

Anti-*Helicobacter pylori* IgY의 처리조건에 따른 안정성에 관한 연구

정순희* · 김현주* · 이수원** · 이남형*

(주)에그바이오텍*, 성균관대학교 식품생명공학과**

Stability of Anti-*Helicobacter pylori* IgY Under Some Condition

S. H. Jung*, H. J. Kim*, S. W. Lee** and N. H. Lee*

Eggbiotech Corp.*, Department of food biotechnology, Sungkyunkwan University **

ABSTRACT

The aim of this experiment was to evaluate the stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in water soluble fraction (WSF) of egg yolk according to the heat, pH and digestive enzyme treatment. Anti-*H. pylori* IgY content of WSF remained 76% after pasteurization (63°C for 30 min). The stability of anti-*H. pylori* IgY at different pH showed a tendency to diminish according to decreasing pH from 7.0 to 1.5 ($p < 0.05$). Anti-*H. pylori* IgY content was 84.4% after treatment for 1 hour at 37°C in pH 5.0. There were significantly differences in IgY content between 1 hour and 2 hours at pH 2.0 in 200 units of pepsin treatment ($p < 0.05$). However, IgY was relatively stable at pH 4.0 regardless of the reaction time and the concentration of pepsin. The stability of IgY of egg yolk after the treatment of trypsin was significantly higher than that of water soluble fraction ($p < 0.05$). This results indicated that anti-*H. pylori* IgY showed relatively a good stability on heat, pH and digestive enzyme.

(Key words : IgY, Egg yolk, Treatment, Water soluble fraction, *Helicobacter pylori*)

I. 서 론

Helicobacter pylori(*H. pylori*)는 전 세계 인구의 50% 이상이 감염되어 있고(Hunt, 1996; Owen, 1998; Warren and Marshall, 1983), 우리나라 성인의 60~70%가 감염되어 있다(이와 윤, 1990). *H. pylori*는 1983년 호주의 Marshall과 Warren에 의해 인체의 위점막에서 처음 분리되었고, 만성위염 및 소화성 궤양의 재발 원인인 자임이 밝혀졌다(Hopkins 등, 1996; NIH, 1994; Peterson, 1991). 그리고 위암과 위에 나타나는 림프종의 일부 원인으로 추정되어(Parsonnet 등, 1991; Parsonnet 등, 1994), *H. pylori*의 박멸을

위한 다양한 치료방법이 연구되고 있다. 현재 까지 위궤양 및 십이지장 궤양 치료제로는 위산 분비를 억제하는 H₂ blocker가 주류를 이루고 있으나 이것은 치료효과는 높지만 치료 후 재발하는 것이 특징이다. 재발률이 높은 이유는 H₂ blocker를 투여하여도 *H. pylori*가 완전히 제거되지 않은 것에 기인된다. 따라서 위 혹은 십이지장에서 약물투여가 *H. pylori*의 감염에 대해 치료의 주된 방법이나 항생제에 대한 내성 및 약물의 부작용 등이 치료의 문제점으로 제시되고 있다. 그러므로 최근에는 항생제를 사용하지 않고 *H. pylori*를 치료할 수 있는 비항생제성 물질로 관심을 돌리고 있다. 그

Corresponding author : N. H. Lee, Eggbiotech Corp. 161-8, Yeomni-dong, Mapo-gu, Seoul, Korea.

Tel : 82-02-715-8568, Fax : 82-02-715-8569, E-mail : egg2006@eggbiotec.co.kr

예로 유산균 발효유(박 등, 2001), 포도주(Brenner 등, 1999), 비타민 D(Correa 등, 2000), 녹차의 catechin(Mabe 등, 1999) 등에 대한 연구가 이루어지고 있다.

일반적으로 어떤 질병의 원인균에 대한 항체를 만들어내고, 그 항체를 이용하여 질병의 치료를 행한다면 가장 이상적인 방법이 될 것이다. 종래 토끼나 랫드 등 포유류를 과면역시켜 그 혈액으로부터 특이적인 항체를 얻었으나 혈액으로부터 얻어지므로 체혈로 인한 여러 어려움이 있다. 그러나 난황으로 이행된 항체를 얻는 방법은 종래의 방법과 비교하여 채란과 항체 수집이 용이하고 비용이 절감된다는 잇점이 있다. 조류이하의 동물 즉 난생동물의 경우, 어미 닭이 획득한 면역항체는 난황 중에 이행되어 축적되고 자손에게 전해지는 독특한 성질을 이용하여 여러 종류의 항원을 산란계에 과면역시켜 특이항체를 얻는 방법이 확인되었다(Patterson 등, 1962). 난황 중의 항체는 포유류의 IgG에 해당되나 화학적 성질이 약간 다르고 난황유래의 항체이므로 비교면역학 분야 등에서는 IgY (Immunoglobulin in Yolk)라 부른다.

본 연구는 위염 및 십이지장염을 일으키는 주요 원인균인 *H. pylori* 균을 항원화하여 산란계에 과면역시켜 특수 면역단백질 함량을 높이고, 유제품 및 식품에서의 이용가치를 증진시키기 위하여 살균조건, pH 및 소화효소에 따른 면역단백질(IgY)의 안정성에 관하여 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. *H. pylori* 배양

H. pylori(ATCC 43504)는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양받아 10%(v/v)의 양혈청(Sheep Serum)을 첨가한 trypticase soy agar(BBL 11768, USA)에 접종한 후 37°C, 10% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후 생성된 colony는 urease 및 catalase 시험, gram staining 과 운동성으로 *H. pylori*임을 확인하였다. 그 후 배양된 균주는 20%(v/v) glycerol을 첨가한 trypticase soy broth에 현탁한 후 액체질소에 보관하였다가 사용하였다.

2. 항원화 및 백신 방법

배양된 *H. pylori* 균액에 포르말데하이드(formaldehyde)를 0.2%(v/v)가 되도록 첨가하여 실온에서 24시간 동안 불활화시켰다. 그 후 4,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균을 회수하고 멸균생리식염수(pH 7.2)로 3회 세척하였다. 백신에 사용된 균체수는 개체당 1×10^8 cells 이고, 항원과 면역보조제(1차 접종시; aluminum hydroxide, Reheis INC. USA., 2, 3차 접종시; motanide ISA 25, Seppic Co. France)를 1: 1로 혼합하여 유회시킨 후 개체당 0.5 ml 씩 36주령의 산란계에 2주 간격으로 3회 가슴에 근육주사 하였다.

3. 시료 준비

*H. pylori*를 항원으로 하여 면역된 닭으로부터 얻은 계란을 할란하여 난백을 제거한 후 난황액을 본 연구에 사용하였다. WSF(water soluble fraction)의 분리는 난황액을 동량의 증류수와 함께 잘 혼합한 후 난황액의 4배 분량의 0.1% λ -carrageenan(Sigma Co.)을 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 다음 10,000x g에서 15분간 원심분리 하였다. 분리된 상정액은 여과지(Whatman NO. 2)로 여과하여 각 실험에 사용하였다.

4. 살균조건에 따른 IgY의 역가 변화

살균조건에 따른 특수면역단백질의 specific IgY 함량 변화는 5 ml의 증류수에 WSF를 1% 첨가하여 저온 살균법, 과일쥬스 살균법, 초고온 단시간 멸균법으로 처리한 후 특수항체 함량을 ELISA로 측정하였다. 살균조건별 살균온도와 시간은 Table 1과 같다.

5. pH에 따른 IgY의 역가 변화

pH에 따른 특수면역단백질의 specific IgY 함량 변화는 5 ml의 증류수에 WSF를 1% 첨가하고 HCl로 pH 1.5, pH 2.0, pH 2.5, pH 3.0, pH 5.0, pH 7.0으로 조정하여 37°C, 1시간동안 처리한 후 특수항체 함량을 ELISA로 측정하였다.

6. 소화효소 처리시 역가 변화

난황액과 WSF가 위내에서 분비되는 효소인 pepsin과 소장에서 분비되는 소화효소인 trypsin을 Table 2와 같이 농도별 및 처리시간별로 처리한 후 specific IgY 함량 변화를 ELISA로 측정하였다. 난황액을 1% 첨가한 5 ml의 증류수를 pH 2와 pH 4로 조정후 pepsin을 100 unit, 200 unit 단위로 첨가하여 37°C에서 각각 1시간에서 2시간동안 열처리하였다. 그리고 trypsin 처리는 난황액과 WSF를 1% 첨가한 5 ml의 증류수에 trypsin을 10 unit 단위로 첨가하여 30분에서 2시간 동안 열처리하였다.

7. Specific IgY 함량 분석

손 등(1998)의 ELISA 방법을 이용하여 specific IgY의 함량을 측정하였다. 먼저 coating buffer에 분산한 *H. pylori*(A₆₆₀ 0.05) 균체액 100 µl를 microplate에 분주하여 4°C에서 16시간동안 방치한 뒤 microplate를 washing solution으로 세척하였다. 세척된 microplate에 희석된 시료를 100 µl씩 넣은 후 1시간동안 처리하였다. 처리 후 2차 항체로 rabbit anti-chick IgY Ab-HRP (Sigma Co.)를 1/10,000배로 희석하여 100 µl씩 넣은 후 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 기질용액(0.01% TMB, 0.05 M citric acid-phosphate buffer, pH 5.0, 0.02% H₂O₂)을 100 µl씩 첨가하고 상온에서 30분간 반응시켰다. 반

Table 1. Sterilization conditions of water soluble fraction

	Treated temperature	Treat
Pasteurization	63°C	3
	72°C	1
Ultra-high temperature sterilization	130°C	:
Fruit juice sterilization	85°C	2
		4
		6

응 정지액으로 2N H₂SO₄을 50 µl씩 넣은 후 반응의 결과는 O.D. 450 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 결과값은 대조구를 100%로 하였을 때 각 실험구를 %로 환산하여 나타내었다.

8. 통계 분석

통계 분석은 SAS 9.2 프로그램을 이용하여 분석하였다. 각 실험의 분석은 ANOVA 검정을 이용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 그리고 대조구와 각 실험구를 비교하여 p값이 0.05 미만인 경우 유의적으로 차이가 있다고 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 살균조건에 따른 IgY의 역가 변화

WSF를 살균조건별로 처리한 후 anti-*H. pylori*

Table 2. Treated temperature, pH and time of digestive enzyme on anti-*H. pylori* IgY

Digest enzyme	Treated temperature	Treated pH	Concentration	Treated time
Pepsin	37°C	pH 2	100 unit	60 min
				120 min
			200 unit	60 min
		pH 4	100 unit	120 min
			200 unit	60 min
				120 min
Trypsin	37°C	pH 7	10 unit	30 min
				60 min
				120 min

IgY의 함량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 63°C에서 30분간, 72°C에서 15초간 저온살균 처리하였을 때, 대조군에 비해서 24%의 항체 함량이 감소하여 76%의 항체만이 잔존하였다. 그리고 130°C에서 2초간 초고온멸균 처리하였을 경우 저온살균 처리시보다 2% 잔존율이 높은 78% 항체 함량을 나타내었다. 그리고 85°C에서 과일쥬스 살균 처리시 20초간 처리한 경우 73%, 40초간 처리한 경우 60%, 60초간 처리한 경우 40%의 항체가 잔존하였다. 85°C에서 과일쥬스 살균 처리하였을 때 처리시간에 따라서 항체의 함량이 감소함을 확인하였다. 그리고 각 처리구의 모든 결과는 $p < 0.05$ 로 유의하였다. 손 등(1998)의 anti-*Streptococcus mutans* IgY의 살균온도에 따른 연구에서 대체로 온도 의존적으로 70°C까지는 조금씩 감소하여 50% 이상의 활성을 나타내었으나, 80°C 이상에서는 급격히 감소하여 항체의 활성이 거의 상실된다고 보고하였다.

2. pH에 따른 IgY의 역가 변화

WSF를 pH 처리 조건에 따라 항체의 함량을 측정한 결과 Fig. 2와 같다. 대조군을 100%로 하여 비교분석 하였을 때, pH 7.0에서 90.9%, pH 5.0에서 84.4%, pH 3.0에서 59.9%의 항체 함량을 보였으며, 강산의 조건에 해당하는 pH 2.5에서 28.6%, pH 2.0에서 19.5%, pH 1.5에서 12.2%의 항체가 잔존함을 확인하였다($p < 0.05$). 일반적으로 과일쥬스와 요구르트의 pH는 5에서 pH 3 사이라고 알려져 있는데, 이 조건하에서 약 60% 이상의 항체가 잔존함을 확인하였다. 위내 조건 중 가장 최저라고 할 수 있는 pH 2에서 항체의 함량이 20%인 것으로 보아, 강산에서도 항체의 활성을 완전히 잃지 않는 것으로 추측된다. 손 등(1998)의 anti-*S. mutans* IgY의 pH 조건에 따른 연구 결과, pH 3 이하에서 항체는 매우 불안정하였으며, pH 4에서 pH 8 사이에서는 대체로 안정하였다고 보고하였다. 또 Lee 등(2002)의 연구에서도 pH 5에서 pH 7까지 IgY는 안정하다고 보고하였다. 본 연구에서도 이와 일치된 결과를 얻었다.

3. 소화효소 처리시 역가 변화

음식물과 함께 anti-*H. pylori* IgY를 섭취하였을 때 장내 소화효소의 작용을 받게 되는데 *in vivo* 상태의 소화기관과 유사한 조건을 만들어 anti-*H. pylori* IgY의 안정성을 평가하였다. pH 2에서 난황액을 소화효소로 처리하였을 때 항체 함량의 변화를 살펴본 결과 Fig. 3과 같다. 100 unit의 pepsin 농도에서 1시간과 2시간동안 처리시 92%로 시간에 따른 항체 함량에는 차이는 없었고, 200 unit의 pepsin 농도로 처리하였을 때에는 1시간 후에는 64%, 2시간 후에는 52%의 항체가 잔존하였다($p < 0.05$). 위의 pH에 따른 역가 변화에서 WSF를 1% 첨가하였을 때에는 19.5%의 항체만이 생존하였으나 난황을 1% 첨가하였을 때에는 92% 항체의 잔존을 보였다. 이는 WSF와 난황액의 고형분 함량의 차이로 인하여 항체 잔존율에 차이를 보인 것으로 판단된다. pH 4.0의 조건에서 pepsin이 난황액에 미치는 영향을 살펴본 결과 100 unit의 pepsin 농도에서 1시간과 2시간 처리하였을 때 약 83%로 처리시간에 따른 항체 함량에는 변화가 없었다. 200 unit의 pepsin 농도에서는 100 unit로 처리한 것보다 항체의 함량이 2% 감소하였다. 이 결과로 볼 때 pepsin의 농도나 반응 시간에 관계없이 pH 4.0에서 항체는 비교적 안정하였다. pH 7.0과 37°C에서 trypsin을 처리한 후 난황액과 WSF 중 anti-*H. pylori* IgY의 함량은 반응시간이 증가함에 따라서 감소하였다. 난황액 중의 항체 함량은 120분 처리시 85%가 잔존하였으나, WSF 중의 항체 함량은 30분 처리시 62%로 감소하였다. Trypsin을 처리한 후 난황액 중 항체의 안정성은 WSF 보다 유의적으로 높았다(Fig. 4). 이는 WSF와 난황액의 고

Fig. 4. Specific IgY and Mean

*
*

*
*
*

Fig. 3. Specific IgY contents of egg yolk after treatment of pepsin at pH 2, pH

형분의 차이에 의한 것으로 추측된다. Chen 등 (1999)의 보고에 의하면 우유에서 분리한 IgG를 pH 2.0에서 pepsin을 처리 하였을 때 IgG의 함량은 92.8%가 감소한 7.2%의 잔존율을 보였다. 본 연구결과에서는 처리농도와 시간에 관계없이 50% 이상의 항체 잔존율을 나타내었다.

IV. 요 약

본 연구는 살균온도, pH 및 소화효소의 처리에 따른 anti-*H. pylori* IgY의 안정성을 평가하였다. 열 안정성 실험시 모든 처리구에서 anti-*H. pylori* IgY 함량은 대조구에 비해서 유의적으로 감소되었다($p < 0.05$). 그러나 저온살균 처리구(63°C, 30분)와 초고온살균 처리구(130°C, 2초)에서 WSF 중 anti-*H. pylori* IgY 함량은 각각 76%와 78% 이었다. pH의 안정성은 pH를 7.0에서 1.5로 감소시킴에 따라 anti-*H. pylori* IgY의 함량은 감소되는 경향을 보였다. pH 5.0으로 조정된 WSF를 37°C에서 1시간 처리한 후 anti-*H. pylori* IgY의 함량은 84.4%인데 비해서 pH 2.5에서는 28.6%의 anti-*H. pylori* IgY 함량을 보였다. 그리고 pepsin과 trypsin을 처리한 후 anti-*H. pylori* IgY의 안정성도 평가하였다. 100 unit의 pepsin에서 1시간과 2시간 처리시에는 시간에 따른 항체의 함량은 차이가 없었으나, 200 unit의 pepsin 처리구에서는 시간에 따른 항체 함량이 유의적으로 차이가 있었다($P < 0.05$). 그러나 pepsin의 농도나 반응시간에 관계없이 pH 4.0에서 항체는 비교적 안정하였다. pH 7.0, 37°C에서 trypsin을 처리한 후 난황액과 WSF 중 anti-*H. pylori* IgY의 함량은 반응시간의 증가에 따라서 유의적으로 감소되었다($P < 0.05$). 난황액 중 항체 함량은 120분 처리시 85%가 잔존하였으나, WSF 중 항체 함량은 30분 처리시 62%로 감소하였다. Trypsin을 처리한 후 난

황중의 항체의 안정성은 WSF 보다 유의적으로 높았다($P < 0.05$).

V. 인 용 문 헌

1. Brenner, H., Rothenbacher, D., Bode, G. and Adler, G. 1999. Inverse graded relation between alcohol consumption and active infection with *Helicobacter pylori*. Am. J. Epidemiol. 149:571.
2. Chen, C. C., Tu, Y. Y. and Chang, H. M. 1999. Efficiency and protective effect of encapsulation of milk immunoglobulin G in multiple emulsion. J. Agric. Food Chem. 47:407.
3. Correa, P., Fontham, E. T., Bravo, J. C., Bravo, L. E., Ruiz, B., Zarama, G., Realpe, J. L., Malcom, G. T., Li, D., Johnson, W. D. and Mera, R. 2000. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. J. Natl. Cancer Inst. 92:1881.
4. Hopkins, R. J., Girardi, L. S. and Turney, E. A. 1996. Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence. Gastroenterology. 110:1244.
5. Hunt, R. H. 1996. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. Am. J. Med. 100(5A):42S.
6. Lee, K. A., Chang, S. K., Lee, Y. J., Lee, J. H. and Koo, N. S. 2002. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. J. Biochem. Mol. Biol. 35:488.
7. Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I. and Takahashi, T. 1999. *In vitro* and *in vivo* activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1788.
8. NIH (National Institute of Health) Consensus Conference. 1994. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. JAMA. 272:65.
9. Owen, R. J. 1998. *Helicobacter*-species classification and identification. Br. Med. Bull. 54:17.

10. Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N. and Sibley, R. K. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N. Engl. J. Med. 325:1127.
 11. Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A. B., Warnke, R. A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J. H. and Friedman, G. D. 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. N. Engl. J. Med. 330:1267.
 12. Patterson, R., Youngner, J. S., Weigle, W. O. and Dixon, F. J. 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. J. Immunol. 89:272-278.
 13. Peterson, W. L. 1991. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. N. Engl. J. Med. 324:1043.
 14. Warren, J. R. and Marshall, B. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet. 1:1273.
 15. 박민정, 김주성, 임정윤, 정현채, 송인성, 유은실, 이정준, 허철성, 백영진. 2001. *Lactobacillus*가 함유된 발효유에 의한 인체 위점막에서의 *Helicobacter pylori* 억제효과. 대한소화기학회. 38:233
 16. 손동화, 노정해, 김영봉, 한찬규, 성기승, 이남형. 1998. 난황으로 부터 항충치 항체의 분리 및 그 특성. 한국식품과학회. 30:1029
 17. 이광호, 윤희상, 백승철, 이우곤, 조명제, 최휴진, 맹국영, 고광욱. 1990. 한국인(韓國人)의 위염(胃炎) 원인균(原因菌) *Helicobacter pylori* 보균실태(保菌實態). 대한미생물학회. 25:475.
- (접수일자 : 2005. 5. 18. / 채택일자 : 2005. 8. 23.)