JOURNAL OF THE EAST ASIAN OF DIETARY LIFE
Vol. 9, No. 2(1999)

식중독균 항원(*Salmonella typhimurium*)에 의하여 생성된 계란항체(IgY) 특성과 항균 효과

백반석* · 한준표 · 배만종*
대구효성가톨릭대학교 식품공학과, 경산대학교 생명자원공학부*

Properties and Antimicrobial Activity of Egg Yolk Antibody(IgY) againt Food Poisoning Bacteria (*Salmonella typhimurium*)

Ban-Suk Baek*, Joon-Pyo Han 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. The residual antibody activities of IgY were 91.5% after heating for 30min at 60℃. At the same time, these activities, were 73.2% after heating 15min at 65℃ and decreased vapidly at 70℃ and little antibody activity was left after heating for 15min at 80℃. When the prepared IgY was incubated at various pH ranges from 7 to 2 for 5hr at 37℃., the antibody activity was stable from pH 7 to 4 and remained to 69.8% at pH 3.

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

Ⅰ. 서 론

우리 나라에서 발생하는 세균성 식중독 사례를 보면, 최근인 1993년부터 1996년 사이에서 보고된 총 발생건수를 원인별로 분석한 결과는 36.9%가 *Salmonella*였으며, *Vibrio*가 22.0%, *Staphylococcus*가 15.7%, *E. coli*가 13.3%였다. 또한 발생 환자수에 대하여 각각의 식중독 원인균이 차지하는 비중은 *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 있다[1].

근래에 들어 식품위생관념의 확대로 발생건수는 감소하는 추세이나 식품의 대량생산과 대량판매, 외식기회의 증가 등으로 사건 당 환자 수는 증가하여 식중독 사건은 점차 대형화하는 경향을 나타내고 있다[2, 3].

계란 한 개에 80~100mg의 IgY가 함유되어 있으며, 이는 토끼 한 마리를 채혈한 피에 들어 있을 정도의 양이다. 이 항체를 계란의 난황(yolk)에서 유래되었기 때문에 IgY라고 한다[4~6]. 닭의 혈청 IgG는 난황으로 이동되어, 이것이 병아리의 혈중으로 이동

하여 초기감염예방에 중요한 역할을 하게 된다[7]. 그러므로 이러한 원리를 이용하여 어느 특정한 항원을 닭에 면역하면, 그 항원에 대한 특이적인 항체를 난황 중에서 생성할 수 있다. 또한, 난황내의 antibody activity의 높은 역가는 주기적인 면역에 의하여 몇 달 동안 유지될 수 있다[8, 9].

식품 속의 유해 미생물을 차단하는 방법은 다양하게 연구되고 있으나 계란항체를 이용한 방법은 잘 알려지지 않았다. 닭의 계란으로부터 특정항체의 생산은 다른 동물에 비하여 더 많이 생산할 수 있어 비교적 다량의 항체를 식품에 적용할 경우 경제성과 위생성 그리고 영양적인 측면에서 많은 장점을 가질 수 있다.

그러나 현재까지는 채혈이나 도살에 의하여 혈액으로부터 항체를 얻고 있어서 비용이 많이 들고, 방법상에서도 어려움이 많다. 이에 비하여 계란항체는 난황에 고농도로 축적되어 있고[10, 11], 도살 없이도 꾸준히 생산되기 때문에 여러가지 어려움 들을 극복할 수 있을 것이다. 또한 계란항체의 경구투여에 의하여 실험동물의 장내독소 *E. coli*에 대한 예방효과[12]나 rotaviral diarrhea의 감염 예방[13] 및 충치예방효과[14]가 있다고 보고되어 있어 여러 식중독균에 대한 항체의 효과도 기대할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 미생물항원으로 식중독균을 사용해서 계란 특이항체의 생산성을 검토하고 난황으로부터 λ-carrageenan, DEAE-Sephacel column을 이용하여 특이항체를 분리 정제하여, 산 안정성, 열 안정성 및 분자량 측정 등을 통하여 항체 특성을 평가하고, 응집반응, viable cell count 및 disc diffusion susceptibility test로 항균활성 등을 조사함으로써 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℃에서 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 이사브란운 산란계를 사용하였으며, 사육조건은 온도와 광도를 경산지역 5~6월의 자연조건하에 실시하였다.

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

3. 면 역

동물의 면역은 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 면역은 처음 면역 후 2주와 5주에 실시하였다. 계란은 3일마다 수집한 후 4℃에 보관하고, 혈액은 날개의 정맥에서 첫 면역 후 1주 간격으로 10주 째까지 채혈한 후 혈청을 분리한 후 -70℃에서 보관하여 분석시료로 사용하였다.

4. 난황으로부터 계란항체(IgY)의 분리정제

IgY의 분리정제는 전보와 같이 Hatta 등[16]의 방법에 따라 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 disodiumhydrogenphopshate(20mM)를 용해하고 나

서 3N HCl을 사용하여 pH 8.0으로 맞추었다. 이 용액을 DEAE-Sephacel column(ϕ5.0×10.0cm)에 분당 5mL로 통과시켰다. Column 부피의 2배 되는 20mM phosphat 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℃에서 용출액을 15%(w/v)가 되도록 sodium sulfate anhydrous powder를 가하여, 30분 동안 천천히 용해한 후 10,000 × g로 15분간 원심 분리하였다. 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 0.45μm membrane filter로 여과 후 동결건조하여 보관하였다.

5. 계란항체(IgY)활성 측정

항체활성은 전보와 같이 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)을 사용하였다[17].

6. 계란항체 특성 실험

1) 열처리

IgY(WSF powder)용액(10mg/mL, PBS, pH 7.4)을 65℃ 이하에서는 30분, 65℃ 이상에서는 15분간 가열한 후 각 항원에 대한 항체 활성도를 ELISA reader(Model 550 BIOD, USA)로 측정하였다

2) 산처리

IgY(WSF powder)용액(10mg/mL PBS pH 7.4)을 0.1N HCl로 pH 2~7까지 조정한 후, 각 용액을 37℃에서 5시간 동안 배양한 다음 2M Tris로 중화처리하였다. 각 항원에 대한 항체 활성도를 ELISA reader(Model 550 BIO-RAD, USA)로 측정하였다.

7. 항균 활성

1) 계란 항체에 의한 항원의 응집반응

IgY가 항원으로 사용된 균체를 응집시키는 정도를 측정하였다. PBS로 희석한 IgY(30mg/mL)와 PBS에 현탁한 각 균체(O.D.=1.0)를 동량혼합하고 실온에 방치하여 반응시키고 광학현미경으로 응집이 나타나는지를 관찰하였다.

2) Viable cell count

Test culture(1×10^6 CFU Antigen/mL TSB medium)에 37.5~150mg/mL 농도의 IgY(WSF powder)를 넣는다. 배양된 시료는 0, 1, 3 그리고 5시간 뒤에 넣는다. Viable cell count는 bacteria-IgY 혼합물을 몇 단계 희석한 후 TSB agar plate에 도말한 후, 37℃에서 24시간 동안 배양하여 coating하였다.

3) Disc diffusion susceptibility test

Disc diffusion susceptibility test법은 Koneman 등[18]에 따라 검색하였다. TSB agar 평판배지상에 1×10^6cell/plate의 균액을 분산평판법으로 도말하였다. IgY를 millipore filter(0.45nm)로 여과한 후, TSB agar배지 위에 밀착시킨 paper disc에 각 항원에 대한 항체(IgY)를 20μl씩 분주하였다. 이를 37℃에서 24시간 동안 배양하여 disc에 형성된 증식저지환(clear zone)을 관찰함으로써 항균활성을 검색하였다. 이때 대조구로 normal IgY 용액의 증식저지환을 검색하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 계란 항체의 안정성

1) 열 처리의 안정성

난황내의 *S. typhimurium*의 특이항체에 대한 열안정성을 ELISA로 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 이들 IgY 항체의 온도에 대한 안정성은 60℃에서 30분 가열시 각각 91.5%, 65℃에서 15분 가열시 각각 73.2%의 활성도를 나타내었다. 70℃정도 이상에서 급속히 항체 활성도가 떨어졌으며, 80℃에서 15분간 가열 시는 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. 우유에 있는 IgG가 70℃에서 30분간 가열 시

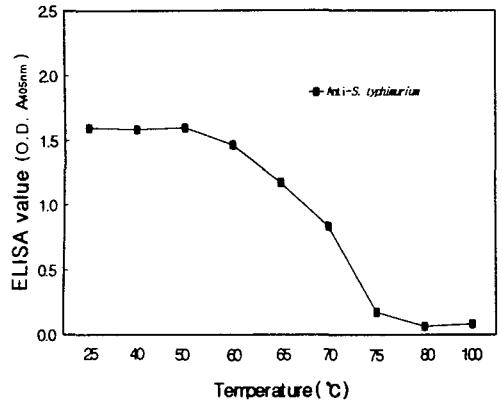

Fig. 1. Heat stability of IgY solution(10mg/mL). The antibody activity was expressed as ELISA value(O.D. at 405nm).

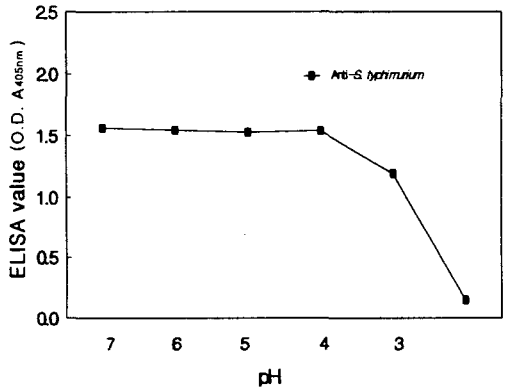

Fig. 2. Acid stability of IgY solution(10mg/mL). The antibody activity was expressed as ELISA value(O.D. at 405nm).

89%의 변성을 나타내는 것[19]과 비교해 볼 때 본 실험에서의 IgY는 47.6%의 변성을 나타내었다.

Shimizu 등[20]은 다양한 가공조건하에서 IgY의 안정성에 있어 설탕의 효과에 대하여 연구하였다. 30~50%의 설탕이나 전화당을 첨가하면 70~80℃에서도 IgY의 활성도에 있어 열변성이 현저히 억제되었다고 보고하였다. 이러한 성질을 이용하여 식품산업에 있어서 IgY를 가공저장에 이용할 수 있으리라 사료된다.

2) 산 처리의 안정성

Table 1. Agglutination of antigen by IgY

IgY	Agglutinating dilution fold of IgY
Negative control	-
Anti-*S. typhimurium*	1/2

Antigen(O.D. 1.0 at 600nm in PBS) 100 μL and same volume of diluted IgY were mixed in round bottom plate for 1hr at R.T.
The aggregation was detected by light microscope.

Fig. 3. Visualization of agglutination by IgY using light microscope.
A : Negative control, B : Anti-*S. typhimurium*

S. typhimurium 특이항체의 산에 대한 항체 활성도를 측정한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 즉 pH 7부터 pH 4까지는 각각 98.7%의 활성도를 유지하다가 pH 3부터 급격히 감소하기 시작하여 pH 2에서는 9.6%로 거의 활성도를 나타내지 않았다.

본 결과는 Shimizu 등[15]이 *E.coli*를 항원으로 하여 산란계에 면역시킨 후 그 IgY의 산 처리 후의 활성도를 실험한 결과 및 Kaneko 등[13]이 소의 IgG에 대해 실시한 결과와 비슷한 경향을 나타내어 난황내의 IgY는 산에 대하여 매우 높은 안정성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

2. 항균 활성

1) 특이 항체에 의한 항원 응집반응

S. typhimurium 특이 항체에 의한 응집가에 대한 결과는 Table. 1과 Fig. 3에서와 같다. 항원에 의해 면역되지 않은 계란 항체는 응집을 일으키지 않은 반면 *S. typhimurium* 특이항체는 2배의 응집가를 나타내었다.

본 실험에서 *S. typhimurium* 특이항체가 항원에 대해서 응집반응을 형성하는 것은 산란계에 면역시

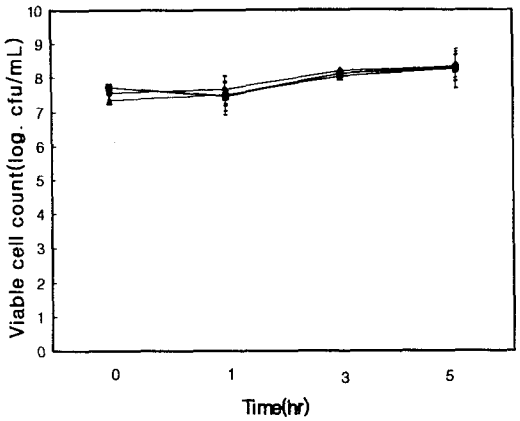

Fig. 4. Effect of the anti-*S. typhimurium* antibody IgY on the growth of *S. typhimurium*.
●-●:control, ■-■:IgY 150mg/mL, ◆-◆:IgY 75mg/mL, ▲-▲:IgY 37.5mg/mL.

킨 *S. typhimurium* 항원에 의해서 생성된 IgY가 활성은 다소 미흡하나 항체로서의 특이적인 반응을 하고 있음을 확인할 수 있었다. 향후 보다 활성도가 높은 응집반응을 확보하기 위해서 *S. typhimurium* 항원의 전처리 방법, 항원 투여량, booster기간과 횟수 등 활성도 증가조건의 확보가 요구된다.

2) Viable cell count

특이항체 IgY가 생균 *S. typhimurium* 항원에 대해서 어느 정도의 살균효과를 가지는 가를 조사하기 위해서, *in vitro* 상에서 사용된 균주와 함께 배양하면서 본 생균수의 변화를 관찰하였다. 그 결과는 Fig. 4와 같다.

본 실험에서 Anti-*S. typhimurium* 항체량은 37.5 mg/mL, 75mg/mL, 150mg/mL의 양으로 *S. typhimurium*의 증식을 억제하는 유의한 결과는 확인할 수 없었으며, 대조군과도 유의성 있는 차이를 보이지 않아 특이항체 IgY가 본 실험조건에서의 양으로는 균의 성장에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이 결과는 응집반응 결과와 Disc diffusion susceptibility test 결과와 상이한 결과로서 항체의 역가에 상응하는 충분하지 못한 항체의 양으로 인한 원인으로 추측된다

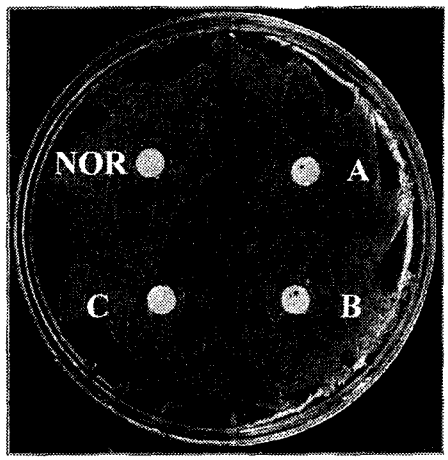

Fig. 5. Antimicrobial activity of the purified anti-*S. typhimurium* IgY.
NOR:control 25mg/mL, A:25mg/mL, B:12.5mg/mL, C: 6.25mg/mL.

3) Disc diffusion susceptibility test 결과

Disc diffusion susceptibility test법으로 정제된 계란항체 IgY의 항균활성을 검토하기 위하여 anti-*S. typhimurium* 항체 6.25mg, 12.5mg, 25mg의 농도로 사용하여 항균효과를 조사하였다. 그 결과는 Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 대조군에서는 전혀 항균현상을 확인할 수 없었으나 25mg/mL에서 약한 항균력을 확인할 수 있었다.

Ⅳ. 요 약

Salmonella typhimurium 항원에 의해서 면역된 계란 특이항체(IgY)를 분리정제하여, Anti-*S. typhimurium* 항체의 온도에 대한 활성을 실험한 결과 60℃에서 30분 가열시 91.5%, 65℃ 에서 15분 가열시 각각 73.2%의 활성도를 나타내었으며, 80℃에서 15분간 가열 시는 거의 활성이 없는 것으로 나타났다. pH에 대한 안정성은 pH 7부터 pH 4까지는 각각 98.7%의 활성도를 유지하다가 pH 3부터 급격히 감소하여, pH 2에서는 9.6%로 거의 활성도를 나타내지 않았다. 항균활성은 생균수 측정에서는 항균활성을 확인할 수 없었으나, 응집반응과 disc diffusion susceptibility test에서 측정한 anti-*S. typhimurium*

항체의 항균활성도는 미약하나 확연한 미생물 억제 현상을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서, 본 실험에서 사용된 IgY는 항원에 대한 항체특성 및 항균효과 등을 고려해 볼 때 앞으로 식중독균 제거 및 예방 치료뿐만 아니라 식품산업 소재, 각종 질병예방을 위한 의약품 소재, 연구용 kit와 진단용 kit 및 축산분야 등 다양한 분야에서 응용될 수 있으리라 기대된다.

V. 참고문헌

1. Kim, C. N. and Poh, W. S.: Microbial risk assessment of processed foods in Korea. J. Fd Hyg. Safety, 12, 340, 1997.
2. 藤原喜久夫: 食品衛生Handbook細菌性食中毒. 南江堂, p.52, 1992.
3. Lee, Y. W. and Kim, J. G.: A study of the trend of food poisoning outbreaks, reported cases, in Korea. Kor. J. Food Hyg., 2, 215, 1987.
4. Losch, U., Schranner, I., Wanke, R., and Jurgens, L.: The chicken egg, and antibody source. J. Vet. Med., Series, B., 33, 609, 1986.
5. 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.
6. Williams, J.: Serum proteins and the livetins of hen's-egg yolk. Biochem. J. 83, 346, 1962.
7. Patterson, R., Youngner, J. S., Weigle, W. O. and F. J.: Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. J. Immunol., 89, 272, 1962.
8. Polson, A., Von Wechmar, M. B. and Van Regenmortel, M. H. V.: Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hen. Immunol. Commun., 9, 475, 1980.
9. Altschuh, D., Hennache, G. and Van Regenmortel, M. H. V.: Determination of IgG and IgM levels in serum by rocket immunoelectrophorsis using yolk antibodies from immunized chickens. J. Immunol. *Methods*, 69, 1, 1984.
10. Kaspers, B., Schranner, I. and Losch, U.: Distribution of immunoglobulins during embryogenesis in the chicken. J. Vet. Med., A38, 73, 1991.
11. Patteson, R., Youngner, J. S., Weigle, W. O. and Dixon, F. J.: Antibody production and transfer to egg yolk in chicken. J. Immunol., 89, 272, 1962.
12. Yokoyama, H., Peralta, R. C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y. and Kodama, Y.: Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. Infect. Immun., 60, 99, 1992.
13. Bartz, C. R., Conklin, R. H., Tunstall, C. B. and Steele, J. H.: Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. J. Infect. Diseases, 142, 439, 1980.
14. Hamada, S., Horikoshi, T., Minami, T., Kawabats, S., Hiraoka, J., Fujiwara, T. and Ooshima, T.: Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of mutans. Infect. Immun., 59, 4161, 1991.
15. 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.
16. Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T.: A novel isolatio method for hen egg yolk antibody, IgY. Agirc. Biol. Chem., 54, 2531, 1990.
17. 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 whol organism in an elisa technique. J. Immunoassay, 6, 23, 1985.
18. Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M.,

Schreckenberger, P. C. and Winn, W. C.: Diagnostic Microbiol. *(4th ed.)*, Lippincott Co., Philadelphia, p.659, 1992.

19. Larson, B. L. and Rolleri, G. D.: Heat denaturation of the specific serum proteins in milk. J. Dairy Sic., 38, 351, 1955.
20. Shimizu, M., Nagashima, H., Hashimoto, K. and Suzuki, T.: Egg yolk antibody(IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentration. J. Food. Sci., 59, 763, 1994.