

식중독균 항원(*Salmonella typhimurium*)에 의한 계란항체(IgY) 생산성과 분리 정제

한준표 · 백반석* · 배만종*

대구효성가톨릭대학교 식품공학과, 경산대학교 생명자원공학부*

Productivity, Isolation and Purification of Egg Yolk Antibody(IgY) against Food Poisoning Bacteria (*Salmonella typhimurium*)

Joon-Pyo Han, Ban-Suk Baek* and Man-Jong Bae*

Dept. of Food Science and Technology, Catholic University of Teagu-Hyosung, Kyungsan 712-702, Korea
Dept. of Life Resources Science, Kyungsan University, Kyungsan 714-240, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to get a industrial information about a possibility of IgY antibody production, antimicrobial activity and properties of IgY antibody in egg yolk. After the initial immunization the anti-*Salmonella typhimurium* IgY antibody level gradually were decreased from fifth week to tenth week. On the other hand, the antibody level in the serum were increased from the first week, reaching its peak in the sixth week. Molecular weights of IgY were estimated approximately 72~75KD in a heavy chain and 30~40KD in a light chain by electrophoresis.

Key words : IgY, *Salmonella typhimurium*, antimicrobial activity, antibody activity.

I. 서 론

최근 세계적으로 볼 때 매년 많은 식중독 사건이 발생하고 있으며, 이중 세균성 식중독이 대부분을 차지하고 있다¹⁻⁴⁾. 최근에 와서 식중독의 발생건 수가 급격히 증가하고 있으며, 또한 피해 규모도 대형화 경향을 보이고 있다. 1993년부터 1996년 사이에 우리나라의 각종 식품에서 발생한 세균성 식중독 사례를

보면 총 발생건수는 150여 건이 되며, 그 원인균으로 *Salmonella*가 36.9%, *Vibrio*가 22.0%, *Staphylococcus*가 15.7%, *E. coli*가 13.3%였다. 발생환자수에 대하여 각각의 식중독 원인균이 차지하는 비율은 *Staphylococcus*가 51.4%, *Salmonella*가 21.1%, *Vibrio*가 12.3%, *E. coli*가 9.9%로 나타나 *Salmonella*가 식중독에 있어 상당히 높은 비중을 나타내고 있다⁵⁾.

*Salmonella*는 사람과 동물에 감염되는 감염형 식중독의 원인균이며, 가축인 경우에는 용수 및 사료를

통하여 1차 보균자가 되며 인간에게도 식수는 물론 야채나 균에 오염된 가축을 원료로 사용한 식품을 통하여 감염되며, 식품에서는 특히, 닭이나 쇠고기에 의한 발병률이 높은 것으로 알려져 있다⁶⁾.

닭 혈청에 존재하는 IgG 항체는 난소 난포상피를 효과적으로 통과해서 oogenesis 동안 난황에 축적된다. 이렇게 닭의 난황에 축적된 면역글로블린을 소위 IgY라고 부른다

계란 한 개에 100mg 이상의 IgY를 축적할 수 있으며, 계란은 특이 항체를 생산하는데 편이하고 우수한 재원이라고 할 수 있다. 그 이유는 도살이나 채혈하는 번거로움 없이 1년에 닭 한 마리에 약 30g 정도의 항체를 얻을 수 있기 때문이다⁷⁻⁹⁾. IgY는 IgG 그룹에 속하지만 등전점, 분자량 구조 및 기능면에서 큰 차이가 있다. Heavy chain과 light chain의 분자량은 IgY의 분자량이 약간 크며, 1차 구조에서 아미노산 조성에서 차이가 있다. 기능면에 있어서는 IgY는 보체, 척추동물의 혈청에 존재하는 Rheumatoid factor와 결합하지 않는다¹⁰⁾. 또한 IgG 항체는 종이 다른 IgG와 교차반응을 하는데, IgY는 교차반응을 하지 않는다. 이런 특징들 때문에 IgY는 생화학적 또는 임상시약으로 개발 활용하는데 좋은 잇점을 갖추고 있다.

난황은 항체생산 재원으로써 편이성과 경제성 측면에서 좋은 이점이 인정되고 있다. 그로 인해 지금까지 산업화의 선행조건이 될 수 있는 특이항체의 생성 가능성과 생성량 및 효율적인 분리 정제 방법의 개발에 초점을 두고 연구개발을 진행해 왔으며, 특정항원에 대해서는 상당한 연구성과를 거두고 있다¹¹⁾. 그러나 *Salmonella*의 식중독균 항원에 대한 연구는 거의 보고된 바가 없었다.

따라서 본 연구에서는 식중독균 *Salmonella typhimurium*을 항원으로 사용해서 계란 특이항체의 생산성을 검토하고, 난황으로부터 λ -carrageenan과 DEAE-Sephacel column을 이용하여 특이항체를 분리 정제하였다. 분리 정제된 항체는 분자량 측정 등을 평가 조사항으로써 산업화의 기초자료를 마련하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 항원의 준비

본 실험에 항원으로 사용한 균주는 *Salmonella typhimurium*(ATCC 14028)을 사용하였으며 실험 균주는 37°C에서 48시간 동안 trypticase soy broth (TSB)에서 발육시켰다. 균체는 회수하여 3시간 동안 0.5% formalin으로 처리하였다. 0.12M phosphate와 0.04M NaCl이 함유된 phosphate buffer saline (PBS pH 7.2)으로 3번 세척 후 동결건조하여 사용하였다.

2. 실험동물 및 재료

본 실험에 사용된 실험동물은 경북 경산시 소재 신일농장에서 사육 중인 15~20주령의 10마리의 이사브란 산란계를 사용하였으며, 사육조건은 온도와 광도를 경산지역 5~6월의 자연조건하에 실시하였다.

분석용 시약인 incomplete freund's adjuvant, λ -carrageenan, total protein reagent kit, rabbit anti chicken IgG-AP conjugated, chicken IgG, disodium hydrogenphosphate, bovine serum albumin (BSA) 등은 Sigma사 제품을 사용하였으며, 그 외 일반시약은 특급 또는 일급품으로 사용하였다.

3. 면역

동물의 면역는 동결 건조된 항원(*S. typhimurium*)을 멸균된 PBS(approximately 2×10^9 organism per mL)에 부유시키고, 동량의 incomplete freund's adjuvant(Sigma Co., USA)와 유상으로 만들었다. 이 유상액을 1mL씩 산란계 양다리 4곳의 근육 내에 주사하였다(각 0.25mL씩)¹²⁾. Booster 면역는 처음 면역 후 2주와 5주에 실시하였다. 계란은 3일마다 수집한 후 4°C에 보관하고, 혈액은 날개의 정맥에서 첫 면역 후 1주 간격으로 10주 쯤까지 채혈한 후 혈청을 분리한 후 -70°C에서 보관하여 분석시료로 사용하였다.

4. 난황과 혈청으로부터 단백질 정량

난황내의 단백질 정량은 Ohnishi 등¹³⁾의 방법에 따라 실시하였고, 혈청내의 단백질 정량은 Doumas 등¹⁴⁾에 따라 실시하였다.

5. 난황으로부터 계란항체(IgY)의 분리정제

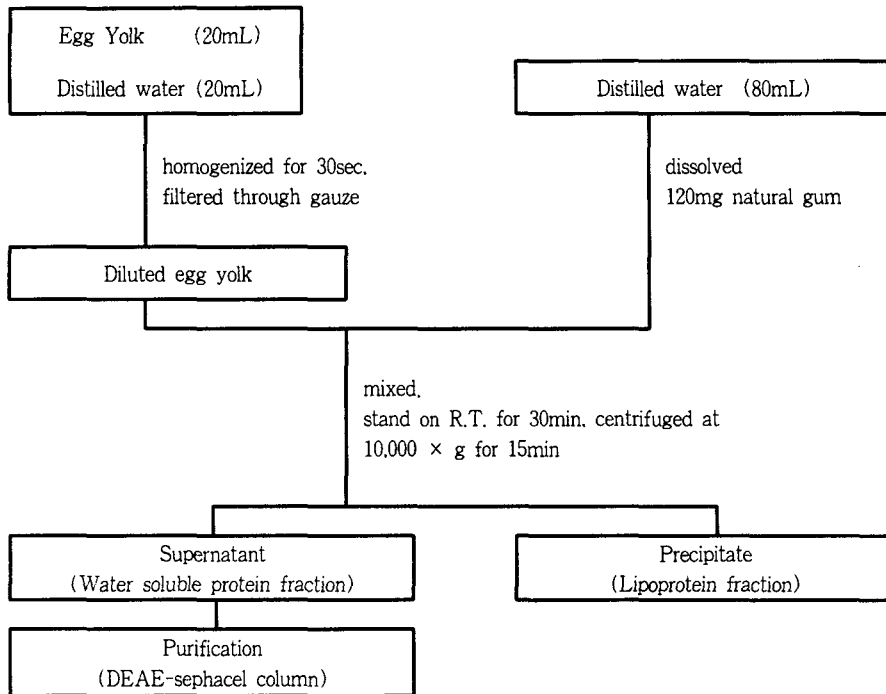


Fig. 1. The procedure of separation of water soluble protein and lipoprotein of egg yolk.

계란으로부터 IgY의 분리정제는 Hatta 등^{15,16)}의 법에 따라 Fig. 1과 같이 실시하였다. 계란에서 난황을 난백과 분리한 후 난황의 부피를 측정하여 증류수로 2배 희석하였다. 난황의 lipoprotein을 제거하기 위하여 희석액 2배의 0.15% λ -carrageenan(Sigma Co., USA) 용액을 혼합하고 실온에 30분간 방치하였다. 혼합물을 10,000 × g로 15분간 원심분리한 후, filter paper No. 2(Advantec Toyo)로 여과하였다. 이 여과액에 disodium hydrogenphosphate(20mM)를 용해하고 나서 3N HCl을 사용하여 pH 8.0으로 맞추었다. 이 용액을 DEAE-Sephacel column($\phi 5.0 \times 10.0$ cm)에 분당 5mL로 통과시켰다. Column 부피의 2배되는 20mM phosphate buffer(pH 8.0)로 column을 세척한 후, column의 5배 부피의 0.2M phosphate buffer(pH 8.0)로 용출시켜 단백질을 분리하였다. 수집된 peak fraction은 spectrophotometer Model U-2000(Hitachi Co., Japan)으로 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 20°C에서 용출액을 15%(w/v)가 되도록 sodium sulfate anhydrous 분말을 가하여, 30분 동안

천천히 용해한 후 10,000 × g로 15분간 원심분리 하였다. 침전물을 다시 phosphate buffer(10mM, pH 8.0) 100mL에 용해한 후, 위의 염석과정을 2회 반복하였다. 최종 침전물을 phosphate buffer(10mM, pH 8.0)에 용해한 후, 같은 buffer로 투석을 실시하였다. 투석된 용액을 0.45 μ m membrane filter로 여과 후 동결건조하여 보관하였다.

6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에 의한 분자량 측정

정제된 IgY의 순도 및 분자량을 측정하기 위하여 SDS-polyacrylamide slab gel 전기영동을 Laemmli의 방법¹⁷⁾으로 실시하였다. IgY 시료는 0.1% SDS가 포함된 25mM tris base에서 20분간 100°C로 가열하였다. Stacking gel은 30% acrylamide를 포함하였고 separating gel로는 1.5M tris-HCl과 10% SDS를 포함한 30% acrylamide를 사용하였다.

분자량 marker로는 albumin-bovine(130KD, 66KD), bovin serum albumin(75KD), ovalbumin(50KD), albu-

min, chicken egg(45KD) 등을 사용하였다. 단백질 band는 coomassie blue 또는 silver로 염색하였다.

7. 계란항체(IgY)량 측정

난황과 혈청의 항체(IgY)량을 측정하기 위하여 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)을 사용하였다¹⁸⁾. 각 항원을 0.1M carbonate buffer(pH 9.6)에 부유시켰다. 이 항원 부유액($A_{660nm}=1.0$)을 96well plate에 100 μ l 씩 넣고, 25°C에서 overnight 반응시켜 coating하였다. PBS-T(phosphate buffer saline, 0.05% Tween-20, pH 7.4)로 세번 세척한 후, 10% BSA(pH 7.4)를 100 μ l 씩 넣고 37°C에서 2시간 blocking시킨 후, PBS-T로 세번 세척하였다. 희석된 난황과 혈청을 100 μ l 씩 넣고 25°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBS-T로 세번 세척하였다. 이차 항체로서 혈청은 rabbit anti-chicken IgG-alkaline phosphatase(Sigma Co., USA)용액을, 난황은 anti-chicken IgY-alkaline phosphatase(Progamma Co., USA)용액을 0.01M PBS로 5,000배 희석한 용액을 well당 100 μ l 씩 넣고, 37°C에서 2시간 반응시켰다. PBS-T로 세번 세척한 후, AP효소의 기질용액(*p*-nitrophenyl phosphate, 1mg/mL, diethanolamine buffer, pH 9.8, Sigma Co., USA)을 100 μ l 씩 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 5M NaOH를 50 μ l 씩 넣어 반응을 정지시킨 후, 405nm의 파장에서 ELISA reader (Model 550 BIO-RAD, USA)로 각 well의 흡광도를 측정하고 그 양을 산출하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 항체의 생성변화 추이

*Salmonella typhimurium*으로 면역된 산란계에서 얻은 계란의 특이 IgY항체와 혈청 특이 IgG의 생성량을 ELISA로 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

혈청에서의 항-*Salmonella* 항체는 항원 투여 후 2주째부터 생성되기 시작하여, 6주째부터 최대의 peak를 나타내어 실험을 수행한 10주째까지 지속적으로 생성됨을 확인하였다. 난황에서도 2주째부터 항-*Salmonella* 항체가 생성됨을 발견할 수 있었으며,

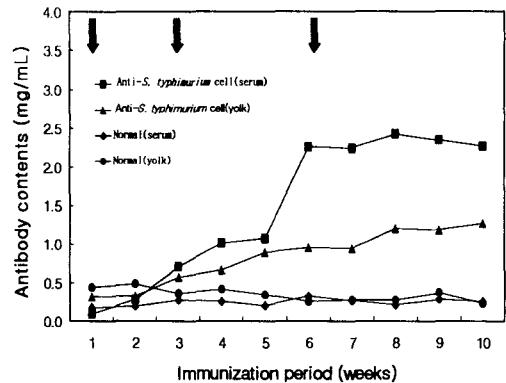


Fig. 2. Changes of antibody contents in chicken serum and egg yolk during the immunization period.

The broad arrows indicate when chickens were injected with *S. typhimurium* whole cell. Anti-*S. typhimurium* antibody contents in egg yolk (▲-▲) and serum (■-■) were measured by ELISA using *S. typhimurium* as an antigen.

혈청에서 처럼 10주까지 지속적으로 IgY항체가 생성되었으나 생성량은 혈청에서보다는 낮았다. 혈청과 난황에서 지속적으로 높은 항체 생성활성을 보이는 것은 2주 혹은 3주 간격으로 반복된 항원투여로 인한 것으로 추측된다. Heller에 의하면, *Escherichia coli*를 항원으로 투여 했을 경우, 1회 1차 항원 투여 후 첫 4일째에 혈청에서 항체 생성을 확인하였고, 난황에서는 14일째에서 항-*Escherichia coli* 항체가 생성되기 시작하여 86일까지 항체를 확인할 수 있었으나, 87일 이후에는 항체를 전혀 확인할 수 없음을 보고하였다¹⁹⁾. 항원투여 횟수와 투여량 및 닭의 품종이 난황에서 항체 생성기간과 생성량에 미치는 중요한 요인으로써 항원의 투여 조건에 따른 닭이 일생동안 혈청과 난황에서 항체 생성 양상확보가 요청된다.

2. 난황과 혈청의 단백질 함량

*S. typhimurium*으로 면역된 산란계에서 얻은 계란의 단백질함량과 혈청 단백질함량을 측정한 결과, 각각 정상군에 비하여 식중독균 항원을 사용하여 면역된 군에서 실험기간 동안 혈청에서는 지속적으로 단백질 함량이 다소 상승되어 있음을 나타내었으며, 계란에서는 7주째에서 제외하고 미미한 증가 경향을

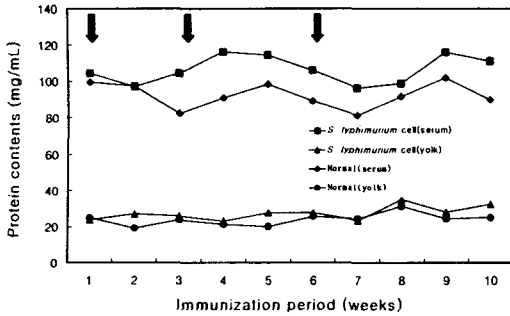


Fig. 3. Changes of protein contents in chicken serum and egg yolk during the immunization period. The broad arrows indicate when chickens were injected with *S. typhimurium* whole cell. Protein contents in egg yolk(▲-▲) and serum(■-■) were measured by spectrophotometer using *S. typhimurium* as an antigen.

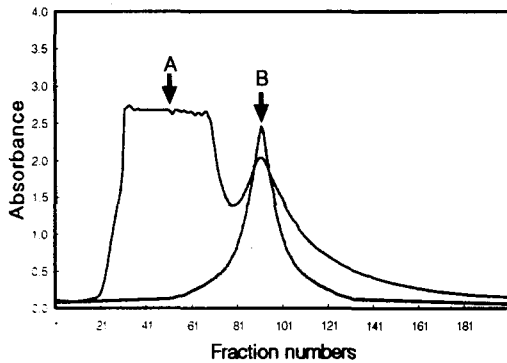


Fig. 4. Purification of anti-*S. typhimurium* IgY by DEAE-Sephacel anion exchange and ELISA value of IgY. A : Column: ϕ 5.0 × 10.0cm: flow rate, 5.0mL/min: fraction, 5.0mL. The column was equilibrated with 0.2M PBS(pH 8.0), washed with 0.01M PBS(pH 8.0) and IgY eluted using step wise elution with 0.2M PBS(pH 8.0). Protein levels in fractions were measured by spectrophotometer(O.D. at 280nm) B : IgY levels in fractions were measured by ELISA reader(O.D at 405nm).

보여주었다(Fig. 3). 이러한 결과는 Fig. 2와 같이 ELISA로 측정된 계란 IgY항체와 혈청 IgG의 역가 증가와 관련성을 나타내며, 혈청과 난황내에 면역단백질 IgG 및 IgY항체가 생성됨으로써 총 단백질 함

량이 다소 증가되었을 것으로 추측된다.

3. DEAE-Sephacel column에 의한 계란항체의 분리정제 특성

DEAE-Sephacel column을 통과한 분획은 두 개의 peak를 나타내었다(Fig. 4). 각 fraction의 IgY 농도를 ELISA법으로 확인한 결과 두 번째 peak에서 대부분 측정되었다. 즉 첫 번째 peak는 대부분 IgY 이외의 기타 단백질이었으며, 두 번째 peak에서 특이 IgY가 존재함을 알 수 있었다. 총 특이 IgY 생성량은 Fig. 2의 항체 생산성 결과와도 동일한 양상으로 나타났다.

정상군에서도 IgY가 검출된 것은 항원에 의한 특이 항체라고 하는 것보다는 자연적인 산란계의 면역에 의하여 혈액내의 IgG가 난황내로 이동하여 형성된 IgY로 사료된다.

본 실험에서는 ELISA 값이 가장 높은 IgY가 위치하는 분획을 회수하여 다음 실험에 사용하였다.

4. 분자량 측정결과

Fig. 5은 분리 정제된 IgY의 SDS-polyacrylamide 전

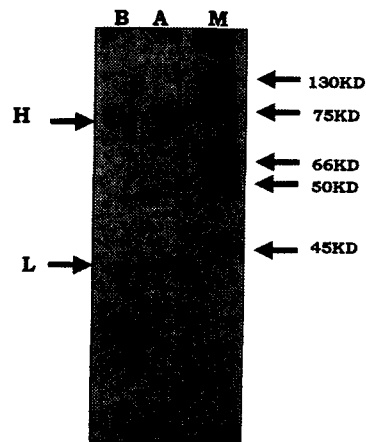


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic analysis of IgY.

M : marker proteins (albumin, bovine-dimer : 130KD), (bovin serum albumin : 75KD), (albumin, bovine-monomer : 66KD), (ovalbumin : 50KD), (albumin, chicken egg : 45KD), A : Normal, B : Anti-*S. typhimurium* IgY.

기염등법으로 측정된 분자량 결과이다. *S. typhimurium*의 특이 IgY의 분자량은 heavy chain은 72~75KD이고, light chain은 30~40KD 정도로 추측된다.

Hatta 등¹⁶⁾은 IgY의 heavy chain은 70kD이고, light chain은 21kD이라고 평가했었다. 또한, Shimizu 등²⁰⁾은 포유동물의 IgG의 heavy chain 분자량이 50KD인데 비해서 IgY는 68KD인 것으로 IgG와 IgY의 분자량의 차이점을 보고한 바 있다. 또한 토끼의 IgG의 heavy chain 잔기는 440, light chain 잔기는 214개인 것에 반해, IgY는 각각 559개와 206개임을 확인하였으며, 이들 chain의 S-S결합의 위치나 수량 및 당분자와의 결합위치 등에서 차이점이 있음을 확인한 바 있다.

이상의 결과로 볼 때 본 연구에서 얻은 *S. typhimurium* 특이 IgY의 heavy chain분자량은 거의 동일하나, light chain분자량은 상당한 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 항원의 종류에 따라 다소 차이가 있을 것으로 예상되나, 향후 식중독 항원에 의해서 생성된 특이항체 IgY 개개에 대한 아미노산 조성, 아미노산 서열 및 더욱 명백한 분자구조와 물리화학적 특성 규명이 요청된다.

IV. 요약

Salmonella typhimurium 항원에 면역된 산란계의 계란항체(IgY)생산 및 증가를 측정된 결과, 산란계가 이들 항원에 면역반응을 일으켜 2주 후 혈청과 난황에서 정상군에 비하여 뚜렷한 항체가 생성능을 보였으며, 혈청내의 IgG생성에 비하여 계란항체(IgY)의 생성이 다소 낮은 것으로 나타났다. 혈청 및 난황내의 단백질 함량은 정상군에 비하여 약간 높은 경향을 나타내어 산란계의 혈청 및 난황내의 단백질이 이들 항원에 의하여 증가하는 것으로 나타났다. DEAE-Sephacel column을 통과한 분획은 두개의 peak를 나타내었다. 각 분획의 IgY농도를 ELISA법으로 확인한 결과 시험관 350~635ml에 해당되는 두 번째 peak에서 대부분 측정되었다. 분리 정제된 IgY의 분자량을 측정된 결과, heavy chain 72~75KD,

light chain 30~40KD정도였다. 이상의 결과에서, 본 실험에서 사용된 IgY는 항원에 대한 특이성 및 생화학적 특성 등을 고려해 볼 때, 식품산업 소재, 의약품 소재, 연구용 kit와 진단용 kit 및 축산분야 등 여러 분야에 응용될 수 있으리라 기대된다.

V. 참고문헌

1. Bean, N. H. and Griffin, P. M.: Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens, Vehicles, and Trends. *J. Food Prot.*, 53, 804, 1990.
2. Todd, E. C. D.: Factors that contributed to foodborne disease in Canada, 1973-1977. *J. Food Prot.*, 46, 737, 1983.
3. Roberts, D.: Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970-1979. *J. Hyg.*, 89, 491, 1982.
4. Todd, E. C. D.: Foodborne disease in Canada a 10-Year summary from 1975 to 1984. *J. Food Prot.*, 55, 123, 1992.
5. Kim, C. N. and Poh, W. S.: Microbial risk assessment of processed foods in Korea. *J. Fd Hyg. Safety*, 12, 340, 1997.
6. Jay, J. M.: Modern food microbiology. AVI pub., New York, New York, p.553, 1992.
7. Losch, U., Schraner, I., Wanke, R., and Jurgens, L.: The chicken egg, and antibody source. *J. Vet. Med., Series, B.*, 33, 609, 1986.
8. Rose, M. E., Orlans, E., and Buttress: Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.* 4, 521, 1974.
9. Williams, J.: Serum proteins and the livetins of hen's-egg yolk. *Biochem. J.* 83, 346, 1962.
10. Makoto, S., Hitoshi, N., Keisuke, S., Kei, H., Makoto, O., Ken, T., and Hajime, H.: Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 270, 1992.

11. Fichtali, J., Charter, E. A., Lo, K. V. and Nakai, S.: Purification of Antibodies from Industrially Separated Egg Yolk. *J. Food Science*, 58(6), 1282, 1993.
12. Shimizu, M., Fitzsimmons, R. C. and Nakai, S.: Anti *E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.*, 53, 1360, 1998.
13. Ohnishi, S. T. and Barr, J. K.: A simplified method of quantitating proteins using the biuret and phenol reagents. *Anal Biochem.*, 86, 193, 1978.
14. Doumas, B. T., Bayse D. and Carter, R. J.: A candidate reference method for determination of total protein in serum. *Clin Chem.*, 27, 1642, 1981.
15. Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T.: A novel isolation method for hen egg yolk antibody, IgY. *Agirc. Biol. Chem.*, 54, 2531, 1990.
16. Hatta, H., Sim, J. S. and Nakai, S.: Separation of phospholipids from egg yolk and recovery of water-soluble proteins. *J. Food Sic.*, 53, 425, 1988.
17. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680, 1970.
18. Cost, K. M., West, C. S., Brinson, D. and Polk, H. C. Jr.: Measurement of human antibody activity against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using formalin treated whole organism in an elisa technique. *J. Immunoassay*, 6, 23, 1985.
19. Heller, E. D.: The immune response of hens to multiple *Escherichia coli* injections and transfer of immunoglobulin in Veterinary Science, 18, 117, 1975.
20. Shimizu, M., Nagashima, H., Sano, K., Hashimoto, K., Ozeki, M., Tsuda, K. and Hatta, H.: Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 270, 1992.