

## 난황 중 항체의 안정화에 대한 당류의 효과 I. 프럭토올리고당 용액 중에서 난황 항체의 안정성

이 경 애  
순천향대학교 식품영양학과

### Effects of Sugars on the Stabilization of Egg Yolk Antibodies in Laying Hens

#### I. The Stability of Yolk Antibodies in Fructooligosaccharide Solutions

Lee, Kyong Ae

Department of food science and nutrition, Soonchunhyang university, Korea

#### Abstract

The stabilizing effect of fructooligosaccharide (FO) on hen's egg yolk immunoglobulin (yIgG) by heat and acid was investigated. The heat stability of yIgG at 70~80°C was enhanced in a concentration-dependent manner by adding 0~50% (w/v) FO to a yIgG solution. Acid-induced inactivation of yIgG was also suppressed in a concentration-dependent relationship by addition of FO. Addition of 50% FO almost completely stabilized yIgG at pH 3. The remarkable stabilizing effect of FO on yIgG may enhance the use of yIgG as functional food ingredients.

Key words: hen, yIgG, fructooligosaccharide, acid, stabilizing effect

## I. 서 론

프럭토올리고당(FO)은 설탕에  $\beta$ -글루코시다제를 작용시켜 설탕의 과당 잔기에 1~3개의 과당 분자를  $\beta$  결합시킨 것이다<sup>1)</sup>. FO는 장내 균총 개선, 혈중 콜레스테롤 개선, 저충치성, 면역력의 강화, 저열량원 등 다양한 생리 특성을 갖는 유익한 당질이다<sup>2,3)</sup>. 또한 FO의 감미는 설탕의 1/4~1/2 정도로 설탕과 함께 사용하면 감미가 좋아지며 설탕과 유사한 점도를 나타낸다. 또한 FO는 식품의 수분활성을 저하시켜 식품의 저장성을 향상시킬 수 있는 기능성 식품소재로서 현재 널리 이용되고 있다<sup>4)</sup>.

한편, 계란의 난황은 IgG 형태의 면역글로블린(yIgG)만이 다량으로(100~200 mg/egg) 존재하는 homogeneous system이며, 매우 위생적인 항체의 우수한 공급원이다<sup>5)</sup>. 많은 양의 특이 항체는 면역시킨 닭이 매일 산란하는 계란을 수거하여 polyethylene glycol이나  $\gamma$ -카라기난을 사용한 침전법에 의해 간단히 분리할 수 있다<sup>6,7)</sup>.

yIgG는 바이러스, 효소, 호르몬, 독소, 식품 단백질

등 다양한 물질에 대한 항체 유도가 검토되어 왔다<sup>12,16)</sup>. 특히 Yokoyama 등<sup>17)</sup>은 *E-coli*에 대한 yIgG를 어린 돼지에게 경구 투여함으로써 설사예방이 가능하다고 했으며, 이 외에도 실험동물(mouse, rat 등) 조건하에서의 감염방어 가능성에 대한 여러 보고<sup>18,20)</sup>에 따라 기능성 식품소재로의 이용이 기대되고 있다.

yIgG를 식품소재로 실용화하기 위해서는 중요한 것은 yIgG의 안정성이다. yIgG는 산의 존재하에서 불안정하여 pH가 낮은 식품에 사용이 제한되고 있다. 고농도의 당은 수용액 중에서 단백질을 안정화시키므로 당은 단백질의 안정제로 이용되고 있으며, 이<sup>21)</sup>는 yIgG가 50% 설탕용액 중에서 산에 대해 큰 안정성을 나타낸다고 보고했다. 본 연구는 기능성 당질인 FO 용액 중에서의 yIgG의 안정성을 설탕 용액 중에서의 안정성과 비교, 검토했다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

$\beta$ -락토글로블린( $\beta$ -Lg, Sigma Co.)을 면역원으로 사

용했으며,  $\beta$ -Lg의 면역에 의해 유도된 항체를 난황에서 분리하여 실험재료로 이용했다.

**2. 항체의 조제**

닭(Isabrown, 28-week-old, female)에  $\beta$ -Lg을 2주 간격으로 4회 면역시켰다. 초기 면역은 0.2%  $\beta$ -Lg(in phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.2) 0.5 ml를 동량의 complete Freund's adjuvant(Difco)와 혼합하여 emulsion을 조제한 후 근육주사했으며, 추가면역은 incomplete Freund's adjuvant(Difco)와 함께 emulsion을 조제하여 3회에 걸쳐 근육주사했다.

**3. 항체의 분리**

닭을 4회 면역시킨 후 산란된 계란의 난황을 분리하여 polyethylene glycol 6000을 사용하여<sup>19)</sup> crude anti- $\beta$ -Lg yIgG를 조제했다.

**4. 열처리**

0.1% 항체용액(in saline, pH 7.0)에 당을 0~50% (w/v) 되도록 첨가한 후 70~80°C에서 10~30분간 반응시킨 후 효소면역측정법(ELISA)에 의해 항체를 검토했다.

**5. 산처리**

1% 항체용액(in 0.01 M Glycin-HCl buffer, pH 3.0)에 당을 0~50%(w/v)가 되도록 첨가하여 잘 혼합하고, 37°C에서 2시간 반응시킨 후 PBS로 중화하여 ELISA를 실시했다.

**6. Indirect ELISA<sup>22)</sup>**

항체의 항체가 변화는 indirect ELISA에 의해 측정했다. Microtiter plate(Nunc)에 0.01%  $\beta$ -Lg 용액(in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6)을 100  $\mu$ l/well 첨가하여 2시간 동안 coating했다. 0.02% tween을 함유한 PBS (PBS-T)로 well을 씻은 후, PBS-T로 적당히 희석한 yIgG 용액을 100  $\mu$ l/well 첨가하여 2시간 반응시켰다. Well을 씻은 후, alkaline phosphatase rabbit anti-chicken IgG(H+L) conjugate(Sigma Co.)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 NaOH로 반응을 정지시켰다. Microtiter plate reader(Bio-Rad)를 이용해서 405 nm에서 흡광도(ELISA value)를 측정했다. 모든 반응은 실온에서 실시했다.

**7. 형광스펙트럼의 측정**

트리토판 잔기의 형광스펙트럼은 spectrofluorometer (Jasco, Japan)를 사용하여 296 nm에서 excitation시켜 형광의 극대치를 나타내는 파장을 측정했다.

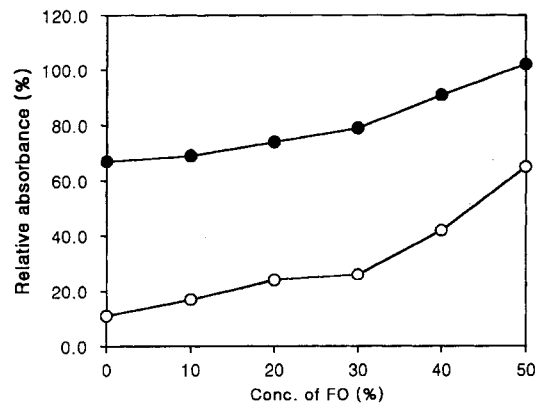
**8. 통계처리**

실험은 3회 반복 실시했으며 50% 당용액에서의 열 및 산 안정성은 SAS 통계프로그램을 사용하여 유의성 검정을 실시했다.

**III. 결과 및 고찰**

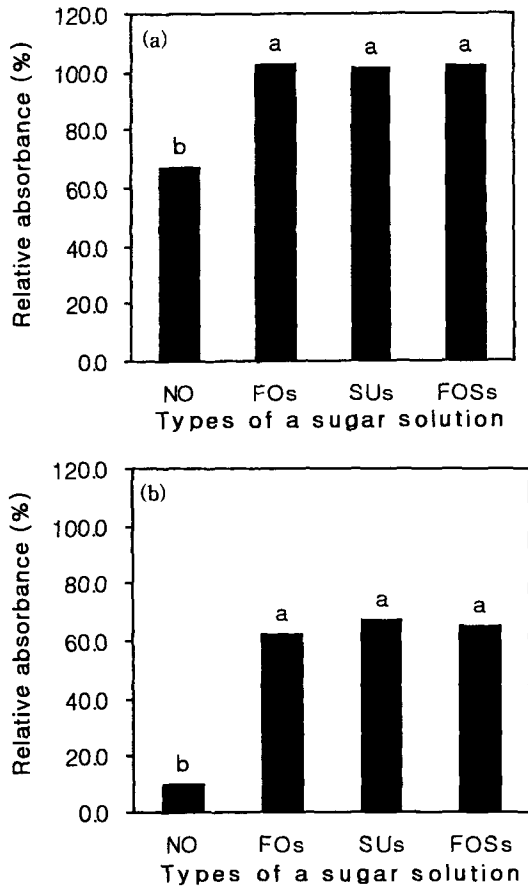
**1. 열에 대한 FO의 안정화 효과**

0~50% FO(w/v) 수용액 중에 존재하는 yIgG를 70~80°C에서 20분간 가열한 후, 항체가 변화를 indirect ELISA에 의해 검토하여 상대적 항체가를 Fig. 1에 나타냈다. 항체의 열 안정성은 40% 이상의 FO를 사용했을 때 크게 증가했으며, 50% FO의 안정화 효과가 가장 좋았다. 50% FO용액의 경우, 70°C, 80°C에서 20분 가열한 후의 상대적 항체가는 각각 100%, 65%였다. 전보<sup>21)</sup>에 의하면 yIgG는 75°C 이상의 온도에서 15분간 가열한 후 거의 활성을 나타내지 않았으나, FO의 사용은 80°C에서의 열 안정성을 크게 향상시켰음을 알 수 있었다. 한편, FO 및 설탕에 의한 yIgG의 열 안정화 효과를 비교 검토하여 Fig. 2에 나타냈다. 80°C에서 20분 가열한 yIgG의 상대적 항체가는 50% FO 용액(FOs)을 사용한 경우, 50% 설탕용액(SUs)을 사용한 경우 보다 조금 낮았으나 큰 차이는 보이지 않았으며, FO와 설탕을 1:1로 혼합한 50%



**Fig. 1. Antibody activity of yIgG after heating at 70°C (●), or 80°C (○) for 20 min in FO solution.**  
 Relative absorbance (%)=(absorbance of heat-treated yIgG)×100/(absorbance of native yIgG) (FO: fructooligosaccharide).

당용액(FOSs)의 효과는 SUs와 비슷했다. FOs, SUs, FOSs에서 yIgG의 상대적 항체가는 용액간에 유의적 차이를 보이지 않았으므로( $p < 0.05$ ), 세 용액은 비슷한 열 안정화 효과를 나타내는 것으로 사료된다. FO는 100°C 이하의 온도에서는 상당히 안정하므로<sup>5)</sup>, 가열에 의한 FO의 분해는 일어나지 않을 것으로 생각된다. 고농도 FO 용액에서 yIgG의 열 안정성 향상은 FO 용액의 높은 점도가 열 전달을 지연시켜 항원결합부위인 Fab를 열 변성이 일어나지 않도록 보호했기 때문으로 생각되나 이 후 자세히 검토되어야 할 것으로 사료된다.

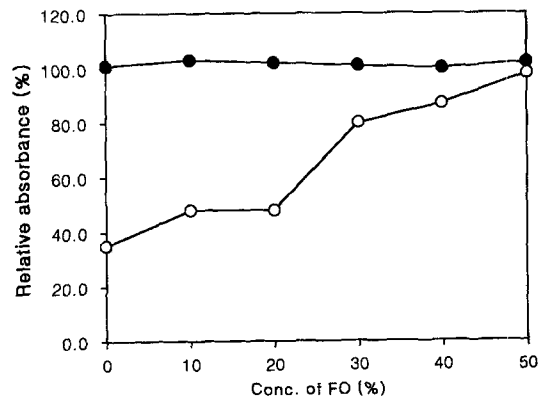


**Fig. 2. Heat stability of yIgG in 50% sugar solution. yIgG was incubated at 70°C (a), or 80°C (b) for 20 min. Relative absorbance (%)=(absorbance of heat-treated yIgG)×/(absorbance of native yIgG). The different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).**

NO: yIgG in no sugar solution  
 FOs: yIgG in 50% fructooligosaccharide solution  
 SUs: yIgG in 50% sucrose solution  
 FOSs: yIgG in solution containing 25% fructooligosaccharide and 25% sucrose.

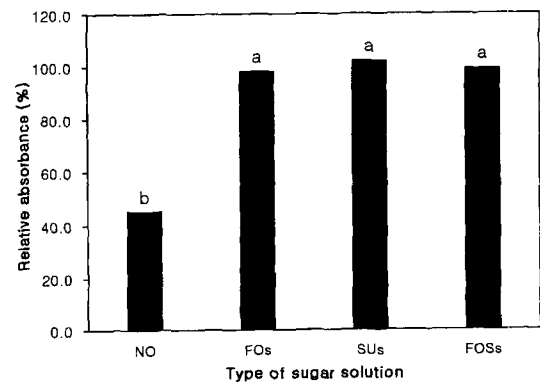
**2. 산에 대한 FO의 안정화 효과**

pH 3의 0~50% FO(w/v) 수용액 중에서 2시간 반응시킨 yIgG의 항체가 변화를 indirect ELISA에 의해 검토했다(Fig. 3). yIgG의 산에 대한 안정성은 FO에 의해 향상되었는데, 안정화 효과는 FO 농도가 높아짐에 따라 증가되었다. yIgG는 pH 3 이하의 산성하에서는 변성이 일어나 항체의 활성이 상당히 저하되나<sup>2)</sup>, 50% FO에서는 상대적 항체가가 98%로 미변성 yIgG와 비슷한 활성을 유지하고 있었다.



**Fig. 3. Antibody activity of acid-treated yIgG in FO solution. yIgG was incubated at pH 7 (●), or pH 3 (○) for 2 hr.**

Relative absorbance (%)=(absorbance of acid-treated yIgG)×100/(absorbance of native yIgG). (FO: fructooligosaccharide).



**Fig. 4. Antibody activity of acid-treated yIgG in 50% sugar solution.**

yIgG was incubated at pH 3 for 2 hr. Relative absorbance (%)=(absorbance of acid-treated yIgG)×100/(absorbance of native yIgG). The different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). NO: yIgG in no sugar solution  
 FOs: yIgG in 50% fructooligosaccharide solution  
 SUs: yIgG in 50% sucrose solution  
 FOSs: yIgG in solution containing 25% fructooligosaccharide and 25% sucrose.

한편 pH 3에서 FO 및 설탕에 의한 yIgG의 안정화 효과를 비교 검토하여 Fig. 4에 나타냈다. pH 3의 50% 당용액 중에서 2시간 반응시킨 yIgG의 상대적 항체가는 당이 첨가되지 않은 경우 45% 정도였다. 그러나 FOs, SUs, FOSs에서의 상대적 항체가는 각각 98%, 102%, 99%로서 미변성 yIgG와 비슷한 활성을 나타냈으며, 상대적 항체가는 당용액간에 유의적 차이를 보이지 않았으므로( $p < 0.05$ ), 세 종류의 당용액은 pH 3에서 매우 우수한 산 안정화 효과를 보임을 알 수 있었다. FO는 환원당이므로 저장시 FO와 yIgG간의 아미노-카보닐 반응에 의한 갈색화 반응과 이에 따른 활성의 저하 등이 일어날 수 있다. 그러나 FO는 실온에서 산에 대해 상당히 안정하므로<sup>5)</sup> 갈색화 반응은 잘 일어나지 않을 것으로 생각된다. 또한 FO와 설탕의 혼합용액인 FOSs는 열 안정성이 좋으며 (Fig. 2 참고), 산에 대해서도 우수한 안정화 효과를 나타내므로 FO와 설탕의 혼합용액을 사용함으로써 갈색화 및 활성 저하는 상당히 감소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Dressman 등<sup>23)</sup>은 환원시킨 yIgG의 H chain과 L chain은 rabbit IgG에 비해 쉽게 해리되므로 비공유결합이 약하다고 했다. 이<sup>21)</sup>는 pH 3에서 반응시킨 yIgG의 2차 구조를 CD 스펙트럼에 의해 검토한 결과 negative maximum이 저파장으로 이동되므로 2차구조에 변화를 일으켰다고 했다. 그러므로 고농도 당용액 중에서 산 안정성의 향상은 당이 yIgG를 비공유결합을 포함한 구조변화로 부터 항체를 보호하기 때문으로 생각된다. Bäck 등<sup>24)</sup>은 당은 단백질 내의 소수결합 증가시켜 단백질을 안정화시킨다고 했다.

### 3. 트립토판 잔기의 형광스펙트럼

**Table 1. Fluorescence of tryptophan residues in the acid-treated yIgG molecule in 50% sugar solution**

Types of a yIgG	<i>E<sub>max</sub></i> (nm)
N	330
NO	335
FOs	331
SUs	330
FOSs	330

yIgG was incubated at pH 3 for 2 hr. The wavelength at which the emission fluorescence was maximal (*E<sub>max</sub>*) was measured by spectrofluorometer.

N: native yIgG.

NO: yIgG in no sugar solution.

FOs: yIgG in 50% fructooligosaccharide solution.

SUs: yIgG in 50% sucrose solution.

FOSs: yIgG in solution containing 25% fructooligosaccharide and 25% sucrose.

pH 3의 50% 당용액 중에서 2시간 반응시킨 yIgG의 형광스펙트럼을 검토했다(Table 1). 미변성 yIgG는 330 nm에서 최대 형광을 보였으나, 당을 첨가하지 않은 경우 최대 형광을 나타내는 파장(*E<sub>max</sub>*)은 334 nm였으며 형광 강도도 크게 증가했다(data not shown). 한편 FOs, SUs, FOSs의 *E<sub>max</sub>*는 각각 331 nm, 330 nm, 330 nm로 미변성 yIgG와 큰 차이를 보이지 않았다. Reynaud 등<sup>25)</sup>, Parvari 등<sup>26)</sup> 및 Reynaud 등<sup>27)</sup>이 보고한 yIgG의 sequence 데이터에 의하면 yIgG에는 9개의 트립토판 잔기가 존재하는데, 포유류 IgG와 마찬가지로 미변성 yIgG에 존재하는 트립토판 잔기의 형광은 disulfide 결합에 의해 소거(quenching)되어 있다. 그러나 산 변성이 일어나면 구조변화에 따라 disulfide 결합의 소거작용에 변화를 일으켜 소량의 트립토판 잔기가 표면에 노출되면서 형광 강도가 증가하고 *E<sub>max</sub>*가 고파장으로 이동하게 된다<sup>28)</sup>. 그러므로 고농도의 당은 내부에 갇혀 있던 트립토판 잔기가 산에 의해 표면에 노출되지 않도록 yIgG 내의 소수결합 등을 강화하여 산에 대한 구조 안정성 증가시키는 것으로 사료된다.

## IV. 결론 및 요약

프럭토올리고당(FO)이 난황항체(yIgG)의 열 및 산 안정성에 미치는 영향을 검토했다. 항체가의 변화는 indirect ELISA에 의해 검토했으며, spectrofluorometer를 사용하여 트립토판 잔기가 최대 형광을 나타내는 파장(*E<sub>max</sub>*)을 측정했다.

yIgG는 FO에 의해 열에 대한 안정성이 증가했다. 특히 80°C에서의 안정성이 크게 향상되었으며, 안정화 효과는 50% FO 용액(FOs)을 사용했을 때 가장 좋았다. FOs, 50% 설탕 용액(SUs), FO와 설탕을 1:1로 혼합한 50% 당용액(FOSs)에서 yIgG의 상대적 항체가는 유의적 차이를 보이지 않았으므로( $p < 0.05$ ), FOs, SUs, FOSs는 비슷한 열 안정성을 나타내는 것으로 사료된다.

또한 FO는 pH 3에서 yIgG의 안정성을 매우 증가시켰다. 당을 사용하지 않은 용액에서 yIgG의 상대적 항체가는 45%였으나, FOs, SUs, FOSs에서 yIgG의 상대적 항체가는 각각 98%, 102%, 99%였으며, 상대적 항체가간에는 유의적 차이를 보이지 않았다( $p < 0.05$ ). 세 종류의 당용액에서 yIgG는 미변성 yIgG와 거의 비슷한 활성을 유지하고 있었으므로, 각 당용액은 매우 우수한 산 안정화 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 트립토판 잔기의 형광스펙트럼에서 *E<sub>max</sub>*를 측정한 결과 FOs, SUs, FOSs는 각각 331 nm, 330 nm, 330

nm로서 미변성 yIgG의 330 nm와 차이를 보이지 않았다. 그러므로 산에 의한 활성 저하와 관련있는 yIgG의 구조변화는 고농도의 FO에 의해 거의 100% protection 되므로, FO에 의한 안정성 향상은 yIgG의 이용도를 상당히 증가시킬 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제(과제번호: 01D0607)에 의해 수행된 연구 결과의 일부이며, 연구비를 지원해 준 학술진흥재단에 깊은 감사를 드립니다.

### 참고문헌

1. Spiegel, J.E., Rose, R., Karabell, P., Frankos, V.H. and Schmitt, D.F.: Safety and benefit of fructooligosaccharide as food ingredients, *Food Tech.*, **48**: 85 (1994).
2. Hidaka, H., Eida, T., Takijima, T., Tokunaga, T. and Tashuro, Y.: Effect of fructooligosaccharide on intestinal flora and human health, *Bifidobacteria Microflora*, **5**: 37 (1986).
3. 日高秀昌: 프락토올리고당의 기능, 식품과학과 산업, **27**: 103 (1994).
4. Tomomatsu, H.: Health effects of oligosaccharides, *Food Tech.*, **48**: 61 (1994).
5. 김정열, 육 철, 권혁진, 홍성용, 박찬구, 박경호: 이소말토올리고당과 프락토올리고당의 물리적 및 생리학적 특성, 한국식품과학회지, **27**: 170 (1995).
6. 박관화: 탄수화물 신소재의 개발, 식품과학과 산업, **25**: 73 (1992).
7. 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).
8. Löscher, U., Schraner, I., Wanke, R. and Jurgens, L.: The chicken egg, an antibody source, *J. Vet. Med. B*, **33**: 609 (1988).
9. Bade, H. and Stegmann, H.: Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk, *J. Immunol. Methods*, **72**: 421 (1984).
10. Polson, A., Von Wetchmar, B. and Fazakerly, G.: Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens, *Immunol. Commun.*, **9**: 475 (1980).
11. Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T.: A novel method for hen egg yolk antibody, "IgY", *Agri. Biol. Chem.*, **54**(10): 2531 (1990).
12. Bar-Joseph, M. and Malkinson, M.: Hen egg yolk as a source of anti-viral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant virus, *J. Virol. Methods*, **1**: 179 (1980).
13. Barts, 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).
14. Thally, B.S. and Carroll, S.B.: Rattlesnake and scorpion antivenom from the egg yolks of immunized hens, *Bio/Tech.*, **8**: 934 (1990).
15. 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).
16. 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).
17. Yokoyama, H., Peralta, C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y. and Kodama, Y.: Passive protection of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets, *Infect. Immunol.*, **60**: 998 (1992).
18. Kühlmann, R., Wiedemann, V., Schmidt, P., Wanke, R., Link, E. and Löscher, U.: Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal disease, *J. Vet. Med. B*, **35**: 609 (1988).
19. 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).
20. Hamada, S., Horikoshi, 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**(11): 4161 (1991).
21. 이경애: 난황항체의 안정성에 관한 연구: 한국조리과학회지, **12**(1): 54 (1996).
22. Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. First international symposium on immunoenzymatic technique INSERIM symposium No. 2., 135 (1976).
23. 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).
24. Back, J.F., Oakenfull, D. and Schmith, M.D.: Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols, *Am. Chem. Soc.*, **18**: 5191 (1979).
25. 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).

26. 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 (1989).
27. Reynaud, C-A., Dahan, A. and Weill, J-C.: Complete sequence of a chicken  $\lambda$  light chain immunoglobulin derived from the nucleotide sequence of its mRNA, *Immunology*, **80**: 4099 (1983).
28. Toivan, A. and Toivan, P.: Avian immunology, CRC press, Vol. 1, p. 113, (1987).
- 
- (1998년 10월 15일 접수)