food allergies using protein hydrolysates. *Food Technol* 1994;48:72-6.
83. Rosendal A, Barkholt V. Detection of potentially allergenic material in 12 hydrolyzed milk formulas. *J Dairy Sci* 2000;83:2200-10.
84. Lorenz F, Seid M, Tangermann R, Wahn V. Detection of casein antigen in regular and hypoallergenic formula proteins by ELISA: characterization of formula protein fractions according to their molecular weight. In: Schmidt E, editor. *Food allergy*. New York: Raven Press, 1988:215-23. (Nestle Nutrition Workshop Series; v. 17).
85. Chatchatee P, Järvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:379-83.
86. Busse PJ, Järvinen KM, Vila L, Beyer K, Sampson HA. Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine alpha(s2)-casein in cow's milk allergic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;129:93-6.
87. Cerecedo I, Zamora J, Shreffler WG, Lin J, Bardina L, Dieguez MC, et al. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:589-94.
88. Chatchatee P, Järvinen KM, Bardina L, Vila L, Beyer K, Sampson HA. Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta- and kappa-casein in cow's milk allergic patients. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1256-62.
89. Järvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. IgE and IgG binding epitopes on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in cow's milk allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;126:111-8.
90. Hochwallner H, Schulmeister U, Swoboda I, Focke-Tejkl M, Civaj V, Balic N, et al. Visualization of clustered IgE epitopes on alpha-lactalbumin. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:1279-85.e9.