

## 효소 분해에 의한 난황 항체의 항원 결합력 변화

이 경 애  
순천향대학교 식품영양학과

### Changes of Antigen Binding Activities of Hen's Egg Yolk Immunoglobulins after Proteolysis

Lee, Kyong Ae  
Department of food science and nutrition, Soonchunhyang university

#### Abstract

Yolk immunoglobulins (yIgG) from hen's egg were purified. To investigate the stability of yIgG to digestive enzymes, the changes of antigen binding activities (ABC) after in vitro proteolysis were examined by competitive ELISA. After 30 min exposure to pepsin, the ABC of yIgG was lost. However, comparing with native yIgG, the ABC of pepsin digested yIgG was decreased, but considerable amount of ABC was remained after 30 min exposure to pepsin in 50% saccharose solution. Therefore, the stability of yIgG to pepsin digestion was improved by the addition of saccharose to yIgG solution. The ABC of yIgG was considerably remained after exposure to trypsin and chymotrypsin for 8 hr. YIgG showed especially good stability to chymotrypsin proteolysis.

Key words: hen, yolk immunoglobulin, antigen binding activity, digestive enzyme, proteolysis

## I. 서 론

계란의 난황은 닭의 혈액에서 이행된 IgG가 1% 정도의 고농도로 존재하는 균일한 계이다. 계란 1개에서 약 100~150 mg의 crude IgG(yIgG)의 분리가 가능하므로 식품인 계란의 난황은 항체의 위생적인 대량 공급 원이다<sup>1,2)</sup>.

혈액 IgG가 난황에 이행된다는 사실은 1800년대 말에 알려졌다<sup>3)</sup>, 이에 관한 연구는 항체 정제법의 확립이 늦어지면서 지연되었다. 난황은 수분 50%, 지질 30%, 단백질 15%로 구성된 유효물이다. 난황 중의 단백질은 지질과 결합한 지단백질이나 지질과 결합하지 않은 수용성 단백질(리베틴)로 존재한다. 리베틴은 다시  $\alpha$ -,  $\beta$ - 및  $\gamma$ -리베틴으로 나뉘는데  $\gamma$ -리베틴을 난황 항체라 한다<sup>4)</sup>. 최근에 polyethylene glycol이나  $\gamma$ -carrageenan 등을 이용해 난황 항체가 존재하는 수용성 단백질을 지단백질로부터 손쉽게 분리하는 방법<sup>5,6)</sup>이 보고됨에 따라 비교적 간단히 난황 항체의 대량조제가 가능하게 되었으며, 이에 따라 난황 항체에 관한 연구도 활발히 진행되게 되었다.

난황 항체는 포유류 IgG의 'potential substitute'로서

감염방어, 면역연구용시약 등의 분야에서의 연구가 보고되어 있으며<sup>9,10)</sup>, 이 분야에서의 실용화가 기대되고 있다. 특히 난황 항체가 실험동물 조건에서 우수한 감염 예방 효과를 나타냈다는 여러 보고<sup>9,10,14)</sup>에 따라 수동면역을 위한 기능성 식품 소재로의 실용화가 절실히 요구되고 있다.

난황 항체를 식품소재로 실용화하기 위해 가장 중요한 것은 항체의 경구 섭취 후 체내 효소에 대한 안정성이라 사료된다. 그러므로 본 연구는 장내 소화 효소인 펩신, 트립신, 키모트립신에 대한 안정성을 알아 보고자 competitive 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)를 사용하여 항원 결합력의 변화를 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난황 항체의 조제

난황 항체는 전보<sup>15)</sup>에서와 같이 조제하였다. 산란 닭(Isabrown, 50-week-old, female)에 bovine serum albumin(BSA, sigma Co.)을 동량의 Freund's adjuvant (Difco)와 혼합하여 2주 간격으로 4회 근육주사하였

다. 4회 면역 후에 산란된 계란에서 난황을 분리하여 Polson 등의 방법<sup>6)</sup>에 따라 crude anti-BSA yIgG를 조제, 실험에 사용하였다.

**2. Biotinylated yIgG의 조제**

Biotinylated yIgG는 전보<sup>15)</sup>에서와 같이 NHS-LC-biotin(Pierce)을 사용하여 조제하였다.

**3. 소화 효소에 의한 분해**

1% 항체용액에 효소를 1/100(w/v)의 비율로 첨가하여 37°C에서 일정시간 반응시켰다. 항체용액(in 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 8.0)에 트립신(Sigma Co.) 및 키모트립신(Sigma Co.)을 첨가하여 0~8시간 반응시킨 후, 0.01% phenylmethylsulfonyl fluoride(in isopropanol)를 첨가하여 효소를 불활성화시켰다. 한편 항체용액(in 0.01 M Glycin-HCl buffer, pH 2.0)에 saccharose를 0% 또는 50%가 되도록 첨가하여 잘 혼합한 후, 펩신(Sigma Co.)을 첨가하여 2시간 반응시킨 후, phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.2)을 사용하여 펩신을 불활성화시켰다.

**4. 산 처리**

1% 항체용액(in 10 mM glycin-HCl buffer, pH 2.0)에 saccharose를 0% 또는 50%(w/v)가 되도록 첨가하여 잘 혼합한 후 37°C에서 4시간 반응시켰다.

**5. Competitive ELISA**

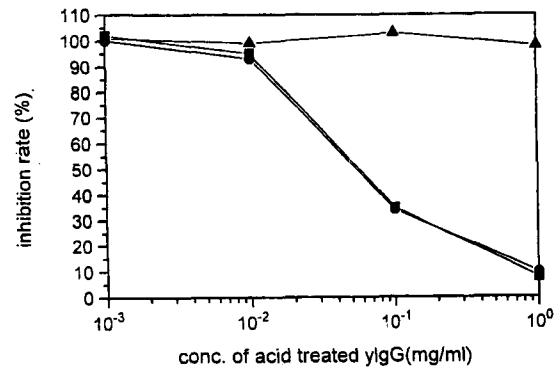
산 처리한 항체 및 효소분해한 항체의 항원 결합력의 변화는 competitive ELISA에 의해 검토하였다. 0.01% BSA용액(in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6)을 100 µl/well 첨가하여 2시간 coating시켰다. 0.02% tween을 함유한 PBS(PBST)로 희석한 여러 농도의 competing 항체용액(native yIgG, 산 처리 yIgG 및 효소분해 yIgG)과 일정농도의 Biotinylated yIgG 용액을 미리 1:1로 혼합하여 100 µl/well 첨가하여 2시간 competition시켰다. Alkaline phosphatase-extra avidin-conjugate(Sigma Co.)를 100 µl/well 첨가하여 2시간 반응시켰다. 0.1% sodium p-nitrophenyl phosphate(in diethanolamine buffer, pH 9.8)을 100 µl/well 첨가하여 30분간 발색시키고, 5 N NaOH를 첨가하여 반응을 정지시켰다. ELISA reader(Bio-Rad)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Competing 항체가 well에 coating된 항원(BSA)과 Biotinylated yIgG와의 결합을 저해하는 저해율은 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{\text{Competing 항체가 존재할 때의 흡광도}(A_{405})}{\text{Competing 항체가 존재하지 않을 때의 흡광도}(A_{405})}$$

**III. 결과 및 고찰**

**1. 산 안정성에 대한 saccharose 첨가 효과**

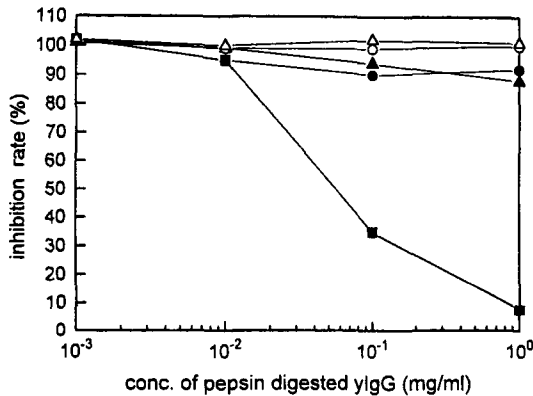
1% yIgG 용액(pH 2.0)에 saccharose를 50% 첨가하여 4시간 반응시킨 후 항원 결합력의 변화를 competitive ELISA에 의해 검토하여 Fig. 1에 나타내었다. 50% 저해율을 나타내는 항체의 농도(IC<sub>50</sub>)는 native yIgG가 6×10<sup>-2</sup> mg/ml이었다. Saccharose가 첨가되지 않은 yIgG 용액의 IC<sub>50</sub>은 4시간 후에는 측정이 불가능하였으므로 항원 결합력은 거의 소실된 것으로 생각된다. 한편 50% saccharose 용액을 첨가하여 4시간 반응시킨 yIgG의 IC<sub>50</sub>도 native yIgG와 거의 동일하였으므로 항원 결합력은 native yIgG와 거의 비슷함을 알 수 있다. 그러므로 saccharose 용액 중의 yIgG는 산에 대해 상당히 안정하며 최소한 항원결합 부위(Fab)의 구조에는 큰 변화는 없는 것으로 생각된다. 이<sup>15)</sup>는 yIgG의 산처리시 2차구조가 파괴된다고 하였으며, Dressman 등<sup>16)</sup>은 yIgG는 다른 항체에 비해 비공유결합이 약하다고 하였다. 형광 스펙트럼에 의하면 native yIgG는 disulfide 결합에 의해 트립토판 잔기의 형광이 quenching되어 있으나 강산으로 처리한 yIgG에서는 disulfide 결합에 의한 quenching 효과가 나타나지 않으므로(data not shown), saccharose에 의한 안정화 효과는 disulfide 결합 및 비공유 결합 등에 영향을 주는 것으로 생각된다.



**Fig. 1. Competitive binding curves of acid treated yIgG to biotinylated yIgG.** Acid treatment was performed with (●), or without (▲) saccharose at pH 2.0 for 4 hr. Native yIgG (■) was used as a control.

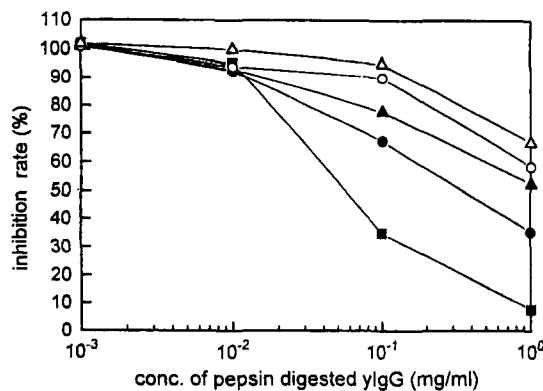
**2. 펩신 분해**

1% yIgG 용액(pH 2.0)에 펩신을 첨가한 후 항원 결합력의 변화를 competitive ELISA에 의해 검토하여 Fig. 2에 나타내었다. YIgG는 펩신과 30분 반응 후 항원 결합력이 소실되었다. 펩신 작용 후 항원 결합력의 급격한 저하는 yIgG의 강산에 대한 불안정성과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각되어 산에 대한 안정성을 상당히 증가시켜주는 saccharose를 yIgG 용액에 50%가 되도록 첨가하여 항원 결합력의 변화를 검토하여 Fig. 3에 나타내었다. 반응시간이 증가함에 따라 항원 결합력이 점차 저하되기는 하였으나 펩신 작용에 대한 저항성은 상당히 증가되었다. Native yIgG의 IC<sub>50</sub>은



**Fig. 2. Competitive binding curves of pepsin digested ylgG to biotinylated ylgG.**

Pepsin digestion was performed without saccharose. YlgG was digested with pepsin for 0 min (■), 30 min (●), 60 min (▲), 90 min (○), or 120 min (△) at pH 2.0.



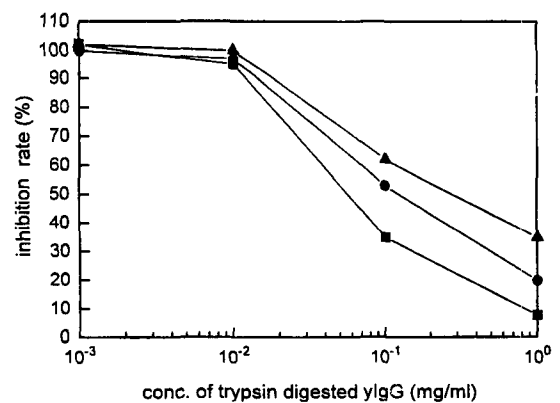
**Fig. 3. Competitive binding curves of pepsin digested ylgG to biotinylated ylgG.**

Pepsin digestion was performed with saccharose. YlgG was digested with pepsin for 0 min (■), 30 min (●), 60 min (▲), 90 min (○), or 120 min (△) at pH 2.0.

6×10<sup>2</sup> mg/ml이었다. 펩신과 30분 반응시킨 yIgG의 IC<sub>50</sub>은 saccharose 첨가시 4×10<sup>1</sup> mg/ml로서 항원 결합력이 약 6.7배 저하되었으나 미첨가시 IC<sub>50</sub>의 측정이 불가능하였으므로 항원 결합력은 거의 소실되었음을 알 수 있다. Tenenhouse<sup>17)</sup> 등과 Leslie 등<sup>18)</sup>에 의하면 yIgG는 rabbit IgG에 비해 펩신 분해에 민감하며, yIgG는 펩신 분해에 의해 Fab가 생성된다고 한다. YlgG가 수동 면역 효과를 나타내기 위해서는 펩신 분해에 의해 생성된 Fab의 활성이 유지되어야 한다. 위액을 중화하기 위해 Klemperer는<sup>4)</sup> 면역글로블린과 중탄산나트륨을 동시에 경구 투여하였으며, Tacket 등<sup>19)</sup>은 수산화 마그네슘 또는 수산화 알루미늄을 면역글로블린과 같이 경구 투여하였다. 그러므로 ylgG를 산으로부터 보호하기 위해 50% saccharose 용액에 분산시켜 경구 투여하면 펩신 작용 후에도 Fab의 활성이 일부 유지될 것으로 생각된다.

**3. 트립신 분해**

1% yIgG 용액(pH 8.0)에 트립신을 첨가, 반응시킨 후 항원 결합력의 변화를 검토하여 Fig. 4에 나타내었다. YlgG는 트립신과의 반응시간이 증가함에 따라 항원 결합력이 점차로 저하되었으나 펩신에 비해 상당히 안정하였다. IC<sub>50</sub>은 native IgY가 6×10<sup>2</sup> mg/ml이었으나, 8시간 반응 후에는 3×10<sup>2</sup> mg/ml로서 항원 결합력이 2배 저하되었다. McClead 등<sup>20)</sup>은 bovine colostrum anti-cholera toxin을 이용한 cholera toxin의 *in vitro* 중화실험 결과 50%의 중화 효과를 나타냈다고 하였다. 동일한 측정방법을 사용하지 않아 상대적 비교는 어려우나 트립신 작용에 대한 안정성은 최소한 bo-



**Fig. 4. Competitive binding curves of trypsin digested ylgG to biotinylated ylgG.**

Trypsin digestion was performed for 0 hr (■), 4 hr (●), 8 hr (▲) at pH 8.0.

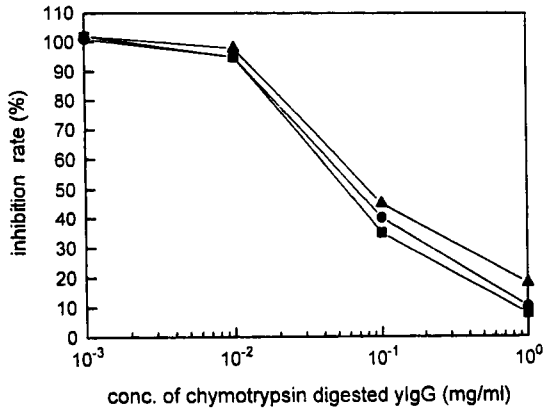


Fig. 5. Competitive binding curves of chymotrypsin digested yIgG to biotinylated yIgG. Chymotrypsin digestion was performed for 0 hr (■), 4 hr (●), or 8 hr (▲) at pH 8.0.

vine Colostral IgG<sub>1</sub>과 비슷하다고 생각된다.

#### 4. 키모트립신 분해

1% yIgG(pH 8.0)에 키모트립신을 첨가하여 항원 결합력의 변화를 검토하여 Fig. 5에 나타내었다. 반응시간이 길어짐에 따라 항원 결합력의 저하가 나타났으나 펩신 및 트립신에 비해 저하도는 그리 크지 않았으므로, yIgG는 키모트립신 분해에 대해 가장 안정하다고 생각된다. IC<sub>50</sub>은 native IgY가 6×10<sup>2</sup> mg/ml이었으나 키모트립신과 8시간 반응 후에는 9×10<sup>2</sup> mg/ml로서 항원 결합력이 1.5배 저하되었다.

### IV. 요약

체내 소화효소에 대한 안정성을 검토하기 위해 competitive ELISA를 이용하여 항원 결합력의 변화를 조사하였다.

YIgG는 펩신에 대해 상당히 불안정하여 pH 2.0에서 30분간의 반응에 의해 항원 결합력이 소실되었다. 한편 yIgG 용액에 50%(w/v) saccharose를 첨가하여 펩신과 30분 반응시킨 결과 native yIgG에 비해 항원 결합력이 6.7배 정도 저하되었으나 미첨가시에 비해 항원 결합력이 상당히 유지되었으므로, 펩신에 대한 yIgG의 안정성은 saccharose에 의해 상당히 증가되었음을 알 수 있다.

YIgG는 트립신 및 키모트립신과 반응 후 항원 결합력의 큰 저하는 나타나지 않아 펩신에 비해 상당히 안정한 것으로 생각된다. 트립신과 8시간 반응 후 yIgG의 항원 결합력은 native yIgG에 비해 2배 감소되었으

나 키모트립신과 8시간 반응 후 yIgG의 항원 결합력은 1.5배 감소되었다. 그러므로 yIgG는 키모트립신에 대해 가장 안정하였다.

### 감사의 글

본 연구는 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제에 의해 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비를 지원하여 준 한국학술진흥재단에 깊은 감사를 드립니다.

### 참고문헌

- 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).
- Kowalczyk, K., Halpern, J.D.J., and Roth, T.F.: Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken, *Immunol.*, **54**: 157 (1970).
- Polson A., von Wechmar, B., and Fazakesley, G.: Antibodies to proteins from yolk of immunized hens, *Immunol. Comm.*, **9**: 495 (1980).
- Klemperer, F.: Über naturliche Immunität und ihre Verwertung für die immunisierung therapire, *Arch. Expl. Pathol. Pharmacol.*, **31**: 356 (1893).
- Hatta, H., Sim, J.S., and Nakai, S.: Separation of phospholipids from egg yolk and recovery of water-soluble proteins, *J. Food Sci.*, **53**: 425 (1988).
- 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).
- Hatta, H., Kim, M., and Yamamoto, T.: A novel method of hen egg yolk antibody, "IgY", *Agri. Biol. Chem.*, **54**: 2531 (1990).
- Jensenius, J.C., Anderson, I., and Hau, J.: Method for purification of yolk IgG, *J. Immunol. Meth.*, **46**: 63 (1981).
- Bartz, C.R., Conklin, R.H., Tunstall, C.B., and Steel J. H.: Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins, *J. Infect. Diseases.*, **142**: 439 (1980).
- Yokoyama, H., Peralta, C., Diaz, R., Sando, 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**: 998 (1992).
- Thalley B.S., and Carroll, S.B.: Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized

- hens, *Bio/Tech.*, **8**: 934 (1990).
12. Viera, H., Russo, M.K., Maciel, M.B., and Pereira, B.: Egg yolk as a source of antibodies for human parathyroid hormone (hPTH) radioimmunoassay, *J. Immunoassay*, **5**: 121 (1984).
  13. Fertel, R., Tetiv, J.Z., Coleman, R.D., Schwarz, J.E., Greenwald, J.E., and Bianchine, J.R.: Formation of antibodies to prostaglandins in the yolk of chicken eggs, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **102**: 1028 (1981).
  14. Ebina, T., Tsukada, K., Umez, K., Nose, M., Tsuda, K., Hatta, H., Kim, M., and Yamamoto, T.: Gastroenteritis 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).
  15. 이경애: 난황 항체의 안정성에 관한 연구, *한국조리과학회지*, **12**: 54 (1996).
  16. Dressmann, G.R., and Benedict, A.A.: Reductive dissociation of chicken  $\gamma$ G immunoglobulin in neutral solutions without a dispersing agent, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **54**: 822 (1965).
  17. Tenenhouse, H.S., and Deutsch, H.F.: Some physical-chemical properties of chicken  $\gamma$ -globulins, and their pepsin and papain digestion products, *Immunochemistry*, **3**: 11 (1966).
  18. Leslie, G.A., and Benedict, A.A.: Structural and antigenic relationships between avian immunoglobulins, *J. Immunol.*, **104**: 810 (1970).
  19. Tacket, C.O., Losonsky, G., Link, H., Hoang, Y., Guesry, P., Hilpert, H., and Levine, M.M.: Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *E. coli*, *N. Engl. J. Med.*, **318**: 1240 (1988).
  20. McClead, E., and Gregory, A.: Resistance of bovine colostrum anti-cholera toxin antibodies to *in vitro* and *in vivo* proteolysis, *Infect. Immunol.*, **44**: 474 (1984).
- 
- (1997년 4월 12일 접수)