

## 난황 항체의 안정성에 관한 연구

이 경 애

순천향대학교 자연과학대학 식품영양학과

### Studies on the Stability of Hen's Egg Yolk Immunoglobulins

Lee, Kyong Ae

Dept. of food science and nutrition, College of natural science,  
Soonchunhyang university, Asan, 336-745, Korea.

#### Abstract

Immunoglobulins (IgY) were isolated from egg yolk of hens immunized with bovine serum albumin(BSA). The stability of anti-BSA IgY against heat and pH was investigated. Antibody activity was measured by enzyme linked immunosorbent assay. IgY was relatively heat-stable and most of the antibody activity remained after heating up 65°C for 30 minutes. IgY was stable at pH 5-11. However, inactivation of IgY was observed below pH 4, or above pH 12. Inactivation of IgY proceeded rapidly at low pHs(pH 2-3). Most of the antigen binding activity was lost at low pHs probably because of some conformational changes.

Key words: hen, yolk immunoglobulins, stability, pH, heat

#### I. 서 론

Mouse, guinea pig, rabbit과 같은 포유 동물의 면역계를 이용한 특이 항체의 유도는 대량 조제가 어려우며, 항혈청에서 분리된 항체를 식품 소재로 사용하기에는 비위생적이다. 최근 닭의 면역 기구를 이용하여 식품인 계란에서 특이 항체를 보다 위생적이고 간편하게 대량 조제하는 방법이 보고<sup>1,2)</sup>되어 그의 이용이 기대되고 있다.

닭의 혈액 중에는 IgG, IgM 및 IgA와 같은 세 종류의 면역글로블린이 존재한다. 이 중 IgG만이 특정한 수식 없이 배란 전에 receptor를 통해 선택적으로 난황에 이행된다<sup>4,7)</sup>. 난황은 여러 면역글로블린 중 IgG만이 약 1% 함유되어 있는 균일한 계로서 항체의 우수한 공급원이다<sup>8)</sup>.

닭의 면역 기구는 포유 동물의 면역 기구와 동일한 것으로 알려져 있으나 닭의 IgG는 분자량, 등전점, 포유류의 complement 활성화 능력, 면역 글로블린의 다양화 기구 등 포유류 IgG와 다른 특성을 갖는다<sup>9,13)</sup>. 그러므로 Leslie 등<sup>14)</sup>은 난황 중의 항체란 의미로 닭의 IgG를 IgY(yolk immunoglobulin)로 명명하고 있다.

최근 난황 항체가 감염 방에 효과적이었다는 보고에 따라 질병 예방을 목적으로하는 기능성 식품 소재

로의 이용이 기대되고 있다. Yolken 등<sup>15)</sup>과 Ebina 등<sup>16)</sup>은 human rotavirus에 대한 난황 항체를 mouse에 경구 투여한 결과 rotavirus성 설사의 예방이 가능했다고 보고하였다. Otake 등<sup>17)</sup>과 Hamada 등<sup>18)</sup>에 의하면 충치 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대한 난황 항체가 mouse 및 rat의 충치 예방에 효과적이었다고 한다.

난황 항체를 기능성 식품 소재로 이용하기 위해 가장 중요한 것은 구조 안정성이다. 항원 결합력의 저하를 최소화할 수 있는 안정한 조건에서의 분리, 정제 및 이용되어야 한다. 그러므로 본 연구는 난황 항체의 이용효율을 높이기 위해 난황 항체의 열 및 pH에 대한 구조 안정성을 검토하였다.

#### II. 재료 및 방법

##### I. 난황 항체의 조제

닭(Isabrown, 50-week-old, female)에 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 adjuvant와 함께 2주 간격으로 4회 면역하였다. 초기 면역은 0.2% BSA 용액(in phosphate buffered saline, PBS) 0.5 ml를 동량의 complete Freund's adjuvant(Difco)와 혼합하여 emulsion을 조제한 후 근육 주사하였다. 추가 면역은 incomplete Freund's adjuvant(Difco)와 함께 emulsion을 조제하여

실시하였다. 4회 면역 후에 산란된 면역 계란에서 난황을 분리하여 Polson 등의 방법<sup>19)</sup>에 따라 polyethylene glycol 6000(PEG 6000)을 사용하여 crude anti-BSA IgG를 분리하였다. 분리된 항체의 양은 280 nm에서 흡광도를 측정 한 후,  $A_{280\text{nm}}^{1\%} = 13.8$ 에 의해 산출하였다.

**2. Biotinylated IgY의 조제**

2% IgY 용액(in 50 mM bicarbonate buffer, pH 8.5) 500  $\mu$ l에 biotin(Pierce) 200  $\mu$ g을 첨가하여 용해시켰다. 실온에서 30분간 conjugation시킨후, 반응액을 0.1 M phosphate buffer(PB, pH 7.0)에 대하여 dialysis하여 과량의 biotin을 제거하였다.

**3. 열 처리**

0.1% IgY 용액(in saline)을 30-100°C에서 30초-30분간 반응시켜 noncompetitive enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 실시하였다.

**4. pH 처리**

1% IgY 용액(in saline)의 pH를 HCl 또는 NaOH를 사용하여 pH 2-13으로 조절하였다. 25°C에서 30초-4시간 반응시킨 후 PBS를 첨가 중화하여 noncompetitive ELISA를 실시하였다.

**5. 난황 항체의 변성**

0.08% IgY 용액(in saline)에 염산구아니딘을 8 M이 되도록 첨가하여 25°C에서 4시간 반응시켰다.

**6. Noncompetitive ELISA<sup>20)</sup>**

열 및 산처리한 IgY의 항체가 변화를 non-competitive ELISA 의해 측정하였다. Microtiter plate(Nunc)에 0.01% BSA용액(in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6)을 100  $\mu$ l/well 첨가하여 2시간 동안 coating하였다. 0.02% tween을 함유한 PBS(PBS-T)로 well을 씻은 후, PBS-T로 적당히 희석한 IgY 용액을 100  $\mu$ l/well 첨가하여 2시간 반응시켰다. Well을 씻은 후, alkaline phosphatase rabbit anti-chicken IgG(H+L) conjugate(Sigma)를 100  $\mu$ l/well 첨가하여 2시간 동안 반응시켰다. 다시 well을 씻은 후 0.1% sodium p-nitrophenyl phosphate(in diethanolamine HCl buffer, pH 9.8)를 100  $\mu$ l/well 첨가하여 30분간 반응시키고, 5 N NaOH를 가하여 반응을 정지시켰다. Microtiter plate reader(Bio-Rad)를 이용하여 405 nm에서 흡광도(ELISA value)를 측정하였다. 모든 반응은 실온에서

실시하였다.

**7. Competitive ELISA<sup>21)</sup>**

항원 결합력의 변화는 competitive ELISA에 의해 검토하였으며, 모든 반응은 실온에서 실시하였다. 0.01% BSA 용액을 100  $\mu$ l/well 첨가하여 coating하였다. PBS-T로 희석한 산 처리 IgY 용액과 biotinylated IgY 용액을 미리 1:1로 혼합하여 well당 100  $\mu$ l씩 가한 후 2시간 competition시켰다. Alkaline phosphatase extra-avidin conjugate(Sigma)를 100  $\mu$ l/well 첨가하여 2시간 반응시켰다. 이후의 반응은 noncompetitive ELISA와 같이 기질을 반응시키고 흡광도(ELISA value)를 측정하였다.

**8. Circular dichroism(CD)의 측정**

산 처리한 IgY 및 염산구아니딘으로 변성시킨 IgY의 CD spectrum은 spectropolarimeter(일본분광, J-20)를 사용하여 측정하였다. Scale은 0.05 deg/cm로서 1 mm cell을 사용하였다.

**9. SDS-polyacryamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)**

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법<sup>22)</sup>에 따라 10% acrylamide gel을 사용하여 실시하였다. 전기영동 후, 0.01% (w/v) Coomassie brilliant blue R 250으로 염색한 후, 10%(v/v) 초산 용액으로 탈색하였다.

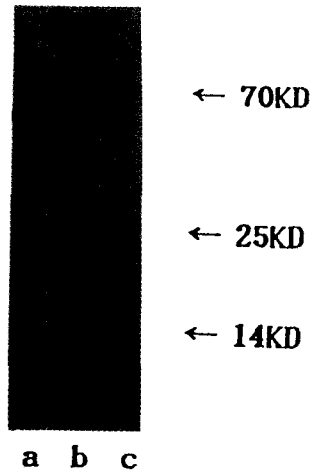
**III. 결과 및 고찰**

**I. 난황 항체의 분리**

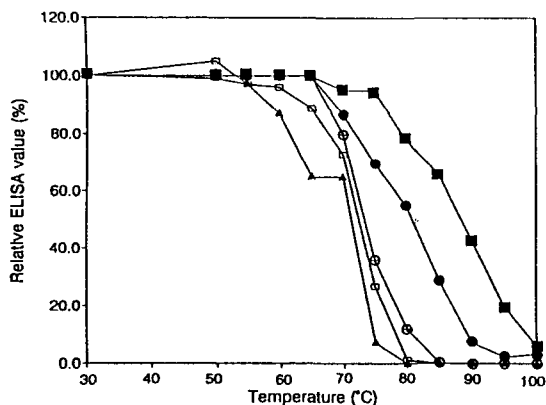
IgY는 4회 면역 후의 계란을 이용하여 PEG 6000을 사용하여 분리하였다. 분리된 IgY는 ELISA에 의해 0.1-10  $\mu$ g IgY/ml의 농도에서 검출 가능했다. Crude anti-BSA IgY의 SDS-PAGE 결과 두개의 밴드가 나타났다(Fig. 1). 위의 밴드는 분자량 65 KDa 정도의 heavy chain으로 bovine IgG보다 컸다. 아래 밴드는 분자량 23 KDa 정도의 light chain으로 bovine IgG보다 작았다.

**2. 열 안정성**

30-100°C에서 반응시킨 IgY의 항체가 변화를 noncompetitive ELISA에 의해 검토하였다(Fig. 2). 항체는 30-55°C에서 30분 가열 후에도 거의 변화되지 않았다. 그러나 항체는 이보다 높은 온도에서는 감소되었으며, 가열 온도가 높을수록 단시간내에 크게 감소되었다. 30초간 가열 후의 상대적 항체는 70-75°C에서는 95%이었으나 100°C에서는 거의 활성을



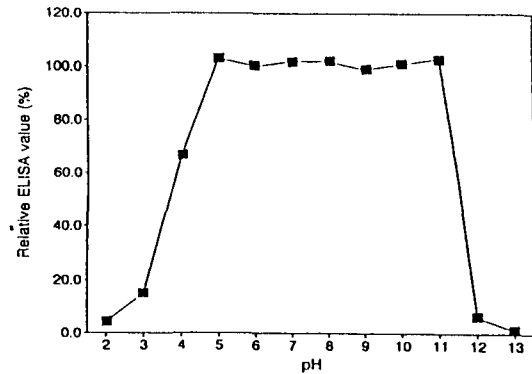
**Fig. 1. SDS-PAGE patterns of IgY.**  
Bovine whey protein was used as molecular weight (M.W.) marker. (a) IgY; (b) bovine IgG; (c) M.W. marker.



**Fig. 2. Changes in the antibody activity of IgY after heating.**

An IgY solution was heated at 30-100°C for 30 sec (■), 1 min (●), 5 min (○), 15 min (□), or 30 min (▲). Antibody activity was measured by noncompetitive ELISA. Relative ELISA value(%)=(absorbance of heat-treated IgY) × 100/(absorbance of native IgY).

나타내지 않았다. 1분간 가열 후의 상대적 항체가는 70°C에서 87%, 75°C에서 70%이었으나, 90°C에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 5분간 가열 후의 상대적 항체가는 70°C에서 80%이었으나 75°C에서 급격히 감소되어 85°C에서는 거의 활성을 보이지 않았다. 15분 가열간 후의 상대적 항체가는 60°C에서 96%, 65°C에서 89% 이었으나, 75°C에서 급격히 감소되어 80°C에서는 활성을 나타내지 않았다. 30분 가열 후의



**Fig. 3. Changes in the antibody activity of IgY after incubating at acidic, or alkaline conditions.**

Incubation was performed at 25°C for 4 hr. Antibody activity was measured by noncompetitive ELISA. Relative ELISA value(%)=(absorbance of acid, or alkaline-treated IgY) × 100/(absorbance of native IgY).

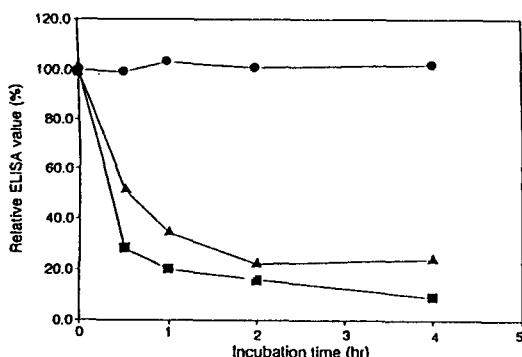
상대적 항체가는 60°C에서 87%, 65°C에서 65%이었으나, 70°C에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 그러나 IgY는 100°C 이하의 저온살균 조건(HST, LTLT)에서는 항체가가 크게 감소되지 않아 저온살균에 대해서는 비교적 안정한 항체로 생각된다. Evans 등<sup>23)</sup>에 의하면 인유중의 IgG를 62.5°C 및 65°C에서 30분 가열 후 IgG의 활성이 각각 34%, 77.2% 정도 저하되었다. 한편 Larson 등<sup>24)</sup>은 skim milk를 70°C에서 30분 가열 후 bovine IgG의 89%가 변성되었다고 하였다. 측정 방법이 다르므로 상대적으로 비교하기는 어려우나 최소한 IgY는 포유류 IgG와 거의 비슷한 열 안정성을 나타내는 것으로 사려된다.

### 3. pH 안정성

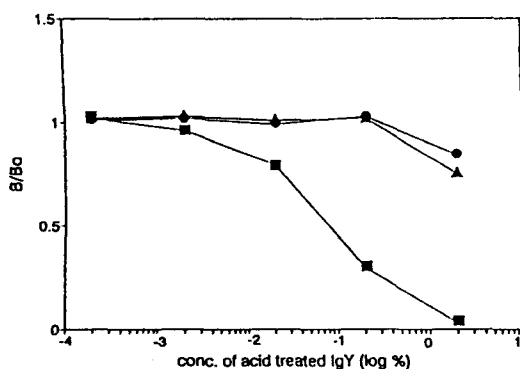
IgY를 pH 2-13에서 4시간 반응시킨 후, 항체가의 변화를 noncompetitive ELISA에 의해 검토하였다(Fig. 3). IgY는 pH 5-11에서 안정하였으나, pH 4 이하 및 pH 12 이상에서는 항체가가 감소되었다. pH 2 및 pH 12-13에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 특히 강산(pH 2-3)에서의 불안정성은 기능성 식품 소재로서의 이용면에 큰 영향을 줄 것으로 사려되어 강산에서의 안정성에 대하여 검토하였다.

### 4. 강산에서의 안정성

pH 2-3에서 30분-4시간 반응시킨 IgY의 항체가의 변화를 noncompetitive ELISA에 의해 검토하였다(Fig. 4). pH 2-3에서 IgY의 항체가는 단시간내에 크게 감소되었다. pH 3에서의 상대적 항체가는 30분 후에 50%,



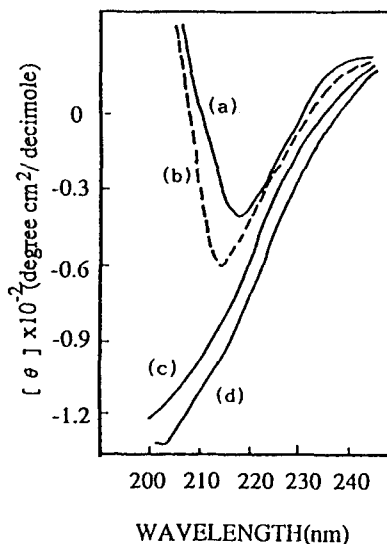
**Fig. 4. Changes in the antibody activity of IgY after incubating at acidic conditions.** Incubation was carried out at pH 7(●), 3(▲), or 2(■) for 0-4 hr at 25°C. Antibody activity was measured by noncompetitive ELISA. Relative ELISA value(%)=(absorbance of acid-treated IgY)×100/(absorbance of native IgY).



**Fig. 5. Antigen binding activity of IgY after incubating at acidic conditions.** An IgY solution was incubated at pH7(■), 3(▲), or 2(●) for 4 hr at 25°C. Antigen binding activity was measured by competitive ELISA. B/B<sub>0</sub>=(absorbance in the presence of various concentrations of acid-treated IgY)/(absorbance in the absence of IgY).

4시간 후에 20%이었다. pH 2에서의 상대적 항체가는 30분후에 20%이었고, 4시간후에는 2%정도이었다. 특히 affinity chromatography에 의해 흡착된 특이 항체를 pH 2의 buffer로 용출시킬때, 용출액을 즉시 중화시켜도 항체가가 상당히 저하되어(data not shown), pH 2에서는 상당히 불안정한 것으로 사려된다.

한편 noncompetitive ELISA에 사용되는 conjugate는 IgY의 항원 결합부위인 Fab뿐 아니라 그 이외의 다른 부분도 인식하므로 competitive ELISA에 의해 Fab의 항원 결합력의 변화를 검토하였다(Fig. 5). 그 결과



**Fig. 6. Circular dichroism spectra of IgY after incubating at acidic conditions for 4 hr.** (a) native IgY; (b) pH3; (c) pH2; (d) denatured IgY (guanidine-HCl denaturation).

pH 2 및 pH 3에서 4시간 반응시킨 IgY의 항원 결합력은 거의 손실되었음을 알 수 있었다.

pH 2 및 pH 3에서 4시간 반응시킨 IgY의 구조변화를 CD spectrum을 측정하여 검토하였다(Fig. 6). Native IgY 및 중성 pH에서 4시간 반응시킨 IgY는 218 nm에서 negative maximum을 나타냈다. β-sheet는 216-218 nm에서 negative maximum을 나타내므로 IgY는 β-sheet가 풍부한 2차구조를 갖는 것으로 생각된다. 포유류 IgG도 hinge를 제외한 모든 부분은 전형적인 β-sheet구조를 나타낸다. Caser 등<sup>25)</sup>은 진화상으로 닭과 비교적 가까운 tortoise IgG도 β-sheet가 풍부한 2차구조를 나타내며, human IgG나 rabbit IgG에 비해 다량의 β-sheet 구조를 갖는다고 하였다. 한편 pH 3에서 반응시킨 IgY의 negative maximum은 214 nm이었다. pH 2에서 반응시킨 IgY는 염산구아니딘으로 변성시킨 IgY와 비슷한 CD spectrum을 나타내었다. 염산구아니딘은 항체의 구조유지에 관계하는 비공유결합을 파괴하여 random coil을 형성하므로 pH 2에서 반응시킨 IgY도 이와 같은 구조 변화를 일으킨 것으로 생각된다. Palmer 등은<sup>26)</sup> rabbit IgG의 산처리에 의해 비공유결합이 파괴되었다고 하였다. Dressman 등<sup>27)</sup>은 항체의 아미노산 조성을 검토한 결과 IgY는 포유류 IgG에 비해 Ser, Ala, Gly이 많고 Glu, Tyr은 적으므로 Glu, Tyr에 의해 형성되는 비공유결합력이 약하다고 하였다. 이와 같이 강산에서 IgY의 불안정성은

비공유결합의 파괴에 의한 2차구조의 변화와 관계한다고 생각된다. 그러므로 앞으로 IgY의 실용화를 위해 강산에서의 구조 변화 및 그 안정화에 대한 자세한 검토가 필요하다고 생각된다.

#### IV. 결론 및 요약

Bovine serum albumin(BSA)의 면역에 의해 난황에 유도된 항체(anti-BSA IgY)를 이용하여 열 및 pH에 대한 안정성을 검토하였다. Native IgY와 열 및 pH 처리한 IgY의 항원 결합력은 효소면역측정법(ELISA)에 의해 측정하였고, 구조변화는 circular dichroism(CD)에 의해 검토하였다.

IgY는 100°C 이하의 저온살균 조건에서는 비교적 안정한 항체로 생각된다. 즉, 70-75°C에서 30초간 가열 후 상대적 항체가는 95% 정도이었고, 60°C 및 65°C에서 30분 가열 후 상대적 항체가는 각각 87%, 65% 정도이었다.

IgY의 pH에 대한 안정성을 검토한 결과 pH 5-11에서는 비교적 안정하였다. 그러나 pH 4 이하 및 pH 12 이상에서는 항체가가 저하되었다. 특히 강산(pH 2-3)에서는 단시간내에 항체가가 크게 저하되었으며, 강산에서 4시간 반응시킨후 항원결합력은 대부분 소실되어 강산에서는 상당히 불안정하였다.

Native IgY 및 강산에서 반응시킨 IgY의 CD spectrum에 의하면 native IgY는  $\beta$ -sheet가 풍부한 구조를 나타냈으며, pH 2에서 반응시킨 항체는 random coil을 나타내었다. 따라서 강산에서 IgY의 불안정성은 2차구조의 변화와 관계하는 것으로 생각된다.

#### 감사의 글

본 연구는 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제(과제번호: 04.D150)에 의해 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비를 지원하여 준 학술진흥재단에 깊은 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Kramer, T.T., and Cho, H.C., Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's egg. *Immunology*, **19**: 157 (1970).
- Bade, H., and Stegemann, H., Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk. *J. Immunol. Methods*, **72**: 421 (1984).
- Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., Von Maltzahn, E., and van der Merwe, K.J., Improvement in the isolation of the IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol. Invest*, **14**: 323 (1985).
- Rose, M.E., and Orlands, E., Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. *Dev. Com. Immunol.*, **5**: 15 (1981).
- Bar-Joseph, M., and Malkinson M., Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant viruses. *J. Virol. Methods*, **1**: 179 (1980).
- Rose, M.E., Orlands, E., and Buttress, N., Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.*, **4**: 521 (1974).
- Kuhlmann, R., Wiedemann, V., Schmidt, P., Wanke, R., Linckh, E., and Losch, U., Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. *J. Vet. Med. B*, **35**: 610 (1988).
- Lösch, U., Schraner, I., Wanke, R., and Jurgens, L., The chicken egg, an antibody source. *J. Vet. Med. B*, **33**: 609 (1986).
- Higgins, D.A., Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins. *Vet. Bull.*, **45**: 139 (1975).
- Benedict, A.A., Immunoglobulin characteristics: chicken, in inbred and genetically defined strains of laboratory animals. part 2, Biological handbooks III, 658 (1979).
- Parvari, R., Avivi, A., Lentner, F., Ziv, E., Tel-Or, S., Burstein, Y., and Schechter, I., Chicken immunoglobulin G-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinational diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J.*, **7**: 739 (1988).
- Reynaud, C.A., Dahan, A., Anquez, V., and Weill, J. C., Somatic hyperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell*, **59**: 171 (1989).
- Thompson, C.B., and Neiman, P.E., Somatic diversification of the chicken immunoglobulins light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. *Cell*, **48**: 369 (1987).
- Leslie, G.A., and Clem, L.W., Phylogeny of immunoglobulin structure and function: Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.*, **130**: 1337 (1969).
- Yolken, R.H., Leister, F., Wee, S-B., Miscuff, R., and Vonderfecht, S., Antibodies to rotaviruses in chicken's egg: A potential source of anti-viral immunoglobulins suitable for human consumption. *Pediatrics*, **81**: 291 (1988).
- Ebina, T., Tsukada, K., Umezu, K., Nose, M., Tsuda, K., Hatta, H., Kim, M., and Yamamoto, T., Gas-

- troenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin and treated with a protein-bound polysaccharide preparation, *Microbiol. Immunol.*, **34**: 617 (1990).
17. Otake, S., Nishihara, Y., Makimura, M., Hatta, H., Kim, M., and Yamamoto, T., Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg yolk antibodies. *Dent. Res.*, **70**: 162 (1991).
  18. Hamada, S., Horikosh, T., Minami, T., Kawabata, 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 *streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **59**: 4161 (1991).
  19. Polson, A., Von Wetchmar, B., and Fazakerly, G., Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.*, **9**: 475 (1980).
  20. Engvall, E., and Carlsson, H.E., Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. First international symposium on immunoenzymatic techniques INSERM symposium No.2., 135 (1976).
  21. Engvall, E., and Perlmann, P., Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled antiimmunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, **109**: 129 (1972).
  22. Weber, K., and Osborn, M., The reliability of molecular weight determined by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406 (1969).
  23. Evans, T.J., Ryley, H.C., Neale, L.M., Dodge, J.A., and Lewarne, V.M., Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk, *Arch. Dis. Child.*, **53**: 239 (1978).
  24. Larson, B.L., and Roller, G.D., Heat denaturation of the specific serum proteins in milk, *J. Dairy Sci.*, **50**: 351 (1955).
  25. Caser, L., Gladkih, A., Hadge, D., Ambrosius, H., X-ray small-angle scattering study of general structure of chicken immunoglobulin Y. *Immunol. Letters*, **4**: 15 (1982).
  26. Palmer, J.L., Nisonoff, A., and Holde, K.E.V., Dissociation of rabbit gamma globulin into subunits by reduction and acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **50**: 314 (1963).
  27. Dressmann, G.R., and Benedict, A.A., Reductive dissociation of chicken  $\gamma$ G immunoglobulin in neutral solvents without a dispersing agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **54**: 822 (1965).
- 
- (1995년 12월 26일 접수)