

## Salmonella gallinarum에 대한 specific IgY의 항균력

김미현 · 노정해\* · 김영봉 · 손동화 · 정순희<sup>1</sup>

한국식품연구원, 성균관대학교<sup>1</sup>

### Antimicrobial Activity of Specific IgY against Salmonella gallinarum

Mihyun Kim, Jeonghae Rho\*, Young Boong Kim, Dong Hwa Shon, and Soon Hee Jung<sup>1</sup>

Korea Food Research Institute

<sup>1</sup>Department of Food Science, Biotechnology, Sungkyunkwan University

**Abstract** In this study, we investigated the antimicrobial effects of anti-Salmonella gallinarum-specific IgY separated from egg yolk obtained from layers immunized by S. gallinarum. The comparison tests of vaccination, content of IgY, and inoculation number were examined by microscopic observation, turbidity, and pH. The results show that the ratio of anti-S. gallinarum IgY in the total IgY was 23%. Also, the anti-S. gallinarum IgY had selectivity only to S. gallinarum. The 0.3% addition of anti-S. gallinarum-specific IgY resulted in agglutinating clusters of S. gallinarum cells, but the agglomeration didn't occur in IgY from layers not immunized nor in the control group. Microscopic observation indicated agglomerative cells when IgY was added at 0.2% or higher, and the pH and turbidity examinations revealed that a suppression effect was remarkable in IgY at more than 0.1%. These results suggest the possibility that IgY extracted from eggs and obtained from layers immunized by S. gallinarum can be used to prevent fowl typhoid.

**Key words:** Salmonella gallinarum, specific IgY, antimicrobial activity, egg yolk

## 서 론

살모넬라 갈리나룸(Salmonella gallinarum)은 가금티푸스의 원인균으로서 국내에서 1992년에 처음 보고되었으며, 발생빈도는 해마다 증가하고 있는 실정이다. 가금티푸스의 완벽한 방제법은 없으나 발생 방지를 위해서는 예방 접종을 실시하고, 항생제를 급여하는 등 여러 방법이 있다. 그러나 산란 중인 닭에 항생제를 급여하면 그 산란계로부터 생산된 계란에는 잔류약제 성분이 일부 이행되어 계란을 식용할 수 없게 된다. 그러므로 생산 비용이 비교적 저렴하고도 안전한 항균제의 공급이 필요하며, 이를 위하여 계란을 이용한 가금티푸스 항체를 생산하고자 한다(1).

일반적으로 어떤 질병의 원인균에 대한 항체는 그 질병의 치료나 예방을 위하여 활용할 수 있을 것이다. 종래의 항체 생산에서는 면역한 토끼나 쥐 등 포유류의 혈액으로부터 특이적인 항체를 얻었으나 채혈하기도 어렵고, 필요시 매번 채혈해야 하며 항체양도 적은 단점이 있었다. 그러나 닭의 경우 어미닭이 획득한 면역항체는 난황 중의 이행되어서 축적되고 자손에 전하기 때문에, 난황으로부터 항체를 얻는 방법은 종래의 포유류 방법과 비교하여 채란과 항체 수집이 용이하고 비용도 절감되는 잇점이 있다(2-5). 난황 중의 항체는 포유류의 IgG 계통의 항체에 해당되나 단백질화학적 성질이 약간 다르고 또한 난황유래의 항체이므로 비교 면역학 분야에서는 IgY(immunoglobulin Y)라 부른다

(6). 산란계 한 마리가 1년간 생산하는 난황에서 약 50 g IgY가 얻어지며, 그 생산성은 토끼의 경우보다 120배 높은 것으로 보고되었다(7-9). 또한 IgY는 80°C의 열에 15분을 가열하여도 활성이 안정하며, pH처리의 경우 pH 3까지는 IgY의 활성이 안정한 것으로 나타났다(10). 현재 난황의 특이 항체를 이용한 산업적 연구들은 여러 분야에서 활발히 이루어지고 있는데 사람과 가축에서 rotavirus에 의한 설사증 예방(11), 충치의 예방(12), Helicobacter pylori 항체(13), 양식어 감염증에 대한 항체(14-15) 등이 있다. 최근에도 IgY에 대한 연구는 매우 활발하게 이루어지고 있으며 anti-Vibrio anguillarum IgY 효능 조사(16), 림프스포리디움증(Cryptosporidium parvum)에 감염에 대한 IgY 효과(17), 난포성 섬유증(cystic fibrosis)을 예방(18), 중증급성 호흡기 증후군(severe acute respiratory syndrome)에 대한 항체 생산(19), Anti-enteropathogenic E. coli에 대한 IgY 항체 생산(20) 등의 연구가 있다.

본 연구는 Salmonella gallinarum 균주로 면역화된 산란계로부터 생산된 계란 난황 중에 들어 있는 anti-S. gallinarum IgY를 분리하여 IgY의 항균 효능을 살펴보았다. 또한 면역화 여부, specific IgY 농도별 및 균수별에 따른 항균력을 현미경적 관찰 및 탁도, pH 변화 측정에 의한 IgY의 항균력 효과를 검토하고자 하였다. 이 연구를 통하여 계란의 난황으로부터 부가가치가 높은 기능성 소재를 개발함으로써 계란의 이용을 높이고 수익성을 증대시켜 추가적이고 안정적인 수요 기반의 확충을 도모하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### Salmonella gallinarum 배양

면역화된 IgY 함유 계란을 생산하기 위하여 Isabrown종(19주령) 산란계를 200수 구입하여 사육하였으며, 사료는 대추용 사료

\*Corresponding author: Jeonghae Rho, Korea Food Research Institute, Baekhyun-dong 46-1, Bundang-gu, Seongnam, Korea  
Tel: 82-31-780-9060  
Fax: 82-31-709-9876  
E-mail: drno@kfri.re.kr  
Received April 13, 2007; accepted August 30, 2007

(Jeilfeed Co., Seoul, Korea)에 참숯 0.5%(사료용 참숯, Daemyung Chamsoot, Jincheon, Korea)를 첨가하여 사용하였다(21). 균주는 수 의과학검역원에서 동결건조된 *S. gallinarum*(ATCC 9148)을 구입 하였다. 냉동 건조된 균주의 재생산을 위해 ampule을 70% 알코올로 소독하고 자른 다음 생리 식염수를 0.5 mL 가한 후 멸균된 pasteur pipet으로 잘 섞어 tryptic soy broth; TSB(Difco, Ann Arbor, MI, USA)에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양된 균주는 20%(v/v) glycerol을 첨가한 TSB에 현탁한 후 액체 질소에 보관하면서 사용하였다.

### 항원화 및 면역방법

*S. gallinarum*을 TSB에서 배양하여 균체를 멸균 생리 식염수 (pH 7.2)에 모았다. 모은 균체액에 포름알데하이드(formaldehyde)를 총량의 0.2%(v/v)가 되도록 첨가하여 실온에서 24시간 동안 불활성화시켰다. 균체액을 4,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균을 회수하고 멸균생리식염수로 3회 세척하였다. *S. gallinarum*의 균체와 Freund's adjuvant(0638-60-6, Difco, Sparks, MD, USA)를 1:1(v/v)로 emulsion을 제조하여 산란계의 근육에 면역하였다. 이때 면역한 항원의 균체수는 마리당  $10^8$  CFU를 사용하였고 주사량은 1 mL를 하였다. 이후 같은 방법으로 2주 간격으로 2차례의 추가 면역(1차-adjuvant complete, Freund's 사용, 2·3차-adjuvant incomplete, Freund's 사용)을 실시하였다(22).

### 난황으로부터 항체(IgY)의 분리

난황 중에서 IgY 분리정제는 Hatta(23)의 방법을 기준으로 하였다. 즉, 난황을 같은 양(w/v)의 증류수와 함께 잘 섞은 후 3분간을 방치하고, 난황의 4배 분량(w/v)의 0.1%  $\lambda$ -carrageenan(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 섞었다. 이것을 상온에서 30분간 방치한 다음  $10,000 \times g$ , 15분간 원심분리를 한 후 Whatman #2 여과지로 여과하여 수용성 단백질 분획(water soluble protein fraction; WSPF)을 얻었다. 한편 분리된 시료는 동결건조기(Ilshin TD5070A, Yangju, Korea)를 이용하여 분말로 제조하였다.

### IgY의 효능 평가

전체 IgY 중에서 특이항체의 함량을 조사하여 IgY 항체의 항원에 대한 결합능력을 조사하였다. Anti-*S. gallinarum* IgY WSFP 원액 0.5 mL와 *S. gallinarum* 균체분산액( $A_{660nm} = 2.3$ 으로 조절한 것)을 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL을 혼합하고 여기에 phosphate buffered saline(PBS)을 첨가하여 최종 부피 1.5 mL로 조절한 다음, 37°C에서 3시간 처리하고, 이어서 4°C에서 24시간 처리하여 면역복합체(Ag-Ab complex)를 형성시켰다. 또한 균체 분산액에서 유래하는 가용성 물질의 영향을 배제하기 위하여 IgY 용액 대신 PBS를 사용하여 위와 같이 마찬가지로 처리하여 함께 준비하였다. 그 후 10,000 rpm에서 원심분리하여 면역복합체를 제거하고 상정액을 회수하여 각 균체밀도(항원농도)별 상정액의  $A_{280nm}$ 을 측정하였다. 상정액의 측정값에 항원무첨가 처리구의 값을 뺀 수치의 결과를 '균체밀도 : 흡광도'로 plot하여 최저 흡광도를 구한 후, 다음의 식으로 전체 용액 중 특이항체의 비율을 구하였다. IgY 용액의 농도는  $A_{280nm}$ 에 비례하여  $A_{280nm} < 0.8$  범위에서는 비례하는 것으로 나타났다(24).

$$\text{Specific IgY} = \frac{\text{Abs. of blank} - \text{minimum Abs.}}{\text{Abs. of blank}} \times 100 (\%)$$

### 특이항체의 균주특이성 조사

항체의 항원에 대한 결합 능력을 조사하기 위하여, ELISA에

의하여 유사한 세 종류의 *Salmonella* 균주(*S. gallinarum*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*)에 대한 특이항체의 균주 특이성을 조사하였다. 먼저 균체를 회수하고 660 nm에서 0.07이 되는 지점까지 희석하여 microplate에서 하룻밤 coating하였다. 난황의 WSFP를 0.02 M Tris-HCl saline pH 9.0 buffer로 50배 희석한 후 microplate에 넣고 냉장고에서 overnight 하였다. Standard 용 균주들과 난황항체와 결합된 균주들을 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 세척하고, rabbit anti-chicken IgG Ab-HRP(G135A, Promega, Madison, WI, USA)을 3000배 희석하여 반응시켰다. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine tablets dihydrochloride(Sigma)와  $H_2O_2$ 를 넣은 phosphate-citrate buffer를 기질용액으로 사용하여 1시간 동안 반응시킨 후 2 N  $H_2SO_4$  용액으로 반응을 정지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 특이항체의 항균성 검사

생산된 IgY의 *S. gallinarum* 균주에 대한 항균력 효과를 확인하기 위하여 면역처리구와 비면역처리구간의 비교시험을 시행하였으며, 이 때 사용한 균주와 균수는 *S. gallinarum*,  $10^3$  CFU/mL이었다. IgY의 농도별 시험은 조난황 specific IgY 분말을 0, 5, 10, 15%가 되게 멸균 증류수에 녹인 후 membrane filter를 사용하여 여과 제균하여 시험에 이용하였다. 제균된 IgY 용액 0.1 mL를 배지 4.9 mL에 혼합하여 IgY의 최종농도가 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%가 되게 하였으며, 이때 사용한 균주와 균수는 *S. gallinarum*  $10^3$  CFU/mL이었다.

접종 균수별 항균력 효과를 검토하기 위하여 *S. gallinarum* 균주를 0,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  CFU/mL으로 희석하여 접종하였으며 IgY 첨가 농도를 0.3%로 하였다. 현미경 관찰에 의한 유효성 시험을 위하여 상기의 specific IgY 농도별 항균력 시험, 균수별 항균력 시험에서 균 형태 변화를 현미경(Olympus BH-2, Tokyo, Japan)를 이용하여 사진을 찍었다. 균배양액의 수소이온농도는 pH meter(pH meter 430, Coming, New York, NY, USA)를 이용하여 시험관에서 직접 측정하였다. 탁도변화에 의한 시험에서는 시험관에 희석된 균액 1 mL와 TSB 9 mL를 넣고 37°C에서 배양하면서 배양시간별로 시험관내의 상등액을 일정하게 취하여 spectrophotometer(SRIS4000, Aqua Quest, Mexborough, South Yorkshire, England)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다(25).

## 결과 및 고찰

### IgY의 효능의 평가

항체의 항원에 대한 결합 능력 조사하기 위하여 전체 IgY 중에서 특이항체의 함량을 분석하였다. Anti-*S. gallinarum* IgY를 여러 가지 농도의 *S. gallinarum*과 반응시키고 원심분리를 통하여 복합체를 이룬 IgY를 제거한 후 나머지 IgY의 농도를 재어 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 상대적인 항원의 농도가 0.6일 때 가장 낮은 흡광도를 나타내므로 이때의 흡광도를 최저흡광도로 간주하고 방법에 명시한 식에 의하여 계산하면, 전체 용액 중 특이항체의 비율이 23%이다. 한편 Kim 등(15)의 논문과 비교하면 전체 IgY 중 항 에드워드스균의 특이 항체의 비율이 38.2%, 항 연쇄상구균의 특이항체는 10.9%로 나타났다. 살모넬라균 IgY 항체는 에드워드스균 IgY 항체 보다는 낮은 결합능력을 보였고, 항 연쇄상구균 IgY 항체 보다는 높은 결합능력이 있는 것으로 나타났다. 이는 항체가 항원에 결합하는 능력이 항원의 종류에 따라 차이가 있는 것을 설명한다.

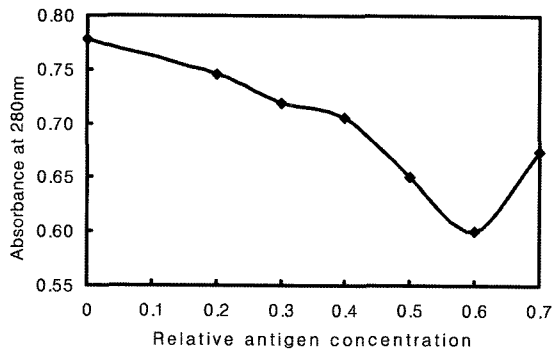


Fig. 1. Quantitative immunoprecipitation of Anti-*S. gallinarum* IgY and *S. gallinarum*. The results were shown as the absorbance of the supernatants after removal of the immune complexes.

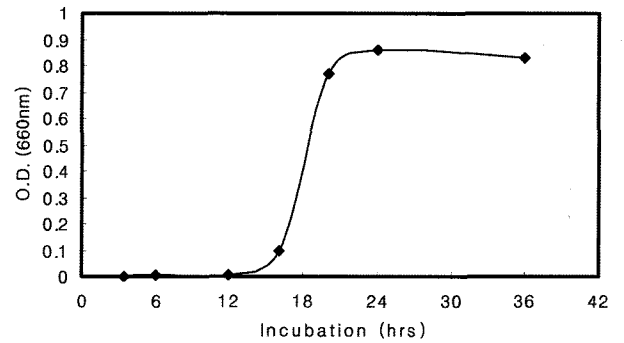


Fig. 3. Changes on turbidity of *S. gallinarum* broth by incubation time. *S. gallinarum* was inoculated by  $10^3$  CFU/mL in tryptic soy broth.

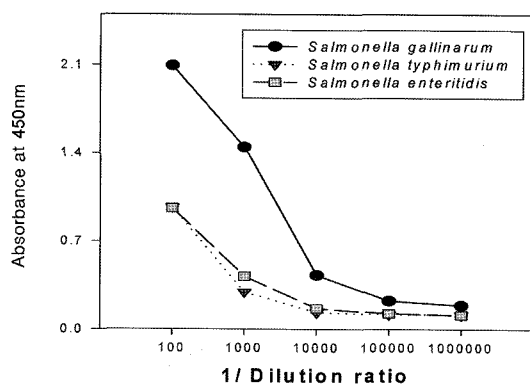


Fig. 2. Reactivities of anti-*S. gallinarum* specific IgY at various dilution rate against the strains of *S. gallinarum*.

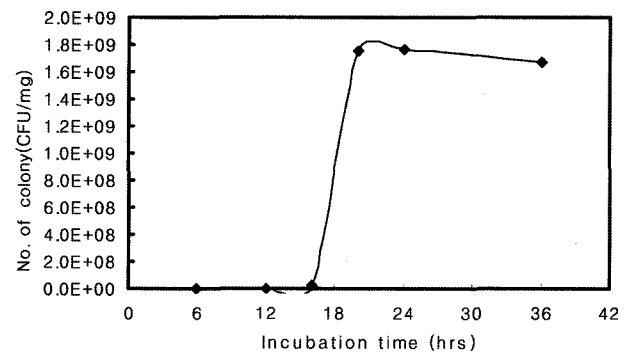


Fig. 4. Changes on colony count of *S. gallinarum* broth by incubation time. *S. gallinarum* was inoculated by  $10^3$  CFU/mL in tryptic soy broth.

Table 1. Cross-reactivity of specific IgY to the strains of *Salmonella*

Strain	EC <sub>50</sub> (relative dil. rate)	Reactivity (%)
<i>S. gallinarum</i>	1/3273 <sup>1)</sup>	100.0
<i>S. typhimurium</i>	1/100	3.1
<i>S. enteritidis</i>	less than 1/100	less than 3.1

<sup>1)</sup>  $\frac{EC_{50} \text{ of } S. \text{gallinarum}}{EC_{50} \text{ of strain}} \times 100$

특이항체의 균주특이성 조사

*S. gallinarum*를 항원으로 접종하여 발생된 IgY가 유사한 다른 균과 *S. gallinarum*를 구분할 수 있는가에 대해 알아보기 위하여 세 종류의 *Salmonella* 균주(*S. gallinarum*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*)에 대한 특이항체의 균주 특이성을 비경합 간접 ELISA로 조사하였다. *S. gallinarum*을 660 nm에서 0.07이 되는 지점까지 희석하여 coating하였고 1차 항체, IgY는 100배에서 100,000배까지 희석하여 사용하였다. 또한, anti-chicken IgG-HRP는 30,000 배 희석하여 사용하였다. Fig. 2에서 각 균주별 A<sub>450nm</sub> 값이 1.0을 나타낼 때의 상대적인 항체희석배율을 비교하고 균주 *S. gallinarum*에 대한 특이항체의 반응율을 100%로 하여, 특이항체의 각 균주에 대한 반응성을 수치화 하였다(Table 1). ELISA 결과에서와 같이 특이항체와 반응성이 가장 뛰어난 균주는 *S. gallinarum*이었으며 다음으로 *S. enteritidis*였고 *S. typhimurium*은 시험한 균주 중 가장 낮은 반응성을 나타내었다. 이러한 결과로서 *S. gallinarum*의 면역화에 의해 생성된 IgY는 *S. gallinarum*에 대해서만 특이

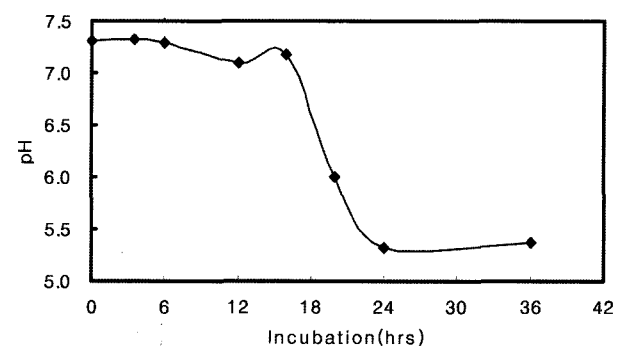


Fig. 5. Changes on pH of *Salmonella gallinarum* broth by incubation time. *Salmonella gallinarum* was inoculated by  $10^3$  CFU/mL in tryptic soy broth.

성을 갖는 항체임을 확인 할 수 있었다. 또한 위와 비슷한 특이항체의 균주의 특이성을 조사한 Shon 등(24)의 논문에서도 층치 유발균주는 혈청형 c 균주에서 반응성 가장 좋은 것으로 나타났다.

균 배양시간에 따른 탁도와 균수의 변화

*S. gallinarum* 균주를 TSB에 접종한 후 배양 시간에 따른 탁도(turbidity)의 변화는 Fig. 3과 같다. 배양초기의 탁도는 0.008였으나 배양시간이 증가함에 따라 탁도가 증가하여 16시간 후에는 0.100, 24시간 후에는 0.862까지 증가하였다. 그러나 48시간 후에는 더 이상 증가하지 않고 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 배양 시간에 따른 균수변화도 탁도 변화와 유사한 경향을 나타

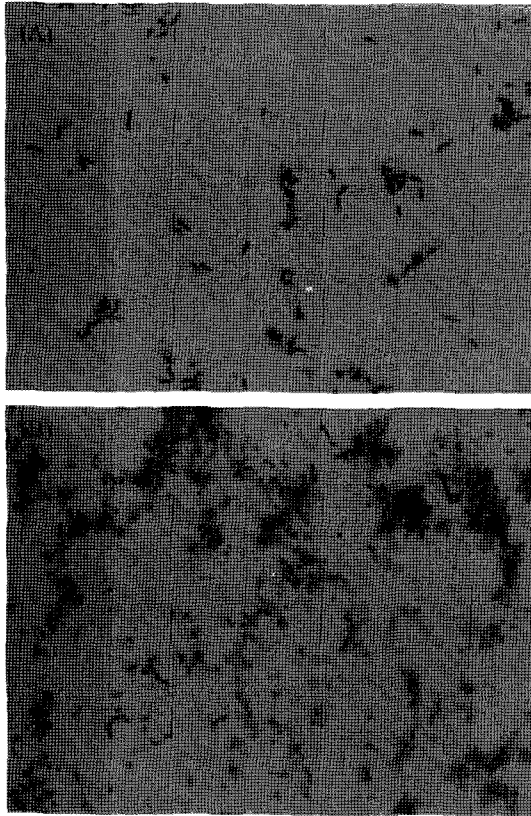


Fig. 6. Photomicrograph of *S. gallinarum* in sediment of BHI broth which included anti-*S. gallinarum* specific IgY. (A) IgY 0%, (B) IgY 0.3%.

났으며(Fig. 4), 16시간 후에는  $1.82 \times 10^7$  CFU/mL, 24시간 후에는  $1.75 \times 10^8$  CFU/mL까지 증가하였다. *S. gallinarum*의 성장에 따른 pH 변화곡선은 Fig. 7에서 보여지듯 처음은 7.29였으나 16시간 후에는 7.17, 24시간 후에는 5.32로 저하되었다. *S. gallinarum* 배양시간에 따른 pH와 탁도는 전체적으로 상반된 곡선을 나타내었으며, 균수는 탁도와 유사한 양상을 나타나는 것으로 나타났다.

조난항 IgY와 *S. gallinarum* 응집

면역화 여부에 따른 anti-*S. gallinarum* IgY의 효과를 현미경으로 관찰하였다. Anti-*S. gallinarum* IgY 첨가하지 않은 대조구에서는 상등액과 침전물에서 균들이 응집(agglutination)되지 않고 독립된 형태로 존재하는 것을 관찰하였다(Fig. 6). 면역화 처리하지 않은 공시 닭에서 생산된 계란으로부터 추출한 일반 IgY 0.3% 첨가구에서도 대조구와 유사한 결과가 나타났다. 그러나 anti-*S. gallinarum* IgY 0.3%를 첨가한 처리구에서는 상등액과 침전물에서 균들이 대부분 응집되는 것을 현미경을 통하여 관찰되었다. 난황의 항체가 항원과 응집하는 결과는 다른 연구에서도 보고되었으며, 예를 들어 Takashi 등(26)은 난황에서 분리된 anti-*E. coli* IgY의 응집성을 *in vitro*로 시험한 결과 균체들이 agglutination되었다고 보고하였으며, Baek 등(27)의 논문에서도 항원에 의해 면역되지 않은 계란 항체는 응집을 일으키지 않으나 *S. typhimurium* 특이 항체는 응집기를 나타낸 것으로 보고되었다. 이 연구에서도 *S. gallinarum*를 면역시키지 않고 생산된 일반 IgY를 첨가한 처리구에 비해 *S. gallinarum* 면역시킨 후 IgY를 첨가한 처리구들이 *S. gallinarum* 균에 확실하게 응집되는 효과를 나타냈으며 이러한 응집에 의해 세균들의 성장이 방해 받는 것으로 사료 된다.

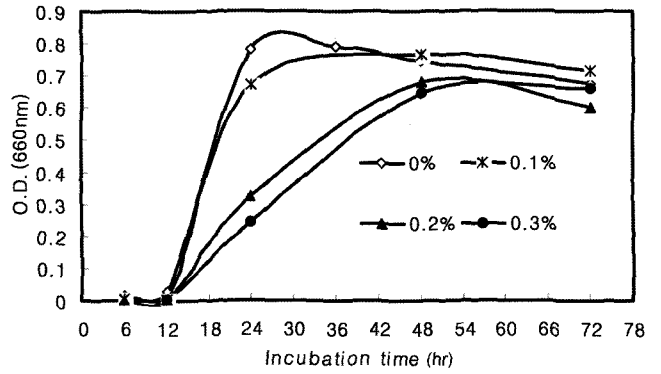


Fig. 7. Turbidity of *S. gallinarum* with IgY addition. *S. gallinarum* was inoculated by  $10^8$  CFU/mL in tryptic soy broth with anti-*S. gallinarum*.

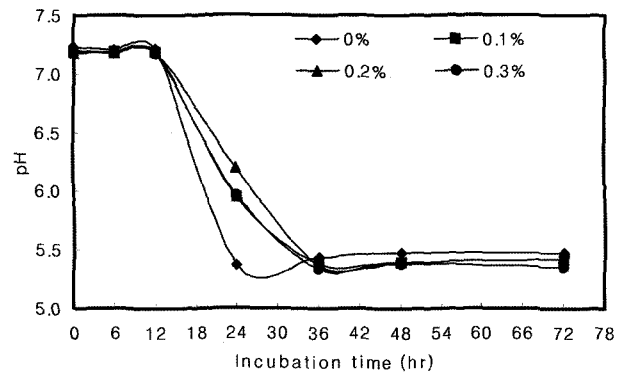


Fig. 8. pH change of *S. gallinarum* with IgY addition.

Anti-*S. gallinarum* IgY의 농도별에 대한 항균력

면역화된 조난항 specific IgY가 *S. gallinarum* 균에 대해 응집의 효과가 있었다는 것을 확인하였으므로 항균력 시험의 최소농도 결과를 알아보기 위하여 IgY의 농도를 대조구(0%), 0.1%, 0.2%, 0.3%로 구분하여 그 효과 시험을 실시하였다.

*S. gallinarum*의 성장을 배양액의 탁도를 관찰한 결과(Fig. 7) 12시간까지는 모든 처리구의 OD 값이 0.01-0.02 정도로 탁도 변화가 없었으나 24시간 후에는 대조군의 경우 OD값이 0.77로 나타났다. *S. gallinarum* IgY 0.3% 첨가구에서는 0.25로 탁도가 매우 낮아진 것으로 관찰되었는데 이로써 IgY 첨가에 의해 균의 성장이 억제 되는 것을 확인할 수 있었다. 한편 48시간 후에는 대조구에서는 OD 값이 0.74로 나타났고 *S. gallinarum* IgY 0.3% 첨가구에서는 0.64로 탁도의 차이가 적은 것으로 나타났다. 이는 anti-*S. gallinarum* IgY가 *S. gallinarum*을 사균 또는 멸균하는 것이 아니라 응집만을 이루어 성장을 억제하고 있기 때문인 것으로 사료된다. 농도별 IgY에 의한 *S. gallinarum* 균의 성장 억제는 IgY 첨가량에 비례하는 것으로 나타났는데 IgY 0.1% 첨가구는 대조구와 비슷한 경향이었고 IgY 0.2% 첨가구는 IgY 0.3% 첨가구와 비슷한 경향으로 *S. gallinarum*의 성장이 현저히 둔화된 것을 볼 수 있었다. Anti-*S. gallinarum* IgY 0.2%와 0.3% 첨가구는 대조구보다 OD 값이 약 3배 정도 차이가 나타났다.

*S. gallinarum*의 성장을 배양액의 탁도로 관찰한 결과(Fig. 8) pH 변화는 배양 초기에는 7.1-7.3의 범위에 있었으나 미생물이 성장을 하면서 생긴 대사산물에 의해 배양시간이 경과함에 따라 pH가 하락하였다. 24시간 때를 비교하면 IgY 무첨가 처리구(pH 5.4)에 비해 IgY 첨가 처리구의 pH는 6.0 정도로 나타나 IgY 첨

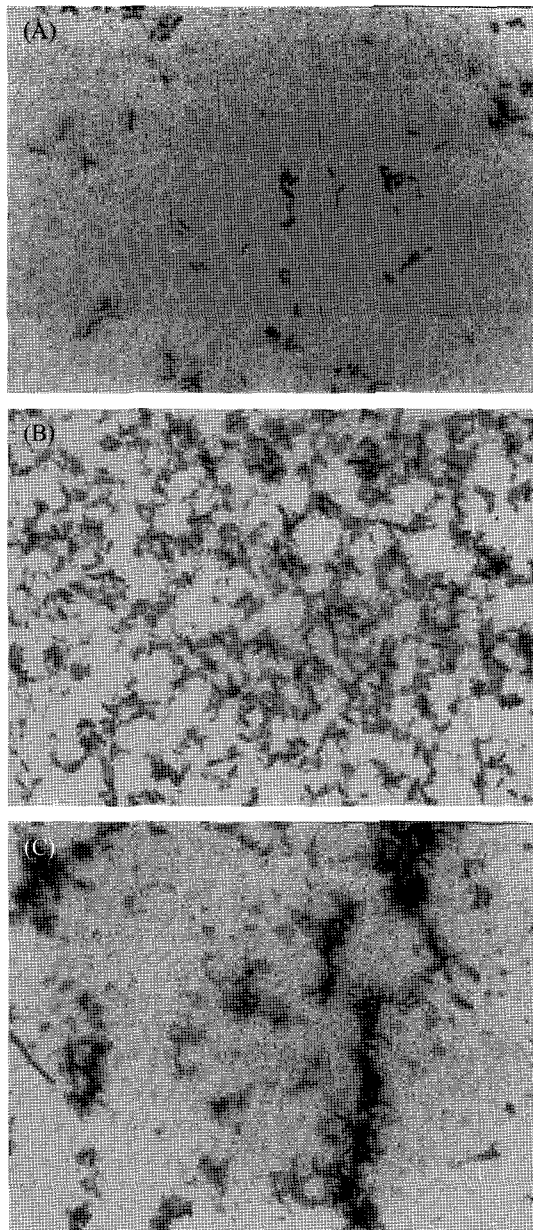


Fig. 9. Photomicrograph of *S. gallinarum* in BHI broth which included anti-*S. gallinarum* specific IgY. (A) *S. gallinarum* by  $10^2$ , (B) *S. gallinarum* by  $10^5$ , (C) *S. gallinarum* by  $10^7$ .

가가 *S. gallinarum* 균의 성장을 억제하는 것으로 보였다. 그러나 성장 개시 후 36시간 이후에는 anti-*S. gallinarum* IgY의 항균력은 거의 없는 것으로 나타났다. 이는 다른 항균물질과는 달리 응집을 통해 균의 활동을 억제하므로 일정시간이 지난 후에는 IgY가 대사산물의 생산에 별다른 영향을 미치지 못하기 때문으로 사료된다(25).

배양 24시간 후에 현미경으로 침전물의 형태적 관찰을 하였을 때 대조구와 IgY 농도 0.1%에서는 균체가 응집되지 않고 각각의 독립적인 형태를 유지하고 있었다. 그러나 IgY 0.2%와 0.3% 첨가구에서는 전반적으로 응집 현상이 나타났다. 이런 응집반응은 세균, 적혈구와 같은 일정한 크기를 가진 항원입자가 그 항체와 반응하여 응집괴를 만드는 형상으로 세균세포에서는 응집원으로 될 수 있는 물질은 단일한 것이 아니고 여러 가지 항원의 집합체로

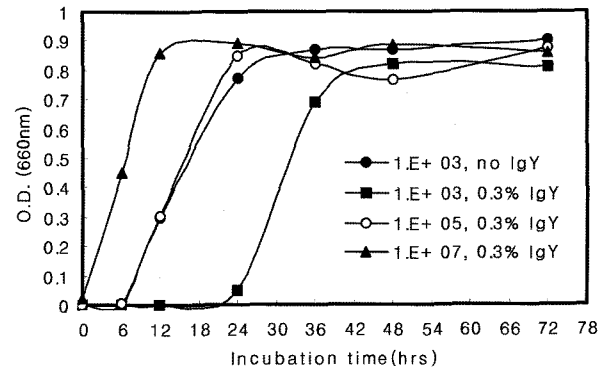


Fig. 10. Changes on turbidity of *S. gallinarum* with IgY addition.

구성되어 있으며 각 항원은 서로 질적 차이가 있기 때문에 항체도 각각 별개의 반응을 나타낸다. 또한 IgY 농도가 증가할수록 응집된 균의 크기가 더 커져가는 현상을 나타내었으며 이런 응집 반응은 첨가되는 IgY의 농도에 의해 영향을 받는 것으로 나타났다.

Arasteh 등(20)은 anti-*Vibrio anguillarum* IgY를 산란계로부터 생산하고 이 IgY의 효능을 알아보기 위하여 복강 주사, 경구 투여, 사료 투여 방법을 이용하였다. IgY를 복강 주사하는 경우는 항체 효과가 14일 동안 유지되었으며 경구 투여와 사료 투여에 있어서도 그 효과가 드러났다. 이때 사용된 IgY의 농도는 100-200 mg/kg/day 정도였다. Kobayashi 등(17)은 크립토스포리디움증(*Cryptosporidium parvum*)에 감염에 대한 IgY 효과를 실험하였는데 *in vitro* 시험에서 *C. parvum* specific IgY를 사용하면 세포내에서 균이 응집되는 것을 발견할 수 있었다. Anti-*C. parvum* IgY powder 25% 또는 20% anti-*C. parvum* IgY solution을 사료에 첨가하여 2주정도 급여하면, 크립토스포리디움증 감염에 의한 영향이 유의적인 차이를 나타냈다. 그러나 위의 두 연구에서는 사용된 IgY의 함량은 이번 연구에서 사용된 함량에 비해 매우 높은 것을 알 수 있었고 이번 연구에서 사용된 anti-*S. gallinarum* IgY는 낮은 농도에서도 균체와의 작용을 확인할 수 있었다. IgY의 실제 사용량은 antibody titer에 의해서도 상당히 다르게 나타나므로 항원이 다른, 위와 같은 실험 결과와의 직접적인 비교는 실제로 어려울 수도 있다.

균수별 항균력 시험

Anti-*S. gallinarum* IgY가 0.3% 첨가된 TSB에 *S. gallinarum*를  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  CFU/mL 으로 희석하여 접종하고 *S. gallinarum*  $10^3$  CFU/mL는 대조구로 사용하였다. 배양 24시간 후에 처리구간 침전물을 현미경으로 형태적 관찰을 하였을 때 IgY 첨가하지 않은 대조구 처리구의 침전물은 모든 균들이 독립된 형태로 존재하였고 응집이 되지 않았다. 그러나 anti-*S. gallinarum* specific IgY 0.3%가 첨가된  $10^5$ ,  $10^7$  CFU/mL *S. gallinarum*으로 접종시킨 처리구에서는 균들이 IgY에 의해 붙잡혀서 응집되어있는 것을 관찰할 수 있었다.  $10^5$  CFU/mL으로 접종시킨 처리구보다  $10^7$  CFU/mL으로 접종시킨 처리구에서는 균체들이 더욱 크게 응집이 되는 것을 볼 수 있었다. 이는 Kim 등(15)의 논문과 비슷한 결과를 나타냈는데 최초 접종 균주의 농도가 높을수록 균괴의 크기가 커짐을 관찰할 수 있었다.

접종 균주의 농도에 따른 TSB의 탁도를 살펴보면(Fig. 10) 6시간까지  $10^7$  CFU/mL으로 접종시킨 처리구를 제외한 모든 처리구에서는 탁도의 변화가 관찰되지 않았다. IgY 0.3%를 첨가하지 않고  $10^3$  CFU/mL로 접종시킨 처리구와  $10^5$  CFU/mL에 IgY를 첨

가한 처리구를 비교한 결과 IgY를 첨가하지 않은 처리군은 12시간부터 탁도가 증가하여 *S. gallinarum*균의 성장이 관찰되었으나 IgY 첨가구에서는 24시간이 경과 되어도 탁도의 변화가 나타나지 않아 IgY 첨가에 의한 *S. gallinarum* 성장 억제력을 확인 시켜주었다. IgY를 첨가하지 않은 대조군  $10^5$  CFU/mL에 IgY 0.3%를 첨가한 처리구와 비슷한 양상의 성장 곡선을 보여주었다. 즉 IgY 0.3%는 *S. gallinarum*의 성장을  $10^2$  정도 억제 한 것으로 나타났다.

## 요 약

*Salmonella gallinarum*로 면역화된 산란계로부터 생산된 계란 난황 중에 들어 있는 anti-*S. gallinarum* specific IgY를 분리하여 IgY의 효능을 살펴보았다. 또한 면역화 여부, specific IgY 농도 별 및 균수별에 따른 항균력을 현미경적 관찰 및 탁도 측정, pH 변화로 검토하였다. 전체 IgY 중 anti-*S. gallinarum* IgY의 특이 항체의 비율은 23%로 나타났다. 또한 anti-*S. gallinarum* IgY와 *Salmonella* 유사 균주의 항원에 대한 IgY의 선택성을 조사한 결과 생산된 IgY는 *S. gallinarum*에만 선택성을 갖는 것으로 나타났다. *S. gallinarum* 배양액에 anti-*S. gallinarum* specific IgY 0.3%를 첨가한 처리구는 상등액과 침전물에서 *S. gallinarum*가 응집되는 현상을 보였다. 그러나 면역을 하지 않은 닭에서 생산된 계란으로부터 추출한 IgY와 대조구에서는 응집 반응이 일어나지 않았다. Anti-*S. gallinarum* IgY를 첨가한 처리구가 대조구보다 *S. gallinarum*균들이 응집되는 정도에 있어서 확실한 효과를 나타내었다. 현미경 관찰시 균체들의 응집현상은 IgY 0.2% 이상 첨가시에 나타났으며, pH와 탁도에 있어서는 IgY 0.1% 이상 첨가구에서 *S. gallinarum* 성장 억제에 탁월한 효과를 볼 수 있었다.  $10^5$  CFU/mL에 Anti-*S. gallinarum* IgY 0.3%를 첨가한 처리구는  $10^3$  CFU/mL와 거의 동일한 탁도를 나타내어 IgY에 의한 성장 억제를 확인할 수 있었다. 현미경적 관찰에서 IgY 첨가량이 증가할수록 더 큰 균괴를 형성하는 것을 볼 수 있었다. 위의 결과들을 통해 *S. gallinarum*로 면역화된 닭으로부터 생산된 계란에서 추출된 IgY를 사용하면 가금티푸스를 예방하는데 이용될 수 있을 가능성을 보여주었다.

## 문 헌

- Rho JH, Kim YB, Han CK, Sung KS, Chi CH. Development of IgY against *Salmonella gallinarum* using layers. Korea Food Res. Inst., Seongnam, Korea. pp. 21-52 (2002)
- Patterson R, Younger JS, Weigle WO, Dixon FJ. The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen. J. Gen. Physiol. 45: 501-513 (1962)
- Bartz CR, Conkin RH, Tunstall CB, Steele JH. Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. J. Infect. Dis. 142: 439-441 (1980)
- Ebina T, Satto A, Umeju K, Ohyama S, Oizumi A, Aikawa A, Katagiri S, Katagiri S, Suzuki H, Konno T. Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing anti-human rotavirus anti body. Med. Microbiol. Immun. 174: 177-185 (1989)
- Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. Biosci. Biotech. Bioch. 57: 1077-1081 (1993)
- Lee NH, Rho JH, Han CK, Sung KS. Effect of various hen feed supplements on IgY level in eggs and laying rates. Korean J. Anim. Sci. 41: 155-166 (1999)
- Larsson A, Balow RM, Linda TL, Forsberg PO. Chicken antibodies; taking advantage of evolution-A review. Poultry Sci. 72: 1807-1812 (1995)
- Lee K, Ametani A, Shimizu M, Hatta H, Yamamoto T, Kim-nogawa S. Production and characterization of anti-human insulin antibodies in the hen's egg. Agr. Biol. Chem. Tokyo 55: 2141-2143. (1991)
- Shimizu M, Fitzsimmons R, Nakai S. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk immunized chickens as a potential food ingredient. J. Food Sci. 53: 1360-1366 (1998)
- Rho JH, Kim MH, Kim YB, Sung KS, Lee NH. Formation and processing properties of anti-*Salmonella gallinarum* specific IgY from yolk. Korean J. Anim. Sci. 47: 637-646 (2005)
- Yolken RH, Leister F, Wee S, Miskuff B, Vonderfecht S. Antibodies to rotavirus in chickens' eggs: A potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption. Pediatrics 81: 291-295 (1988)
- Hamada S, Horikoshi T, Minami T, Kawabata S, Hiraoka J, Fujiwara T, Ooshima T. Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 59: 4161-4167 (1991)
- Jung SH, Kim HJ, Lyoo YS, Rho JH, Lee NH. Effect of anti-*Helicobacter pylori* IgY power to protect mice from *Helicobacter pylori*. Korea J. Food Sci. Technol. 38: 93-98 (2006)
- Gutierrez MA, Miyazaki T, Hatai H, Kim M. Protective properties of egg yolk IgY containing anti-*Edwardsiella tarda* antibody against paracolic disease in the Japanese eel, *Anguilla japonica temminck & schlegel*. J. Fish Dis. 16: 113-120 (1993)
- Kim YB, Rho JH, Han CK, Sung KS, Son DH, Kim YD, Lee SH, Ha KJ. Development of specific IgY order to replace antibiotics in prevention and treatment of flounder's disease. Korea Food Res. Inst., Seongnam, Korea. pp. 66-104 (2001)
- Arasteh N, Aminirissehe AH, Yousif AN, Albright LJ, Durance TD. Passive immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with chicken egg yolk immunoglobulins (IgY). Aquaculture 231: 23-36 (2004)
- Kobayashi C, Yokoyama H, Nguyen SV, Kodama Y, Kimata T, Izeki M. Effect of egg yolk antibody on experimental *Cryptosporidium parvum* infection in scid mice. Vaccine 23: 232-235 (2004)
- Nilsson E, Amini A, Wretling B, Larsson A. *Pseudomonas aeruginosa* infections are prevented in cystic fibrosis patients by avian antibodies binding *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. J. Chromatog. B. (2007)
- Fu CY, Huang H, Wang XM, Liu YG, Wang ZG, Cui SJ, Gao HL, Li Z, Li JP, Kong XG. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. J. Virol. Methods 133: 112-115(2006)
- Amaral JA, Franco MT, Carneiro-sampaio MMS, Carbonare SB. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunised Leghorn chickens. Re. Vet. Sci. 72: 229-234(2007)
- Lee SC. The feed for chicken used hardwood charcoals and herbs. Korea Patent 10-2004-0064557 (2004)
- Rho JH, Kim, YB, Han CK, Lee NH, Sung KS, Shon DH. The effect of age of hens and vaccination on anti-*Streptococcus mutans* IgY level. Korean J. Sci. 41: 563-574 (1999)
- Hatta H, Kim M, Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody "IgY". Agr. Biol. Chem. Tokyo 54: 2531-2535 (1990)
- Shon DH, Rho JH, Kim YB, Han CK, Sung KS, Lee NH. Properties of anti-*S. mutans* IgY separated from egg yolk. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 1029-1034 (1998)
- Kim YB, Rho JH, Shon DH, Kim JH, Sung KS, Lee NH. Antimicrobial activity of specific IgY against *Streptococcus mutans*. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 1319-1325 (2000)
- Takashi T, Kenji T, Kouji S, Shigeo F. Separation of anti-*E. coli* IgY, water soluble proteins from egg yolk and its specificity against *E. coli*. Nippon Shokuhin Kag. Kasishi 42: 2259-229 (1995)
- Baek BS, Han JP, Bae MJ. Properties and antimicrobial activity of egg yolk antibody against food poisoning bacteria. J. East Asian Soc. Dietary Life 9: 207-213 (1999)