

# Alcalase에 의한 유청단백질 가수분해물의 항원성 저감 효과

유재민<sup>1</sup> · 렌친핸드<sup>1</sup> · 정석근<sup>2</sup> · 백승희<sup>3</sup> · 남명수<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 동물바이오시스템학과, <sup>2</sup>농촌진흥청 축산과학원 축산물이용과, <sup>3</sup>천안연암대학 외식산업계열

## Reduction in antigenicity of whey protein by alcalase

Renchinkhand<sup>1</sup>, Hyoung Churl Bae<sup>1</sup>, Seok Geun Jeong<sup>2</sup>, Seung-Hee Paik<sup>3</sup>, Myoung Soo Nam<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Lab. of Milk Food Biochemistry and Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>National Institute of Animal Science, Rural Development Administration Suwon 441-706, Korea

<sup>3</sup>Div. of Food Service Industry, Cheonan Yonam College, Cheonan 331-802, Korea

Received on 25 November 2013, revised on 16 December 2013, accepted on 16 December 2013

**Abstract :** The aim of this study was to produce enzymatic hydrolysis of  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG and BSA with alcalase for the possible application of hypoallergenic foods toward cow's milk allergenic infant. The molecular weights of most of the peptides in hydrolysates from  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG and BSA by alcalase were below 3,000 dalton. Antigenicity of  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG and BSA hydrolysates to rabbit anti- $\alpha$ -LA antiserum,  $\beta$ -LG antiserum and BSA antiserum were remarkably decreased by more than  $10^3$  at 20% inhibition rate. Antigenicity of polyvalent antigenic peptide in  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG and BSA hydrolysates to specific rabbit anti- $\alpha$ -LA antiserum,  $\beta$ -LG antiserum and BSA antiserum was determined by PCS test using guinea-pig. Hydrolysates of  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG and BSA with less than 3,000 dalton did not show polyvalent antigenic reaction against rabbit antiserum. Hydrolysates of  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG and BSA could be a source for the manufacturing of hypoallergenic food.

**Key words :**  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG, BSA, Enzymatic hydrolysis, Antigenicity

## I. 서론

유청(whey)이란 치즈제조 과정에서 얻어지는데 우유 농축물인 커드를 제외한 나머지 수용성 부분을 총칭해서 이르는 말로 다양한 유효성분들을 함유하고 있는 부산물이다. 이 중 유청단백질은 케이스인과 더불어 유단백질에 주된 구성성분으로 유단백질 전체에서 케이스인이 약 77%, 유청단백질이 약 23%를 차지하고 있다. 유청단백질은 폭 넓은 생리활성 기능을 가지고 있는 것으로 알려지고 있는데 유청에 포함된 유청단백질은  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, bovine serum albumin, lactoferrin, immunoglobulin, enzymes, glycomacropetides 등으로 면역활성의 향상뿐만 아니라 필수아미노산을 공급한다(Marshall, 2004). 이와 같이 영양학적 측면에서 매우 우수한 식품임에 분명

하나 일부 성분은 영유아의 알레르기 질환과 관련이 있는 것으로 밝혀지고 있다(Burks et al., 1990; Sampson, 1997).

모유 수유가 여러 가지 이유로 어려운 경우 신생아나 영유아는 조제분유를 섭취 할 수밖에 없는 실정인데, 조제분유 제조시 우유 단백질 성분 특히 유청단백질은 알레르기를 유발하는 원인 물질로 알려지고 있다(Sampson, 1997). 유청단백질 중 알레르겐으로 작용하는 단백질은  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -lactoglobulin( $\beta$ -LG), Bovine Serum albumin (BSA)으로 알려져 있다(Burks et al., 1990; Sampson, 1997). 우유단백질을 기본 성분으로 제조된 분유를 섭취한 영유아 중 약 2.5%는 우유알레르기 증상을 겪는데 알레르기가 유발된 영유아 대부분은 3년이 경과하면 자연 치유가 되지만, 극소수 어린이는 천식, 아토피, 또는 계란 알레르기 같은 증상이 지속적으로 발달하는 위험성이 증가된다(Saarinen et al., 2005; Sicherer and Sampson, 2010). 우유단백질 알레르기로 고통 받는 환자들은 여러 종류의

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

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

우유단백질에 대한 IgE 반응이 발달된다. 유청단백질로부터는 α-LA와 β-LG, 케이스인 단백질로부터는 αS1-, αS2-, β-과 κ- 들이 주로 감작되게 된다(Wal, 1998). 따라서 우유단백질의 알레르겐 감작을 줄이기 위해 연구 개발된 우유단백질의 부분가수분해물이 알레르기 질환의 예방목적으로 적극 권유되고 있다(Friedman and Zeiger, 1996).

본 연구는 α-LA, β-LG와 BSA에 대한 항체를 제작하여 alcalase로 가수분해한 가수분해물에 대하여 분자량 3,000 dalton 이상과 이하로 나누어 항원 항체 반응을 통한 항원성 저감 효과와 Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA) test를 통한 항원성 저감 효과를 확인하여 유청단백질에 대한 알레르기 예방 및 식품소재로 이용하기 위한 기초자료를 제공하기 위하여 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 유청단백질 가수분해

α-LA, β-LG, BSA의 가수분해물 제조는 40°C에서 alcalase(Sigma, MO, USA)를 1:100(v/v)로 희석하여 가수분해를 실시하였다.

HPLC 분석에 사용한 column과 작동조건은 다음과 같다.

Column : protein C18(4.6 × 250 mm)

Flow rate : 1 ml/min

Elution solution ; A : 증류수에 0.1% TFA

B : acetonitrile에 0.1% TFA

Elution method : linear gradient

Elution time : 40 min

Infection volume : 유청단백질 가수분해물 20 ul

Absorbance : 214 nm

### 2. 항체 제작

항체 제작은 (주)영인과학(평택, 한국)에 의뢰하여 제작하였다. 즉, 실험용 토끼로부터 α-lactalbumin, β-lactoglobulin, BSA를 복강 주사하여 1차 면역시키고 4주일 경과 후 2차, 4주 경과 후 3차 면역화 시킨 후 4주 지나서 혈액을 채취하여 혈청을 회수하여 사용하였다. 항체의 역가는 ELISA 방법으로 측정하였고, 1/100,000 농도로 사용

하는 높은 역가의 항체를 얻었다.

### 3. Competitive inhibition ELISA

항원성저감 효과 측정은 유청단백질, serum과 α-lactalbumin, β-lactoglobulin, BSA 항체를 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였다. 즉, rabbit anti-whey protein serum, rabbit anti-α-lactalbumin serum, rabbit anti-β-lactoglobulin serum, rabbit anti-BSA serum을 유청단백질, α-lactalbumin, β-lactoglobulin, BSA 가수분해물과의 반응성을 competitive inhibition ELISA로 실시하였다. 각각의 단백질 가수분해물을 20 ug/ml로 조정하고 50 ul를 PVC microtiter plate에 코팅시키고, BSA로 well의 빈 공간을 blocking 하고, 각각의 단백질 항체와 각각의 단백질 가수분해물을 0.00025, 0.0025, 0.025, 0.25, 2.5, 25, 250 ug/ml을 혼합하여 well에 넣고 반응시킨 후 기질 반응을 시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하여 항원성 저감을 측정하였다.

$$\frac{\text{시료의 OD 값} - \text{Blank}}{\text{시료의 최고치 OD 값} - \text{Blank}} \times 100$$

저해율(%) = 100 - 계산된 값

### 4. Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA) test

PCA 테스트는 guinea-pig (Hartly 계, 대한바이오링크) 무게 300~350 g을 이용하여 등 부위를 제모하고 rabbit anti-bovine α-lactalbumin serum, rabbit anti-bovine β-lactoglobulin serum, rabbit anti-bovine BSA serum을 PBS 용액(pH 7.6)에 1/10 로 희석한 serum pool을 1/2 씩 희석하여 1/1280 까지 희석한 항혈청 희석액을 ether 마취한 기니픽에 희석 배율에 따라서 저배율부터 spot 당 100 ul 씩 피내주사(26 G X 1/2 inch needle) 하여 4시간 동안 감작시킨다. PBS 용액(pH 7.6)에 용해한 항원 희석액을 1% even blue 와 동량 혼합하여 기니아픽 체중 100g 당 1 mg 씩 후지정맥에 주사하고 30분 후에 청색 반점이 나타나는 반응을 확인한다. 반응이 확인된 기니픽은 치사시키고 피내주사한 부위의 피부를 절개하여 피부의 내면에 나타난 청반을 확인하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 유청단백질 가수분해물의 peptides 생성 양상

Alcalase에 의한 BSA,  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG를 180분 동안 가수분해시킨 분해물의 HPLC 양상은 Fig. 1, 2, 3에 나타난 바와 같다. Fig. 1의 A는 대조구인 BSA에 대한 HPLC 양상을 나타내었고, B는 BSA 가수분해물의 HPLC 양상을 나타낸 것이다. 대조구인 A는 단일 peak를 나타내는 반면에 B

는 BSA 가수분해물에 대한 다양한 형태의 peak가 나타난 것으로 보아 BSA도 분자량이 작은 peptide의 생성이 잘 이루어진 것으로 확인되었다. Fig. 2의 A는 대조구인  $\alpha$ -LA에 대한 HPLC 양상을 나타내었고, B는  $\alpha$ -LA 가수분해물의 HPLC 양상을 나타낸 것이다. 대조구인 A는 단일 peak를 나타내는 반면에 B는  $\alpha$ -LA 가수분해물에 대한 다양한 형태의 peak가 나타난 것으로 보아 분자량이 작은 peptide가 잘 생성되었음을 확인할 수 있었다. Fig. 3의 A는 대조구인  $\beta$ -LG에 대한 HPLC 양상을 나타내었고, B

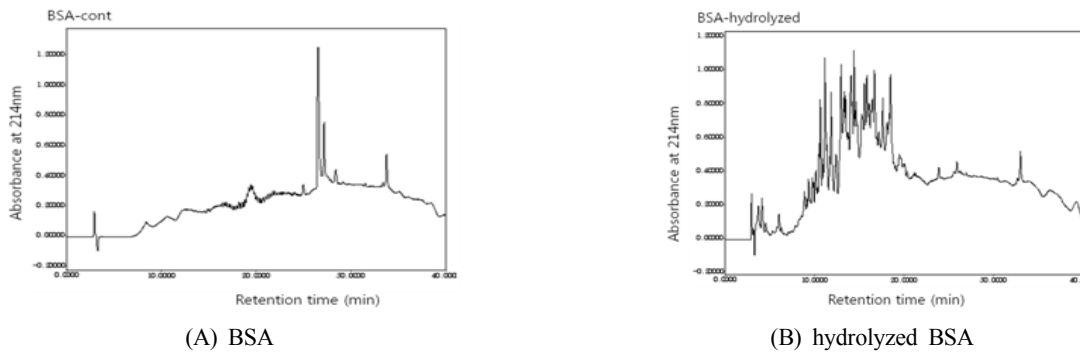


Fig. 1. BSA hydrolyzed by alcalase (1:100, v/v) for 180 min.

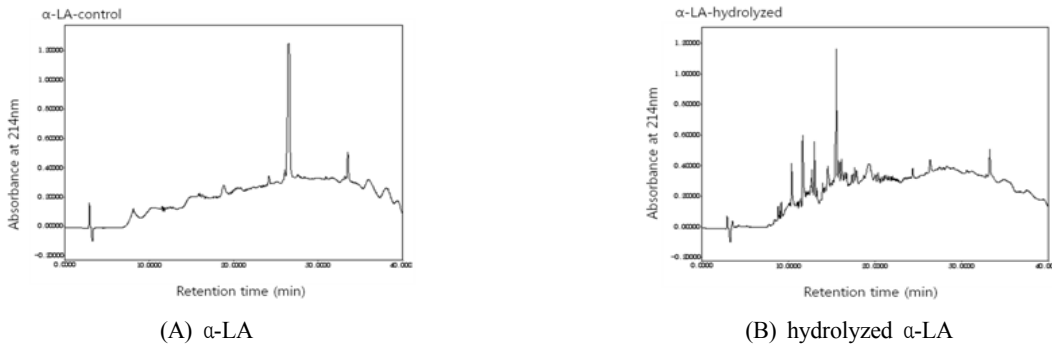


Fig. 2.  $\alpha$ -LA hydrolyzed by alcalase (1:100, v/v) for 180 min.

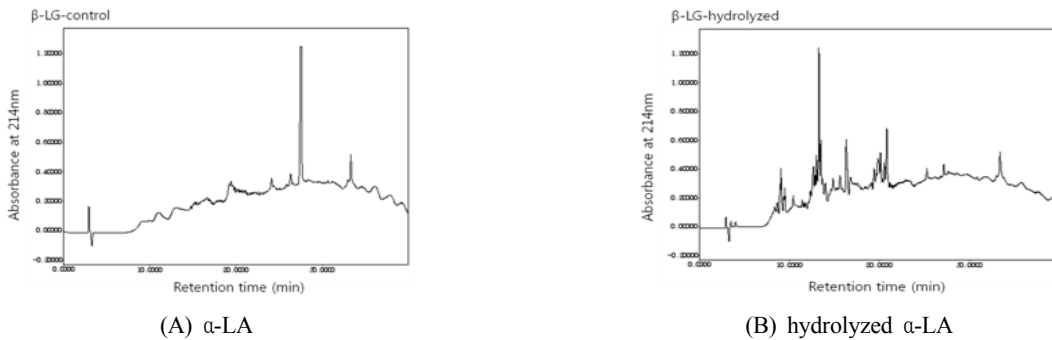


Fig. 3.  $\beta$ -LG hydrolyzed by alcalase (1:100, v/v) for 180 min.

는  $\beta$ -LG 가수분해물의 HPLC 양상을 나타낸 것이다. 대조구인 A는 단일 peak를 나타내는 반면에 B는  $\beta$ -LG 가수분해물에 대한 다양한 형태의 peak가 나타난 것으로 보아 분자량이 작은 peptide가 잘 생성된 것으로 확인되었다. 효소를 이용한 유청단백질의 가수분해에 관한 보고는 alcalase (Kim et al., 2007)를 이용하여 철 결합 peptides 생산에 관한 연구, 젓소 초유유청단백질에 alcalase, pepsin, papain(Kim et al., 2010)을 처리하여 얻은 철 결합 peptides, pepsin(Chicon et al., 2008) 처리를 통한 가수분해 양상과 항원성에 관하여 보고하였다.

## 2. $\alpha$ -LA, $\beta$ -LG, BSA에 대한 competitive inhibition ELISA

Alcalase 효소로 처리한 가수분해물 중에서 유래하는 peptide의 항원적 반응성을 측정하기 위해서 유청단백질 (BSA,  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG)의 항체를 이용하여 competitive inhibition ELISA 로 실시하였다. anti- $\alpha$ -LA serum에 대한  $\alpha$ -LA 가수분해물, 분자량 3KD 이상, 분자량 3KD 이하는 대조구인  $\alpha$ -LA에 비해 현저히 낮은 항원성을 보였다. Alcalase로 처리한  $\alpha$ -LA 가수분해물 중에서 anti- $\alpha$ -LA serum에 대한 대조구인  $\alpha$ -LA에 비해서 항원성이 현저히 저감되었는데, 가수분해된 분자량 3kD 이하와 분자량 3kD 이상 그리고 가수분해된 유청단백질 전체 순으로 낮은 항원성 저감을 나타내었다(Fig. 4-A).

Alcalase 효소로 처리한 가수분해물 중에서 anti- $\beta$ -LG serum에 대한  $\beta$ -LG 가수분해물, 분자량 3KD 이상, 분자량 3KD 이하는 대조구인  $\beta$ -LG에 비해 현저히 낮은 항원성

을 보였다. Alcalase로 처리한  $\beta$ -LG 가수분해물 중에서 anti- $\beta$ -LG serum에 대한 대조구인  $\beta$ -LG에 비해서 항원성이 현저히 저감되었는데, 가수분해된 분자량 3kD 이하와 분자량 3kD 이상 그리고 가수분해된 유청단백질 전체 순으로 낮은 항원성 저감을 나타내었다(Fig. 4-B).

Alcalase 효소로 처리한 가수분해물 중에서 anti-BSA serum에 대한 BSA 가수분해물, 분자량 3KD 이상, 분자량 3KD 이하는 대조구인 BSA 에 비해 현저히 낮은 항원성을 보였다. Alcalase로 처리한 BSA 가수분해물 중에서 anti-BSA serum에 대한 대조구인 BSA 에 비해서 항원성이 현저히 저감되었는데, 가수분해된 분자량 3kD 이하와 분자량 3kD 이상 그리고 가수분해된 유청단백질 전체 순으로 낮은 항원성 저감을 나타내었다(Fig. 4-C). 유청단백질의 항원성 저감에 대한 연구에서 allergen으로 감작하는 가장 민감한 성분이  $\beta$ -lactoglobulin 알려져 있는데 이에 대해 Reddy 등(1988)과 Dalgalarondo 등(1995)은 pepsin 으로 부분 가수분해하거나 산성 pH에서 단백질 구조의 안정성에 영향을 미치는 연구를 하였다. 또한 Chicon 등 (2008)은  $\beta$ -lactoglobulin에 pepsin을 처리한 가수분해물과 고압처리를 통하여 생성된 peptide의 항원성 저감과 IgE 결합능력에 관하여 보고하였다.

## 3. Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA) test

유청단백질 가수분해물에 존재하는 polyvalent peptide 항원의 항원성을 측정한 결과는 Table 1, 2, 3에 나타난 바와 같다. BSA에 대한 PCA test는 Fig. 5에 나타난 바와

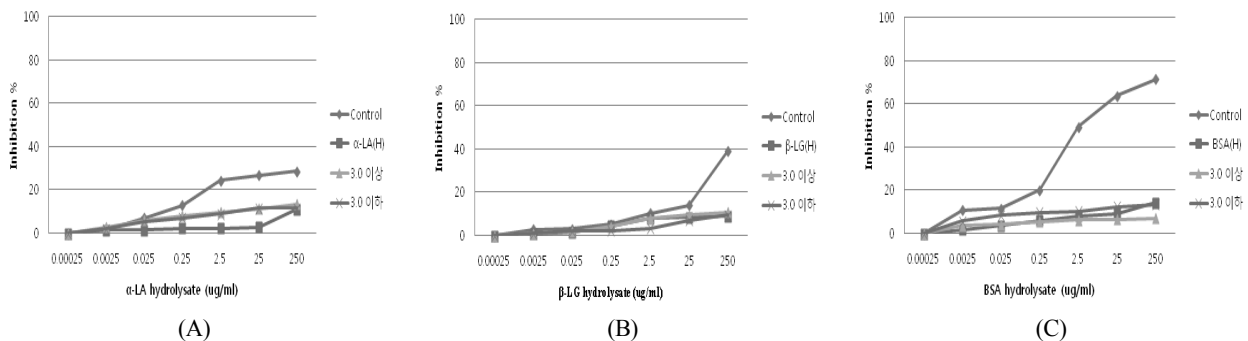
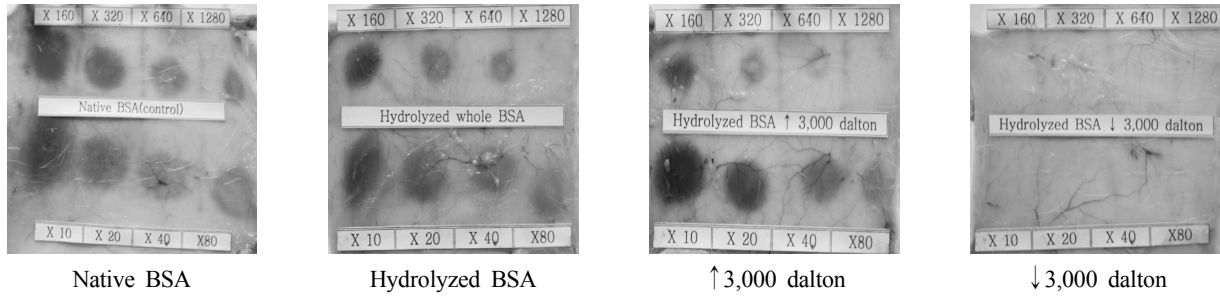


Fig. 4. Inhibition analysis of binding between BSA,  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG hydrolysates by alcalase and antiserum.  $\alpha$ -LA(A),  $\beta$ -LG(B) and BSA(C).

**Table 1.** Antigenicity of BSA hydrolysate to rabbit anti-BSA antiserum on guinea-pig PCA.

Samples challenged to guinea pig	Classification							
	x 10	x 20	x 40	x 80	x 160	x 320	x 640	x 1280
Native BSA (Control)	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyzed BSA	+	+	+	+	+	+	+	-
Hydrolyzed BSA ↑3,000 dalton	+	+	+	+	+	+	+	-
Hydrolyzed BSA ↓3,000 dalton	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : mean the reaction with bluejigs of more than 5 mm in a diameter as a positive.

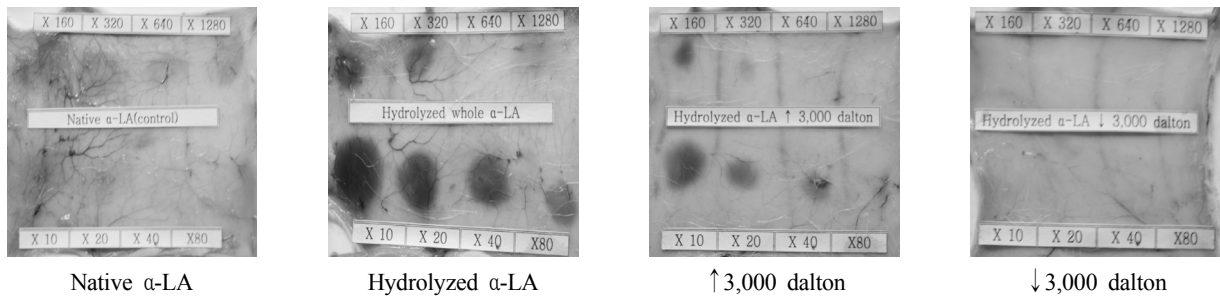


**Fig. 5.** Pattern of PCA tests of rabbit anti-BSA serum with alcalase BSA hydrolysates.

**Table 2.** Antigenicity of α-LA hydrolysate to rabbit anti-α-LA antiserum on guinea-pig PCA.

Samples challenged to guinea pig	Classification							
	x 10	x 20	x 40	x 80	x 160	x 320	x 640	x 1280
Native α-LA (Control)	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyzed α-LA	+	+	+	+	+	+	-	-
Hydrolyzed α-LA ↑3,000 dalton	+	+	+	+	+	+	-	-
Hydrolyzed α-LA ↓3,000 dalton	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : mean the reaction with bluejigs of more than 5 mm in a diameter as a positive.



**Fig. 6.** Pattern of PCA tests of rabbit anti-α-LA serum with alcalase α-LA hydrolysates.

같이 guinea-pig PCA 테스트에서 rabbit anti-BSA antiserum에 대한 BSA 효소 가수분해물의 항원성은 분자량 3,000 dalton 이하에서 polyvalent peptide 항원성이 나타나지 않았다. 그러나 효소처리 하지 않은 BSA는 1/1,280 까지 희석한 항혈청 반응에서 양성으로 나타났고, BSA 가수분해물 전체에서는 1/640 까지 희석한 항혈청 반응에서 양성으로 나타났고, 분자량 3,000 dalton 이상에서

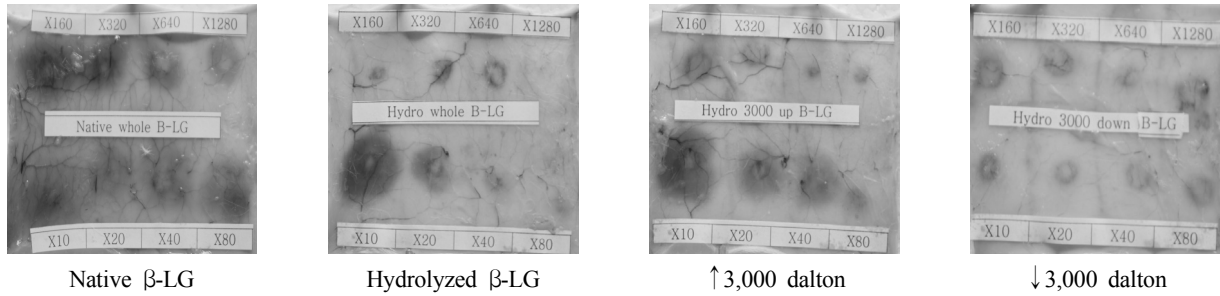
는 polyvalent peptide 항원성이 1/640 까지 희석한 항혈청 반응에서 양성으로 나타났다. 이러한 결과는 가수분해 효소인 alcalase에 의해서 쉽게 분해되어 항원성이 소실되었으며, 특히 분자량 3,000 이하에서는 BSA가 가지고 있는 항원결정기가 효소에 의해 완전히 분해되었음을 나타내고 있다.

α-LA에 대한 PCA test는 Fig. 6에 나타난 바와 같이

**Table 3.** Antigenicity of  $\beta$ -LG hydrolysate to rabbit anti- $\beta$ -LG antiserum on guinea-pig PCA.

Samples challenged to guinea pig	Classification							
	x 10	x 20	x 40	x 80	x 160	x 320	x 640	x 1280
Native $\beta$ -LG (Control)	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyzed $\beta$ -LG	+	+	+	+	±	±	-	-
Hydrolyzed $\beta$ -LG $\uparrow$ 3,000 dalton	+	+	+	+	±	±	-	-
Hydrolyzed $\beta$ -LG $\downarrow$ 3,000 dalton	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : mean the reaction with bluejgs of more than 5 mm in a diameter as a positive.



**Fig. 7.** Pattern of PCA tests of rabbit anti- $\beta$ -LG serum with alcalase  $\beta$ -LG hydrolysates.

guinea-pig PCA 테스트에서 rabbit anti- $\alpha$ -LA antiserum 에 대한  $\alpha$ -LA 효소 가수분해물의 항원성은 분자량 3,000 dalton 이하에서 polyvalent peptide 항원성이 나타나지 않았다. 그러나 효소처리 하지 않은  $\alpha$ -LA는 1/1280 까지 희석한 항혈청 반응에서 양성으로 나타났고,  $\alpha$ -LA 가수분해물 전체에서는 1/320 까지 희석한 항혈청 반응에서 양성으로 나타났고, 분자량 3,000 dalton 이상에서는 polyvalent peptide 항원성이 1/320 까지 희석한 항혈청 반응에서 양성 반응이 혼재하여 나타났다. 이러한 결과는 가수분해 효소인 alcalase에 의해서 쉽게 분해되어 항원성이 소실되었으며, 특히 분자량 3,000 이하에서는  $\alpha$ -LA가 가지고 있는 항원결정기가 효소에 의해 완전히 분해되었음을 나타내고 있다.

$\beta$ -LG에 대한 PCA test는 Fig. 7에 나타난 바와 같이 guinea-pig PCA 테스트에서 rabbit anti- $\beta$ -LG antiserum 에 대한  $\beta$ -LG 효소 가수분해물의 항원성은 분자량 3,000 dalton 이하에서 polyvalent peptide 항원성이 나타나지 않았다. 그러나 효소처리 하지 않은  $\beta$ -LG는 1/1280 까지 희석한 항혈청 반응에서 양성으로 나타났고,  $\beta$ -LG 가수분해물 전체에서는 1/80 까지 희석한 항혈청 반응에서 양성으로 나타났고, 분자량 3,000 dalton 이상에서는 polyvalent peptide 항원성이 1/320 까지 희석한 항혈청 반응에서 양성 반응이 혼재하여 나타났다. 이러한 결과는 가수분해

효소인 alcalase에 의해서 쉽게 분해되어 항원성이 소실되었으며, 특히 분자량 3,000 이하에서는  $\beta$ -LG가 가지고 있는 항원결정기가 효소에 의해 완전히 분해되었음을 나타내고 있다.

#### IV. 결론

Alcalase에 의한 BSA,  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG를 180분 동안 가수분해시킨 분해물의 HPLC 양상은 다양한 형태의 peak를 보임으로 분자량이 적은 peptide가 잘 생성되었다. Alcalase 효소로 처리한 가수분해물에 대한 competitive inhibition ELISA에 의한 항원성 측정은 대조구에 비해 가수분해된 분자량 3 kD 이하는 항원성을 나타내지 않았고 분자량 3kD 이상과 전체 유청단백질 가수분해물은 1/320과 1/640 에서 양성 반응으로 혼재하여 나타났다. Guinea-pig PCA 테스트는 유청단백질(BSA,  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG) 가수분해물의 항원성은 분자량 3,000 dalton 이하에서 polyvalent peptide 항원성이 전혀 나타나지 않았고 효소처리 하지 않은 유청단백질(BSA,  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG)은 polyvalent peptide 항원성을 함유하고 있었다. 분자량 3,000 dalton 이상에서도 polyvalent peptide 항원성은 1/320과 1/640 에서 양성 반응으로 혼재하여 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다 지원사업에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고 문헌

- Burks AW, Williams LW, Castell HB. 1990. Antibody response to milk proteins in patients with milk-protein intolerance documented by challenge. *Journal of the Allergy Clinical Immunology* 85:921-927.
- Chicon R, Lopez-Fandino R, Alonso E, Belloque J. 2008. Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin E binding of  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates obtain by pepsin and high-pressure treatments. *Journal of Dairy Science* 91:928-938.
- Dalgalarrondo M, Dufour E, Chobert JM, Bertrand-Harb C, Haertle T. 1995. Proteolysis of  $\beta$ -casein by pepsin in ethanolic media. *International Dairy Journal* 5:1-14.
- Friedman NJ, Zeiger RS. 1996. Risk factors and prevention of allergy. In Bierman CW, Pearlman DS, Shapiro GG, Busse WW(Eds) *Allergy, asthma and immunology from infants to childhood*. 3<sup>rd</sup> ed., Philadelphia, Saunders Co., pp 282-296.
- Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Nam MS, Kim HS. 2007. Separation of iron-binding protein whey through enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal* 17:625-631.
- Kim SB, Ku MJ, Cho WM, Ki KS, Kim HS, Nam MS. 2010. production of iron-binding peptides from colostrum whey by enzymatic hydrolysis. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 30:923-929. [in Korean]
- Marshall K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*. 9:136-156.
- Reddy IM, Kella NK, Kinsella JE. 1988. Structural and conformational basis of the resistance of  $\beta$ -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36:737-741.
- Sampson HA. 1997. Eczema and food hypersensitivity. In Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA(Eds) : *Food allergy*. 2<sup>nd</sup> ed., Massachusetts, Blackwell Science Co., pp 193-209.
- Saarinen KM, Pelkonen AS, Makela MJ, Savilahti E. 2005. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *Journal of the Allergy Clinical Immunology* 116:869-875.
- Sicherer SH, Sampson HA. 2010. Food Allergy. *Journal of the Allergy Clinical Immunology* 125:S116-S125.
- Wal JM. 1998. Cow's milk allergies. *Allergy* 53:1013-1022.