

유청단백질의 분리 및 단백질 분해 효소에 의한 유청단백질의 가수분해 양상

렌친핸드¹ · 배형철¹ · 정석근² · 남명수^{1*}

¹충남대학교 동물바이오시스템학과, ²농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과

Isolation of whey protein and hydrolysis pattern of whey protein by proteolytic enzyme

Renchinkhand¹, Hyoung Churl Bae¹, Seok Geun Jeong², Myoung Soo Nam^{1*}

¹Department of Animal Biosystem Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²National Institute of Animal Science, Rural Development Administration Suwon 441-706, Korea

Received on 1 November 2012, revised on 10 December 2012, accepted on 13 December 2012

Abstract : The aim of this study was to introduce a simple method for isolation of α -lactalbumin, β -lactoglobulin and bovine serum albumin from cow's milk, and peptides produced by enzymatic hydrolysis of α -lactalbumin, β -lactoglobulin and bovine serum albumin with alcalase. Whey protein were precipitated from whey by ammonium sulfate and, α -lactalbumin and β -lactoglobulin were isolated using Hi Prep 26/60 Sephacryl S-100 column gel filtration chromatography. Bovine serum albumin and β -lactoglobulin were isolated by Mono-Q 5/50 GL column anion exchange chromatography of the 50% Ammonium Sulfate-supernatant. Isolated whey proteins were hydrolyzed by proteolytic alcalase. Tricine SDS-PAGE and reverse-phase HPLC analyses revealed that almost hydrolyzed all the α -lactalbumin, β -lactoglobulin and bovine serum albumin with alcalase. Molecular weight of various peptides derived from alcalase hydrolysate were small molecular weight than 3.5 kDa.

Key words : Whey protein, Isolation, Enzymatic hydrolysis, Peptide

I. 서론

치즈 부산물인 유청은 다양한 기능적 영양적 및 생리 활성적 기능을 가지는 단백질이 풍부한 혼합물이다. 유청의 조성은 α -lactalbumin(α -LA), β -lactoglobulin(β -LG), immunoglobulin 및 bovine serum albumin(BSA) 등을 함유하며, 그밖에 유지방구막 단백질(milk fat globule membrane proteins)과 미량 단백질(lactoferrin, transferrin, lysozyme 등) 및 효소들과 cytokines 등을 함유한다. 유청 단백질은 우유 단백질 중 약 20%를 차지한다(Fox, 1989). 유청 단백질의 주된 성분은 α -LA, β -LG, immunoglobulin 및 BSA으로 알려져 있다(Walzem et al., 2002). 최근에는 유청은 기능성 식품과 유아용 조제분유용의 단백질 급원으로써 훌륭한 평판을 얻고 있다(Clemente, 2000). 유청 단

백질 가수분해물들은 생리적으로 여러 가지 불만족스럽고 비정상적인 환자를 영양학적으로 지원하는데 광범위하게 이용되고 있다(Halken and Host, 1997). 우유단백질을 효소 가수분해한 연구들을 보면 유청단백질을 trypsin, papain으로 가수분해하여 얻은 peptide 중에는 철 결합 능력이 있는 peptide를 얻었고(Kim et al., 2007), β -LG을 pepsin으로 가수분해하여 항원성의 변화와 IgE 결합 peptide에 관한 보고가 있었다(Chicon et al., 2008). 우수한 생리활성 기능을 가지는 몇몇 peptide는 효소에 의한 유청 단백질의 가수분해로 밝혀졌는데 예를 들면 opioid peptide(Meisel and FitzGerald, 2000), angiotensin I-converting 효소 저해 peptide(Gobbetti et al., 2004), antithrombotic peptide(Chabance et al., 1995), 면역조절 peptide(Mercier et al., 2004) 그리고 무기질 수송 peptide(Kim and Lim, 2004) 등이 있다. 유청단백질의 분리 정제에 대해 Neyestani 등(2003)은 염산으로 casein의 등전점을 이용하여 유청을

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5782

E-mail address: namssoo@cnu.ac.kr

분리하여 ammonium sulfate로 처리하고 침전물은 gel filtration 후 β -LG를 분리하고, 상징액은 ion-exchange chromatography 후 α -LA와 BSA를 분리하는 방법을 확립하였다. 본 연구의 목적은 원유로부터 유청 단백질인 α -LA, β -LG와 BSA를 분리하고 alcalase 효소를 이용하여 가수분해시킨 후 생성되는 peptide의 양상을 조사하고, 향후 생성된 peptide의 다양한 생리활성 기능을 연구하기 위한 기초 자료를 제공하는데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 원유로부터 유청 준비

충남대학교 농업생명과학대학 동물자원연구센터에서 홀스타인 젖소로부터 착유한 신선한 원유를 사용하였다. 신선한 원유 1 L를 탈지유로 제조한 후에 0.5 M HCl로 우유의 등전점인 pH 4.6으로 조절하고 16,000×g에 15분 동안 원심분리 하여 casein과 유청으로 분리하였다. 분리된 유청을 분자량 10,000 dalton인 투석막으로 24시간 투석하여 유당과 무기물 성분을 제거하고 동결 건조하여 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 원유 1 리터로부터 동결 건조하여 5.8 g의 유청 단백질을 얻었다.

2. β -LG, α -LA와 BSA의 분리 정제

β -LG, α -LA와 BSA의 분리 정제는 Neyestani 등(2003)이 제시한 방법으로 수행하였다. Gel filtration chromatography 조건은 동결 건조한 유청 분말에 50% Ammonium sulfate를 처리하여 4°C 냉장고에 24시간 방치 후 원심 분리하여 침전물과 상징액을 분리하여 동결건조 후 정제에 사용하였다. 침전물을 Hi Prep 26/60 Sephacryl S-100 column(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 FPLC 장치에 장착시키고 gel filtration chromatography를 수행하였다. 정제 조건은 50% ammonium sulfate 처리한 유청 단백질 침전물 10 mg/mL(2 mL)를 주입시키고 elution buffer는 0.02 M Tris buffer(pH 8.6), 유속은 0.8 mL/min로 하고, 분획 양은 2 mL/tube로 하였다.

Anion-exchange chromatography 조건은 동결 건조한 유청 분말에 50% ammonium sulfate를 처리하여 4°C 냉장고에 24시간 방치 후 원심분리하여 침전물과 상징액을 분리하여 동결건조 후 정제에 사용하였다. 상징액은 Mono-Q

5/50 GL column(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 HPLC(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 장치에 장착 후 anion-exchange chromatography를 수행하였다. 정제 조건은 50% ammonium sulfate 처리한 유청 단백질 침전물 10 mg/mL(2 mL)를 주입시키고, NaCl 0.1, 0.2, 0.3 0.4, 1.0 M step gradient와 0.1~0.25 M linear gradient 두 가지 방법으로 분리하였고, elution buffer는 0.05 M Tris buffer, pH 6.5, 유속은 1 mL/min로 하고, 분획 양은 1 mL/tube로 하였다.

3. 유청 단백질의 가수분해, 전기영동 및 HPLC 양상

분리된 유청 단백질, α -LA, β -LG, BSA를 40°C에서 alcalase로 180분 동안 가수분해시키고 분해된 산물을 tricine gel을 사용하여 전기영동을 하였고 HPLC로 분해 양상을 관찰하였다. 유청 단백질의 전기영동 패턴의 확인은 Laemmli(1970)의 방법을 변형하여 SDS-PAGE에 의해 측정하였다. SDS-PAGE는 12% acrylamide gel, 10% SDS를 함유한 1.5 M Tris(pH 8.8)와 0.5 M Tris(pH 6.8), 10% ammonium persulfate(APS)를 조제하여 사용하였다. Gel은 0.2%(w/v) comassie brilliant blue R-250 (Sigma Co, USA)을 함유한 acetic acid/methanol/water(1:1:5, v/v/v) 용액으로 염색하였으며, 탈색은 acetic acid/methanol/water(1:3:6, v/v/v) 용액으로 하였다. Standard marker로는 pre-stained broad range standard (Bio-Rad, USA)를 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. β -LG와 α -LA의 분리

50% ammonium sulfate를 처리해서 분리한 침전물의

Table 1. Operation condition of HPLC.

Column	protein C18 (4.6×250 mm)
Flow rate	1 mL/min.
Elution solution	A : 0.1% TFA (distilled water) B : 0.1% TFA (acetonitrile)
Elution time	40min(linear gradient)
Injection volume	20 uL (2 mg/ml), non-hydrolysates 20 uL (5 mg/ml), hydrolysates
Absorbance	214 nm

gel filtration chromatography(A) 결과는 Fig. 1의 (a), (b)와 같다. (a)와 (b)는 각각 gel filtration과 전기영동(B)을 한 결과로 fraction ④는 β -LG, fraction ⑤는 α -LA로 확인되었는데, elution volume 90~180 mL 사이에서 5개의 peak를 얻었고 1, 2, 3 peak는 물질들이 서로 혼합되어 나타났고, 4, 5번 peak는 완전히 분리되어 나타났다. Lane 1은 50% ammonium sulfate 처리한 침전물로 BSA, β -LG, α -LA이 주성분을 이루고 있다. Lane 2는 peak 1으로 BSA가 아주 약하게 보였고 Lane 3은 peak 2로 BSA와 β -LG이 강하게 나타났다. Lane 4는 peak ③으로 유단백질이 거의 보이지 않았고, Lane 5는 peak ④로 β -lactoglobulin이 주성분이고, Lane 6은 peak ⑤로 α -LA이 단일 성분으로 나타났다. 이들은 Lane 7의 표준품 β -LG, Lane 8의 표준품 α -LA 그리고 Lane 9의 표준품 BSA과 비교해 보면 표준품과 같은 위치에 각각의 성분이 있음을 알 수 있다. 따라서

Hi Prep 26/60 Sephacryl S-100 column gel filtration chromatography에서는 β -LG과 α -LA을 분리 할 수 있었다.

2. BSA의 분리

Fig. 1의 lane 3에서 peak ②는 BSA와 β -LG이 혼합되어 있는 것으로 확인되어 ②를 회수하여 Anion-exchange chromatography(segmented gradient)를 수행했다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 Mono-Q 5/50 GL column을 이용하여 anion exchange chromatography(A)를 수행하여 분리하였다. Anion exchange chromatography를 수행한 결과는 step gradient에서 0.1 M NaCl에서 peak ①, 0.2 M NaCl에서 peak ②가 나타났고, 0.3 M NaCl에서 peak 하나, 0.4 M NaCl에서 peak 하나는 아주 약하게 나타났다. 전기영동(B) 결과에 나타난 바와 같이 Lane 1은 50%

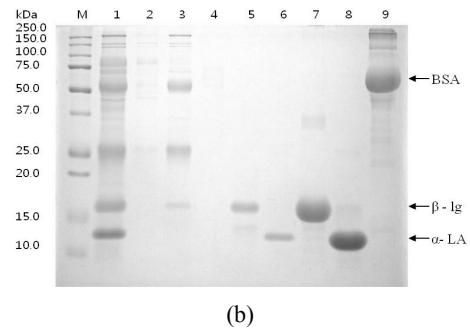
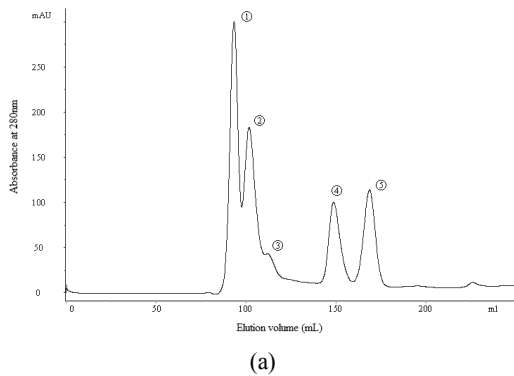


Fig. 1. (a) Gel filtration chromatography of precipitate of whey protein treated with 50% ammonium sulfate. (b) SDS-PAGE of the different steps in the purification of whey protein. M: Molecular mass of standard proteins in the range from 10 to 250 kDa. Lane 1: Precipitate after treatment of 50% ammonium sulfate. Lane 2 to 6: Fraction of gel filtration chromatography (Hi Prep 26/60, Sephacryl S-100 column). Lane 7: β -globulin. Lane 8: α -albumin. Lane 9: Bovine serum albumin.

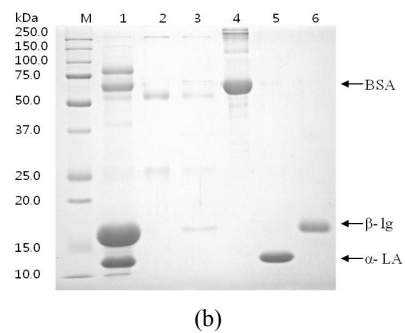
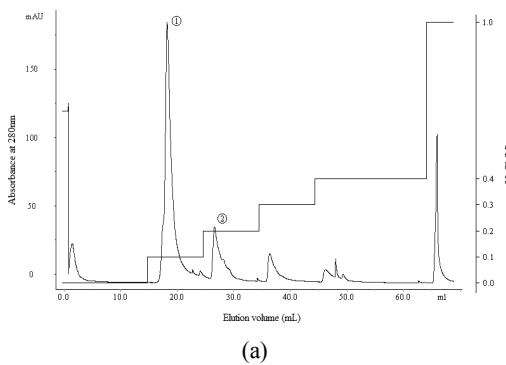


Fig. 2. (a) Anion exchange chromatography (Segmented gradient) of peak 2 from gel filtration chromatography of precipitate. (b) SDS-PAGE of the different steps in the purification of whey protein. M: Molecular mass of standard proteins in the range from 10 to 250 kDa. Lane 1: Precipitate after treatment of 50% ammonium sulfate. Lane 2 and 3: Fraction of anion-exchange chromatography of gel filtration chromatography peak ②. Lane 4: Bovine serum albumin. Lane 5: α -albumin. Lane 6: β -globulin.

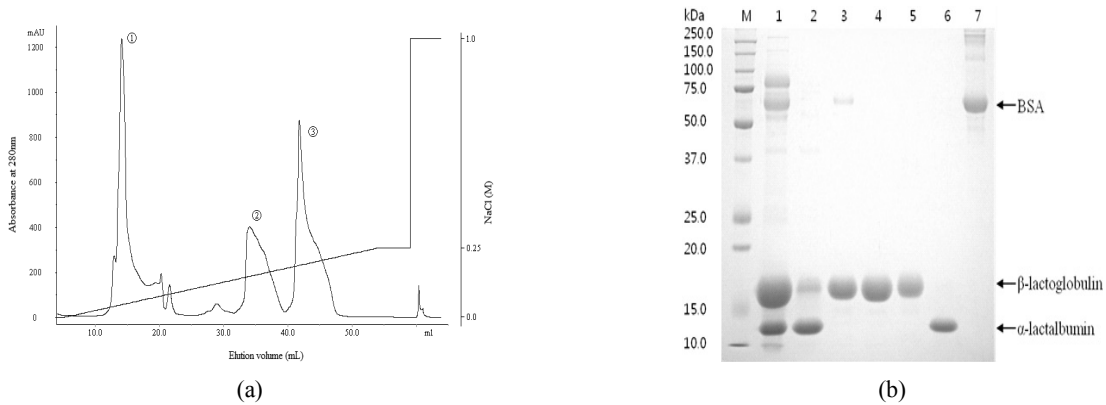


Fig. 3. (a) Anion exchange chromatography (linear gradient) of supernatant of whey protein treated with 50% ammonium sulfate. (b) SDS-PAGE of the different steps in the purification of whey protein. M: Molecular mass of standard proteins in the range from 10 to 250 kDa. Lane 1: Supernatant after treatment of 50% ammonium sulfate. Lane 2 to 4: Fraction of anion-exchange chromatography (Mono Q HR 5/50 column). Lane 5: β -globulin. Lane 6: α -albumin. Lane 7: Bovine serum albumin.

ammonium sulfate 처리한 침전물로 BSA, β -LG, α -LA 이 주성분을 이루고 있다. Lane 2 는 peak ①로 BSA가 강하게 보였고 Lane 3는 peak ②로 BSA와 β -LG이 아주 약하게 나타났다. 이들은 Lane 4의 표준품 β -LG, Lane 5의 표준품 α -LA 그리고 Lane 6의 표준품 BSA과 비교해 보면 표준품과 같은 위치에 각각의 성분이 있음을 알 수 있다. 따라서 Mono-Q 5/50 GL column을 이용하여 anion-exchange chromatography를 수행하여 BSA를 분리 할 수 있었다.

3. BSA와 β -LG

Anion exchange chromatography를 수행한 결과는 Fig. 2의 step gradient에서 0.1 M NaCl에서 peak ①, 0.2 M NaCl에서 peak ②가 나타났고, 0.3 M과 0.4 M NaCl에서 peak가 보이지 않았다. 따라서 0.2 M NaCl에서 peak ① ②로 분리된 것을 단일 peak로 분리하기 위해서 linear gradient를 실시하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 50% ammonium sulfate를 처리하여 얻은 상등액을 Mono-Q 5/50 GL column을 이용하여 anion-exchange chromatography를 수행하여 BSA와 β -LG을 분리하였다. linear gradient anion-exchange chromatography를 수행한 결과 0.05 M NaCl에서 peak ①, 0.15 M NaCl에서 peak ②, 0.20 M에서 peak ③이 나타났다. 전기영동 결과에 나타난 바와 같이 Lane 1은 50% ammonium sulfate 처리한 침전물로 BSA, β -LG, α -LA이 주성분을 이루고 있다. Lane 2 는 peak ①로 α -LA이 강하게 보였고 β -LG

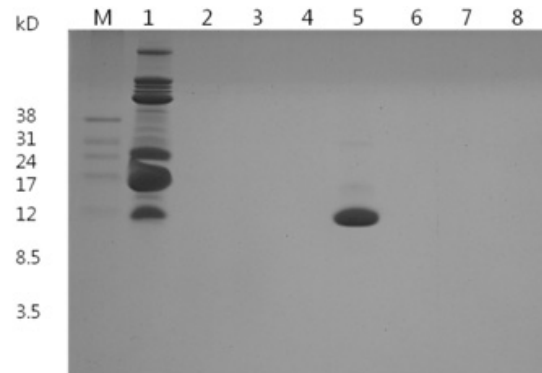


Fig. 4. Tricine gel of whey protein (WP) and α -LA hydrolyzed by alcalase at 40°C (1:100, v/v). M: Standard marker, 1: Whey protein 2: Whole whey protein hydrolyzate, 3: 3.0 kD above hydrolyzate of WP, 4: 3.0 kD below hydrolyzate of WP, 5. α -LA, 6: Whole hydrolyzate of α -LA, 7: 3.0 kD above hydrolyzate of α -LA, 8: 3.0 kD below hydrolyzate of α -LA.)

도 약하게 나타났다. Lane 3는 peak ②로 β -LG이 아주 강하게 나타났고 BSA가 약하게 나타났다. Lane 4는 β -LG 이 단일 상분으로 아주 강하게 나타났는데, 이들은 Lane 5의 표준품 β -LG, Lane 6의 표준품 α -LA, 그리고 Lane 7의 표준품 BSA와 비교해 보면 표준품과 같은 위치에 각각의 성분이 있음을 알 수 있다. 따라서 Mono-Q 5/50 GL column을 이용하여 anion-exchange chromatography를 수행하여 β -LG을 분리할 수 있었다.

4. 유청단백질, α -LA, β -LG과 BSA의 가수분해물에 대한 전기영동 양상

Fig. 4는 40°C에서 alcalase로 유청단백질과 α -LA를

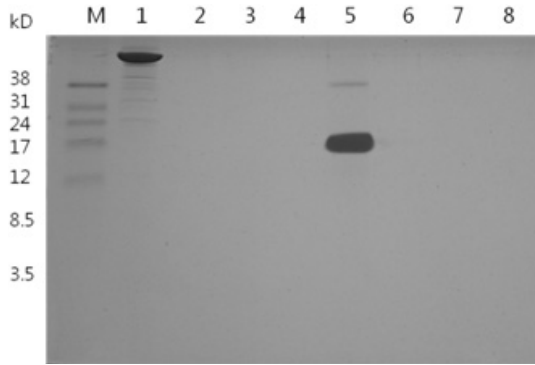
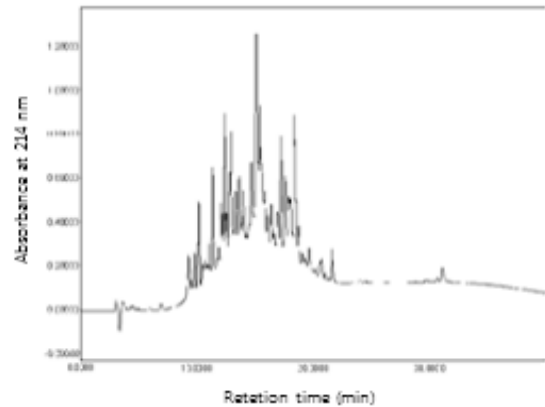


Fig. 5. Tricine gel of BSA and β -LG hydrolyzed by alcalase at 40°C (1:100, v/v). M: Standard marker, 1: BSA 2: Whole BSA hydrolyzate, 3: 3.0 kD above hydrolyzate of BSA, 4: 3.0 kD below hydrolyzate of BSA, 5: β -LG, 6: Whole hydrolyzate of β -LG, 7: 3.0 kD above hydrolyzate of β -LG, 8: 3.0 kD below hydrolyzate of β -LG.

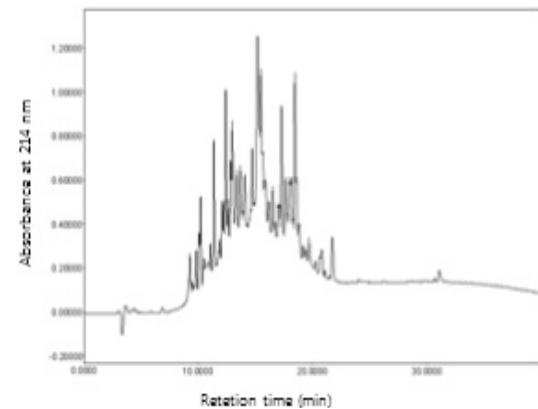
180분 동안 가수분해시킨 분해물을 Tricine gel을 이용하여 전기영동을 수행한 것이다. 대조구인 유청단백질과 α -LA를 비교해 보면 alcalase 효소의 반응시간이 경과하면서 유청단백질과 α -LA이 잘 분해됨을 알 수 있다. Alcalase로 처리한 유청단백질과 α -LA은 저분자 peptide로 분해되었기 때문에 Tricine gel 전기영동에서는 나타나지 않았다. Fig. 5는 40°C에서 alcalase로 BSA과 β -LG를 180분 동안 가수분해시킨 분해물을 Tricine gel을 이용하여 전기영동을 수행한 것이다. 대조구인 BSA과 β -LG를 비교해 보면 alcalase 효소의 반응시간이 경과하면서 BSA과 β -LG이 잘 분해됨을 알 수 있다. Alcalase로 처리한 BSA과 β -LG은 저분자 peptide로 분해되었기 때문에 Tricine gel 전기영동에서는 나타나지 않았다.

5. 유청단백질, α -LA, β -LG과 BSA 가수분해물에 대한 HPLC 양상

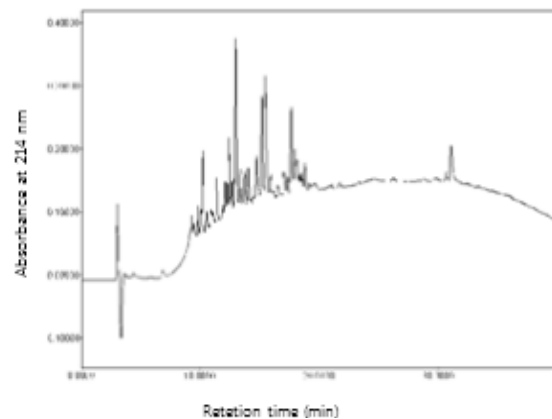
Alcalase에 의한 가수분해물의 HPLC 양상은 Fig. 6, 7, 8, 9에 나타난 바와 같다. HPLC 결과를 보면 180분 동안 가수분해 시킨 가수분해물은 대조구에 비해 여러 종류의 peak가 나타남으로써 분자량이 작은 peptide가 많이 생성되었음을 확인 할 수 있었다. Fig. 6은 유청 단백질 가수분해물에 대한 HPLC 양상을 나타낸 것으로 유청단백질 가수분해물 전체는 (A), 유청 단백질 가수분해물에 대한 분자량 3 kD 이상은 (B), 유청 단백질 가수분해물에 대한 분자량 3 kD 이하는 (C)에 나타난 바와 같다. Fig. 6에 나타난 바와



(A)



(B)



(C)

Fig. 6. Whey protein hydrolysate by alcalase in ratio 1:100 (v/v) for 180 min separated by centricron. (A) Hydrolysates (B) Above 3.0 kD hydrolysates (C) Below 3.0 kD hydrolysates

같이 (A)와 (B)는 다양한 형태의 peak가 나타났고 분자량 3 kD 이하의 (C)는 peak가 다양하지만 (A)와 (B)에 비해 peak의 수가 적은 것으로 나타났다. 이와 같이 유청 단백질은 가수분해에 의해분자량이 작은 peptide가 잘 생성된 것으로 확인되었다.

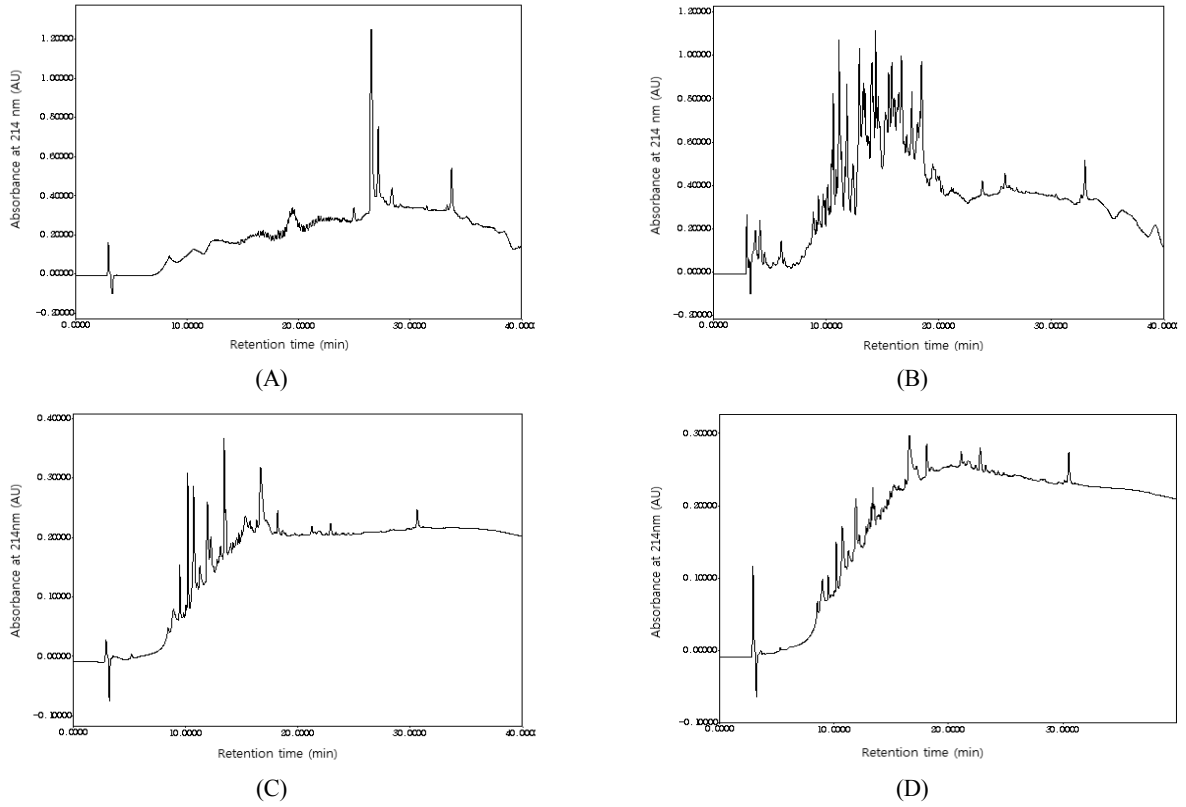


Fig. 7. BSA hydrolysates by alcalase in ratio 1:100 (v/v) for 180 min. (A) BSA (B) Hydrolysates (C) Above 3.0 kD hydrolysates (D) Below 3.0 kD hydrolysates.

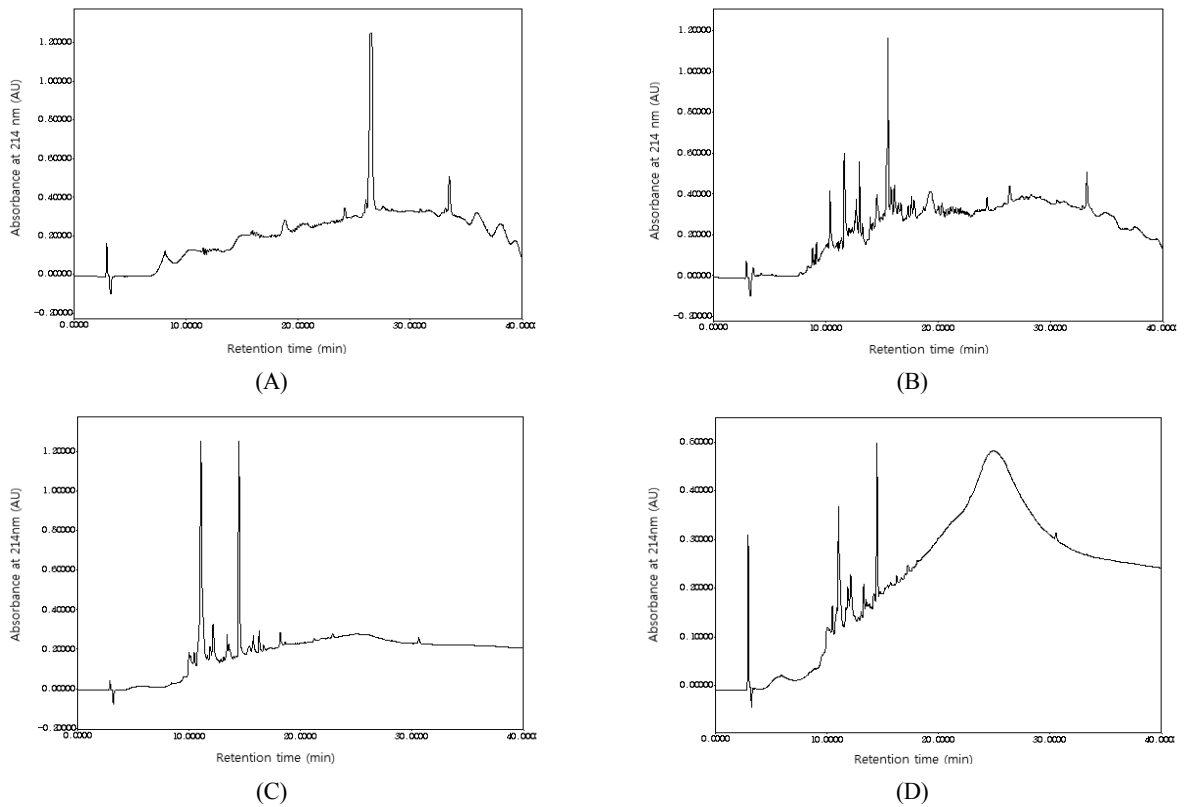


Fig. 8. α -LA hydrolyzate by alcalase in ratio 1:100 (v/v) for 180 min. (A) α -LA (B) Hydrolysates (C) Above 3.0 kD hydrolysates (D) Below 3.0 kD hydrolysates

Fig. 7은 대조구인 BSA에 대한 HPLC 양상은 (A), BSA 가수분해물 전체의 HPLC 양상은 (B), BSA 가수분해물의 분자량 3 kD 이상은 (C), BSA 가수분해물의 분자량 3 kD 이하인 (D)에 나타낸 것이다. 대조구인 (A)는 불순물이 거의 없는 단일 peak를 나타내는 반면에 (B)는 BSA 전체 가수분해물로 비슷한 크기의 다양한 peak가 생성되었음을 알 수 있었다. BSA 가수분해물의 분자량 3 kD 이상인 (C)와 BSA 가수분해물의 분자량 3 kD 이하인 (D)는 (B)에 비해 다양한 형태의 peak가 나타난 것으로 보아 분자량이 작은 peptide가 잘 생성된 것으로 확인되었다. Fig. 8은 대조구인 α -LA에 대한 HPLC 양은 (A), α -LA 가수분해물은 (B), α -LA 가수분해물의 분자량 3 kD 이상은 (C), α -LA 가수분해물의 분자량 3 kD 이하인 (D)에 나타낸 것이다. 대조구인 (A)는 단일 peak를 나타내는 반면에 α -LA 가수분해물 전체인 (B)는 대조구인 (A)에 비해 다양한 peak가 생성되었음을 알 수 있었다. α -LA 가수분해물의 분자량 3 kD 이상은 (C), α -LA 가수분해물의 분자량 3 kD 이하인 (D)에 나타난 바와 같이 큰 peak와 작은 peak가 다양한데 이는 분자량이 작은 peptide가 잘 생성되었음을 나타낸 것이다. Fig. 9는 대조구인 β -LG에 대한 HPLC 양상은 (A),

β -LG 가수분해물 전체는 (B), β -LG 가수분해물의 분자량 3 kD 이상은 (C), β -LG 가수분해물의 분자량 3 kD 이하인 (D)의 HPLC 양상을 나타낸 것이다. (A)는 단일 peak를 나타내는 반면에 (B)는 β -LG 가수분해물 전체로 다양한 형태의 peak가 나타났음을 알 수 있었고, β -LG 가수분해물의 분자량 3 kD 이상인 (C)는 크고 작은 peak가 여러 개 나타났고, β -LG 가수분해물의 분자량 3 kD 이하인 (D)는 (C)에 비해 peak 수가 적게 나타났는데 β -LG 가수분해물 전체적으로는 다양한 peptide의 생성이 잘 이루어졌다.

효소에 의한 유청 단백질 가수분해물에 대한 보고는 Kim 등(2007)은 열처리시킨 유청 단백질을 trypsin, papain, alcalase, flavourzyme 으로 가수분해하여 철 결합 능력 항원성 단백질에 대한 연구에서, alcalase가 다른 효소에 비해서 철 결합 peptide의 생성에 더 효과적이었다고 보고하였다. 또한 Qi 등(2007)은 bovine casein의 pepsin 가수분해물에 대한 분자량의 분포에 관해서 보고하였다. Chicon 등(2008)은 pepsin과 고압처리로 β -LG를 가수분해하여 가수분해된 양상, 항원성과 IgE 결합에 관한 연구 보고를 하였다. 가수분해 처리동안 고압처리를 하였을 경우 항원성과 IgE 결합능이 동시에 감소한 것으로 보고하였다.

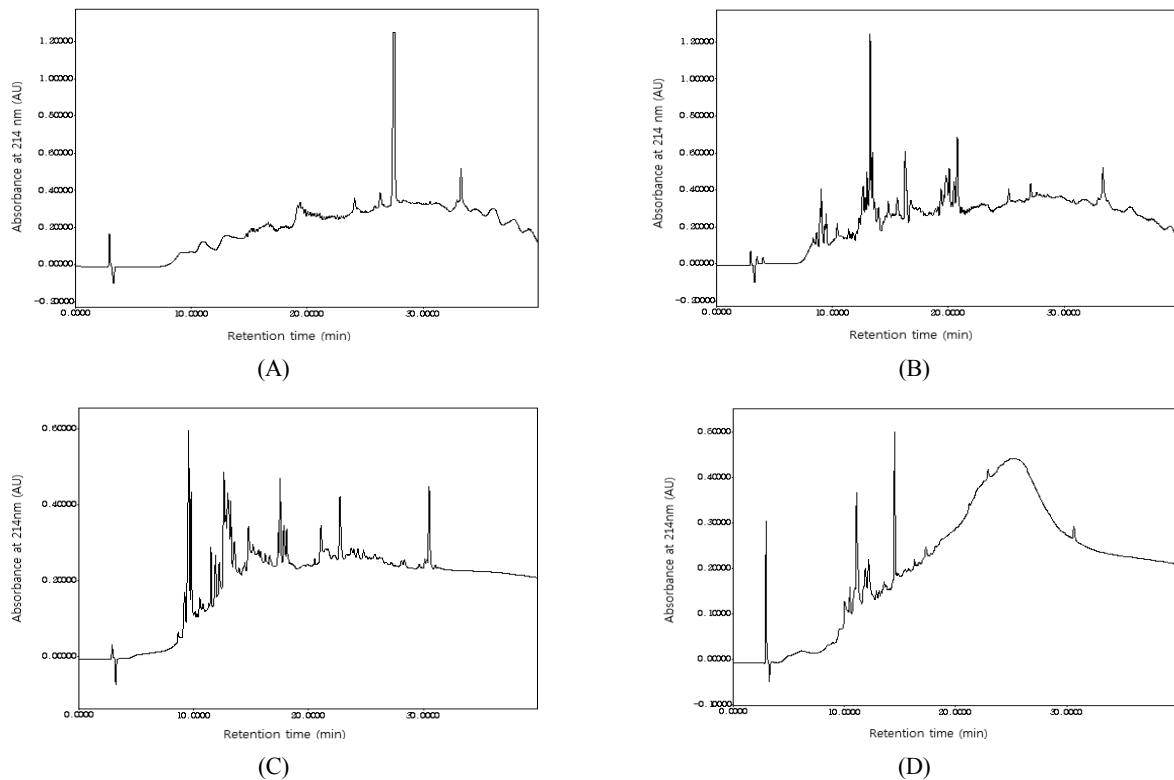


Fig. 9. β -LG hydrolyzate by alcalase in ratio 1:100 (v/v) for 180 min. (A) β -LG (B) Hydrolysates (C) Above 3.0 kD hydrolysates (D) Below 3.0 kD hydrolysates

IV. 결론

분리한 유청 단백질을 50% ammonium sulfate 처리하여 침전물과 상등액으로 분리하고, 침전물은 Hi Prep 26/60 Sephacryl S-100 column gel filtration chromatography를 이용하여 β -LG와 α -LA를 분리하였다. 또한 Hi Prep 26/60 Sephacryl S-100 column gel filtration chromatography에서 BSA와 β -lactoglobulin이 혼합되어 있는 분획을 Mono-Q 5/50 GL column anion exchange chromatography를 수행하여 BSA를 분리하였다. 50% ammonium sulfate를 처리하여 얻은 상등액을 Mono-Q 5/50 GL column을 이용하여 linear gradient anion-exchange chromatography를 수행하여 BSA와 β -LG를 분리하였다. 분리된 유청 단백질인 BSA, β -LG와 α -LA은 alcalase 효소처리를 하여 다양한 저분자 peptides를 얻었다. 이러한 결과는 기능성 유제품 개발에 필요한 기초자료 제공과 신제품 개발에 크게 기여 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립축산과학원(2011~2012년)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Chabance B, Jolles P, Izquierdo C, Mazoyer E, Francoual C, Drouet L, Fiat AM. 1995. Characterization of an antithrombotic peptide from κ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *British Journal of Nutrition*. 73:583-590.
- Clementa A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science Technology*. 11:254-262.
- Chicon R, Lopez-Fandino R, Alonso E, Belloque J. 2008. Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin E binding of β -lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatments. *Journal of Dairy Science*. 91: 928-938.
- Fox PF. 1989. The milk protein system. pp 1-53. *Developments in Dairy Chemistry*. Vol. 4, P.F. Fox, ed. Elsevier Applied Science, London, UK.
- Gobbetti M, Minervini F, Rizzello CG. 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*. 57: 173-188.
- Halken S, Host A. 1997. How hypoallergenic are hypoallergenic cow's milk-based formulas? *Allergy* 52:1175-1183.
- Kim SB, Lim JW. 2004. Calcium-binding peptides derived from tryptic hydrolysates of cheese whey protein. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 17:1459-1464.
- Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Nam MS, Kim HS. 2007. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*. 17:625-631.
- Marshall K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Alternation Medical Review*. 9:136-156.
- Meisel H, Fitzgerald J. 2000. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition*. 84: S27-S31.
- Mercier A, Gauthier SF, Fliss I. 2004. Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *International Dairy Journal*. 14:175-183.
- Neyestani TR, Djalali M, Pezeshki M. 2003. Isolation of α -lactalbumin, β -lactoglobulin and bovine serum albumin from cow's milk using gel filtration and anion-exchange chromatography including evaluation of their antigenicity. *Protein Expression and Purification*. 29:202-208.
- Qi W, Su RX, He ZM, Zhang YB, Jin FM. 2007. Pepsin-induced changes in the size and molecular weight distribution of bovine vcasein during enzymatic hydrolysis. *Journal of Dairy Science*. 90:5004-5011.
- Walzem RL, Dillard CJ, German JB. 2002. Whey components: millennia of evaluation creat functionalities for mammalian nutrition: What we know and what we may be overlooking. *Critical Review of Food Science and Nutrition*. 42:353-375.