

*Streptococcus mutans*에 대한 specific IgY의 항균력

김영봉 · 노정해 · 손동화 · 김희주 · 성기승 · 이남형
한국식품개발연구원

Antimicrobial activity of Specific IgY against *Streptococcus mutans*

Young-Boong Kim, Jeong-Hae Rho, Dong-Hwa Shon, Hee-Joo Kim,
Ki-Seung Seong and Nam-Hyung Lee
Division of Livestock product utilization, Korea Food Research Institute

Abstract

Antimicrobial effects of the specific IgY separated from eggs which were laid by hens vaccinated with *Streptococcus mutans* were investigated. The comparison tests of vaccination, addition levels of crude specific IgY, and inoculation concentration were applied by microscopic observation and turbidity test. Ten% addition of crude specific IgY obtained from vaccinated hens showed agglomerative clusters of *S. mutans* cells in supernatants and sediments, while crude IgY produced by non-vaccinated hens showed no cluster. IgY addition above 5% showed agglutinating clusters of most *S. mutans* cells and there was definite difference between IgY addition below 2.5% and above 5%. Concentration tests of crude IgY revealed that antimicrobial effects were differentiated by addition level and addition over 10% produced satisfactory results with turbidity test. The cluster size was dependent upon concentration of crude IgY addition. 10^5 cfu/mL inoculation showed agglutinated cells and extent of agglomeration was proportional to cell numbers. Study of inoculation levels showed that 10% addition of crude IgY decreased turbidity effectively regardless of number of *S. mutans* cells. Plaque formation decreased to 75% with 15% addition of specific IgY concentration. These results implied that IgY separated from eggs laid by *S. mutans*-vaccinated hens might prevent dental caries caused by *S. mutans*.

Key words : *streptococcus mutans*, specific IgY, antimicrobial activity

서 론

난생(卵生)동물의 경우 어미 닭이 획득한 면역항체는 난황 중에 이행되어 축적되고 자손에 전해진다. 이것은 조류 등의 난생동물에서 특징적인 모자(母子) 면역기능이라 하며 난황중의 항체는 포유류의 IgG의 항체에 해당되나 단백 화학적 성질이 약간 다르고 또한 난황유래의 항체이므로 IgY(Immunoglobulin yolk)라 부른다. 1960년대까지 여러 종류의 항원(세균, virus, 단백질 등)을 산란계에 면역시켜, 대응하는 특이적 항체가 난황 중에 이행, 축적하는 사실이 확인되었다⁽¹⁾. IgG

는 난황에만 특이적으로 존재하고 그 농도는 1 mL 당 약 10 mg을 함유하며 계란 부화시 난황 중에 들어있는 IgG 및 난백 중에 들어있는 IgA와 IgM은 병아리의 초기 감염예방에 중요한 역할을 하게 된다. 일반적으로 IgY는 90°C의 열에 15분 가열시 거의 활성이 사라지며 pH 3이하에서는 34% 정도의 활성을 갖는다⁽²⁾. IgY의 산업적 이용에 대한 현재까지의 연구는 사람과 가축에서 rotavirus에 의한 설사증의 예방⁽³⁻⁶⁾, 충치의 예방⁽⁷⁻⁹⁾, 가축에서 대장균성 설사증에 의한 예방등이다. Hatta 등⁽¹⁰⁾은 hydrovirus(HRV) 항원을 사용해 비교 면역실험을 한 결과 산란계 1수가 산란하는 난황에서 약 40 g의 IgY가 얻어진다고 하였고 Jensenius⁽¹¹⁾은 산란계 1수에서 1개월당 약 500 mL의 가토 항 혈청에 상당하는 계란항체가 얻어지는 것으로 보고했다. 이는 토끼에서 얻어진 양보다 120배 우수하다는 것이 판명되었다.

충치 유발균으로는 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sobrinus*가 보고되고 있으며⁽¹²⁾, 당 성분이 존재

Corresponding author : Young-Boong Kim, Div. of Livestock product utilization, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyundong, Bundangku, Songnam-si, Kyonggi-Do Republic of Korea

Tel : 82-31-780-9180

Fax : 82-31-780-9234

E-mail : kybaaa@kfri.re.kr

시 이들 균이 치아표면에 단단히 들러붙어서 식사 시 제공되는 각종 당류를 발효하여 산(acids)을 생성시키므로 충치가 유발된다. *S. mutans*는 세포 표면에 있는 이 두 glucosyltransferase(GTase)의 협동으로 치아에 단단히 들러 붙을 수 있게 된다. 즉 GTase기작이 우식증 발단에 큰 요인으로 여겨진다고 하였다⁽⁷⁾. 치아표면에 *S. mutans*가 부착되는 정도에 대한 연구들은⁽¹³⁻¹⁶⁾ 대부분이 실험실적인 방법에 의하여 실시되었다. *S. mutans*에 대응하는 효과적인 방법중의 하나로 *S. mutans*의 항체를 능동 면역시키거나 수동 면역하는 방법이다. 이중에서도 수동면역이 연구대상이 되고 있으며 특히, 경구 수동면역이 간편하고 효과적이므로 이것에 초점이 모아지고 있다. 충치균을 면역시킬 수 있는 항체를 계란을 bioreactor로 사용해서 생산하고 분리된 항충치 IgY를 각종 식품류에 첨가하여 새로운 type의 식품을 개발함으로써 양계산업이 단순히 일차적인 산업에서 더나아가 고차원적인 항체생산 산업으로 전환 시에는 크게 각광 받을 수 있을 것이다. 또한 최근 생약재나 향신료의 추출물에서 충치균의 성장을 억제하는 물질의 검색에 관심을 모으고 있다⁽¹⁷⁻²⁰⁾. 본 연구는 면역화된 산란계로부터 생산된 계란 난황중에 들어있는 *S. mutans*균주의 specific IgY를 분리하여 현미경적 및 탁도측정에 의한 IgY의 항균력 효과를 검토하고자 실시하였다.

재료 및 방법

*S. mutans*의 specific IgY 생산

면역화된 IgY의 함유 계란을 생산하기 위하여 Hy-Line® Brown 28주령 산란계를 60수를 구입하여 사육하였으며 충치유발균으로 규명된 *S. mutans* 균주는 KCTC(생명공학연구소내 유전자은행)에서 동결건조된 *S. mutans* serotype C(KCTC No. 3300)를 구입하여 보관하며 사용하였다. 냉동 전조된 균주의 재생은 ample 을 70% 알코올로 소독하고 자른 다음 생리식염수를 0.5 mL 가한 후 멸균된 pasteur pipet으로 잘 섞었다. 현탁액은 평판배지에 도말하여 배양하였고 동시에 액체배양도 병행하였다. 면역화 방법으로는 Otake 등⁽⁸⁾의 방법으로 균주를 sucrose 5%를 첨가한 Brain-Heart Infusion(BHI) broth에 37°C, 24시간 혼기 배양하여 증균시켰으며 증균된 균주를 원심분리 및 균질화하여 산란계에 면역처리하였다.

IgY의 분리

면역화된 산란계로부터 생산된 계란에서 IgY의 분

리는⁽²¹⁻²²⁾ λ -carrageenan을 사용하여 난황을 같은 량(w/v)의 중류수와 함께 잘 섞은 후 수분간 방치하였다. 난황의 4배 분량(w/v)의 0.1% λ -carrageenan(Sigma)을 섞은 후 상온에서 30분간 방치한 다음 10,000×g로 15분간 원심분리하였고 수용성 단백질인 상등액을 Whatman #2 여과지로 여과하였다. 장기 보관을 위해 동결건조를 하였으며 이를 조난황 specific IgY라 하였다.

항균력 시험

면역화 여부의 *S. mutans*(serotype C) 균주에 대한 항균력 효과를 확인하기 위하여 면역처리구(A+)와 비면역처리구(A-)간의 비교시험을 조난황 specific IgY 농도 10% 및 20%의 두 가지 조건하에서 시행하였으며, 이 때 균수는 10^5 cfu/mL을 접종하여 실시하였다. IgY의 농도별 시험은 조난황 specific IgY 분말을 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%, 15.0% 및 20.0%가 되게 멸균 중류수에 녹인 후 membrane filter를 사용하여 여과 제거한 후 시험에 이용하였으며, 이때 접종된 균수는 10^5 cfu/mL이었다. 접종 균수별로는 균주를 0/mL, 10^2 cfu/mL, 10^5 cfu/mL, 10^8 cfu/mL으로 접종하였으며, IgY는 조난황 specific IgY 분말 10%를 사용하였다. 현미경적 관찰에서는 조난황 specific IgY 농도별, 균수별 및 면역화 여부에 따라 현미경(Olympus BH-2, Japan)을 이용 400배 배율로 시험판내에 들어있는 상등액과 침전물로 구분하여 검정하였다. 탁도변화에 의한 시험에서는 시험판에 회석된 균액 1 mL와 BHI-broth 9 mL를 넣고 37°C 혼기배양하면서 배양시간별로 시험판내의 상등액을 일정하게 취하여 double beam spectrophotometer(UVIDEC-610, JASCO)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 시간별로 측정하였다. 또한 plaque test는 멸균된 치아의 무게를 측정하고 2% sucrose BHI 배지에 넣은 후 *S. mutans* 균주 및 난황에서 추출한 조난황 *S. mutans* specific IgY를 농도별(0%, 5%, 10% 및 15%)로 첨가하였다. 48시간 배양 후 배지에서 치아를 꺼내어 무게를 측정하여 배양전과의 무게 차를 계산하여 plaque 형성력을 계산하였다. 균수측정은 평판배양법으로 BHI agar를 사용하여 37°C 혼기성 배양기에서 48시간 배양 후 접탁수를 세어 계산하였다.

결과 및 고찰

균 배양시간에 따른 탁도와 균수변화

S. mutans KCTC 3300(serotype C) 균주를 BHI broth에 접종한 후 배양시간별에 따른 탁도변화는 Fig.

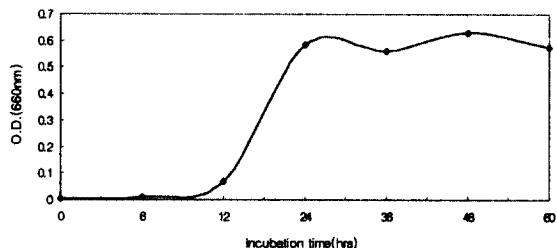


Fig. 1. Changes of turbidity of *S. mutans* cultures in BHI broth.

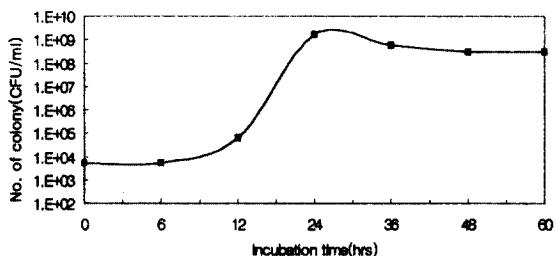


Fig. 2. Change of CFU of *S. mutans*.

1과 같다. 배양초기의 탁도는 0.004였으나 배양시간이 길어짐에 따라 탁도도 증가를 하여 배양 12시간 후부터 급격히 증가하였다. 배양 24시간 후에는 탁도가 0.584 ± 0.216 , 48시간 후에는 0.630 ± 0.022 까지 증가를 하였으나 48시간 후에는 더 이상 증가를 하지 않고 감소하는 경향을 나타내었다. 이때 군수변화(Fig. 2)도 탁도변화와 유사한 경향을 보여 배양 12시간에서부터 급격히 증가를 하며 24시간 후에는 1.6×10^9 cfu/mL, 48시간 후에는 3.0×10^8 cfu/mL까지 증가하였다.

면역화와 조난황 specific IgY의 항균력

면역화 여부에 따라 조난황 specific IgY의 효과를 현미경을 통해 검정한 결과 대조구에서는 상등액과 침전물에서 균들이 agglutination되지 않고 독립된 형태로 존재하였고, 면역을 하지않은 공시 닭에서 생산된 계란으로부터 추출한 일반 IgY를 10% 첨가구에서도 대조구와 유사한 균 형태를 나타내었다. 그러나 *S. mutans*를 면역처리한 닭에서 생산된 계란으로부터 추출한 IgY를 10% 첨가한 처리구는 상등액과 침전물에서 균들 대부분이 응집되는 것을 현미경을 통해 관찰할 수 있었다. Takashi⁽²³⁾등은 난황에서 분리한 anti-*E. coli* IgY의 응집성을 *in vitro*로 시험한 결과 균들이 aggregation 되었다고 하였으며 또한 anti-*E. coli* IgY 존재하에서는 그 균들의 성장이 억제되었다고 보고하는 것과 일치하였다. Baek⁽²⁴⁾의 논문에서는 특이항체에

Fig. 3. Effects of crude IgY on the growth of *S. mutans* (A+20: 20% IgY from vaccinated, A-20: 20% IgY from not-vaccinated, A+10: 10% IgY from vaccinated, A-10: 10% IgY from not-vaccinated).

의한 항원의 응집반응을 조사한 결과 면역되지 않은 계란 항체는 응집을 일으키지 않는 반면 *Vibrio parahaemolyticus*의 특이항체는 매우 높은 응집반응을 나타내었다고 보고하였다. 따라서 면역시키지 않고 생산된 일반 IgY를 첨가한 처리구 보다 면역시킨 후 IgY를 첨가한 처리구들이 *S. mutans*균들이 agglutination되는 정도가 확실한 효과를 나타내었으며 이러한 균의 성장억제는 IgY 존재에 의해 세균이 강하게 응집되어 세포분열 및 성장이 방해받은 것으로 사료되었다. Fig. 3는 면역화에 따른 탁도의 변화를 본 것으로 조난황 specific IgY를 10%, 20%의 IgY첨가구 모두에서 효과가 있었다. 외관상 면역처리한 A+처리구의 상등액의 탁도가 면역을 하지 않은 A-처리구 보다 현저하게 투명하였다. 따라서 면역처리를 한 것이 탁도에 있어서 월등한 효과를 나타내었다.

조난황 specific IgY 농도별에 대한 항균력

면역화에 의한 조난황 specific IgY가 *S. mutans* 균에 대해 항균력의 효과가 있었으므로 농도 결정을 위해 시험한 결과 배양 24시간 후에 처리구간 침전물의 형태적 관찰에서는 IgY농도 2.5%(Fig. 4a)는 균체가 agglutination되지 않고 각각의 독립적인 형태를 유지하고 있었으며 IgY 5%(Fig. 4b)와 7.5% 첨가구에서는 전반적으로 균체들의 응집현상이 나타났다. 또한 IgY 10%(Fig. 4c)와 20% 첨가구에서는 더욱 더 균들이 agglutination되는 것을 현미경을 통해 확인할 수 있었다. 이런 응집반응은 세균, 적혈구와 같은 일정한 크기를 가진 항원입자가 그 항체와 반응하여 응집괴를 만드는 현상으로 세균세포에서는 응집원으로 될 수 있

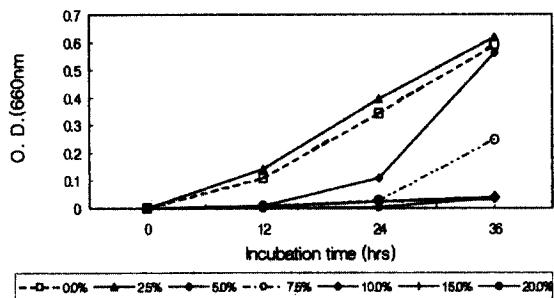


Fig. 5. Changes of turbidity of *S. mutans* culture on the addition of crude IgY.

Fig. 6. Effects of crude IgY addition on the growth of *S. mutans* during 24hr incubation.

Fig. 4. (a) Photomicrograph of *S. mutans* in sediment of BHI broth which was treated by 2.5% of crude specific IgY against *S. mutans*, (b) Photomicrograph of *S. mutans* in sediment of BHI broth which was treated by 5.0% of crude specific IgY against *S. mutans*, (c) Photomicrograph of *S. mutans* in sediment of BHI broth which was treated by 10.0% of crude specific IgY against *S. mutans*.

는 물질은 단일한 것이 아니고 여러 가지 항원의 집합체로 구성되어 있으며 각 항원은 서로 질적 차이가 있기 때문에 항체도 각각 별개의 반응을 나타낸다. 따라서 IgY 농도가 증가할수록 응집된 균괴의 크기가 더

커져가는 현상을 나타내었으며 이런 응집반응은 첨가되는 IgY의 농도에 의해 영향하는 것을 알 수 있었다. 탁도 변화(Fig. 5 및 Fig. 6)는 배양 12시간 후 대조구 및 2.5%첨가구가 0.11~0.14였으며 조난황 specific IgY 5%이상 첨가구에서는 탁도변화가 없었다. 배양 24시간 후에도 대조구와 IgY 2.5%첨가구는 같은 경향으로 증가를 하였으며 이때 탁도는 0.3~0.4의 범위였다. 또한 IgY 5.0% 첨가구도 0.1 정도까지 증가하는 경향을 보여 초반 증식이 억제되지 않았던 균들이 서서히 성장하고 있는 것을 알 수 있었다. 그러나 7.5% 이상에서는 24시간 후에도 탁도의 변화가 거의 없었다. 배양 36시간에는 7.5% 첨가구도 증가하는 경향을 보였으며 10%이상 첨가구에서는 배양 36시간까지도 배양 초기와 차이가 없이 우수한 효과를 보였다.

균수별에 따른 specific IgY의 항균력

균수별에 따른 시험에서는 균수를 $0/\text{mL}$, $5.4 \times 10^2 \text{ cfu/mL}$, $5.4 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$, $5.4 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$ 로 접종하였다. 10^2 cfu/mL 이 접종되고 10% IgY가 첨가된 처리구의 침전물을 관찰 시 균 형태의 변화는 대조구와 같

10²접종구에서는 0.572까지 탁도가 증가하였으며 10⁸접종구는 0.566으로 배양 1일째 보다 오히려 낮아졌다. 그러나 10% 첨가구에서는 10²접종구에서는 탁도가 0.063이었으며 10⁸접종구는 0.009로 균수에 따른 차이를 볼 수 없었다. 그러나 0%와 비교를 하면 IgY 첨가에 의한 효과가 10배 이상의 효과를 나타내었다.

Plaque 형성력

탁도 측정방법에 의해 부착력 시험에서 효과가 입증되어 치아에 직접 plaque 형성에 대한 시험을 실시하였다. 그 결과 Table 2에 나타낸 바와 같이 IgY를 첨가하지 않은 대조군의 plaque 형성력을 100%로 하여 기준할 때 IgY 첨가에 따라 plaque 형성력을 감소하는 경향을 보였으며 IgY 농도 15%에서는 plaque 형성이 약 75%가 저해되었다. 이런 결과는 Hatta 등⁽¹³⁾이 일본에서 mouth rinse를 통해 면역화된 IgY가 침가되어 rinse한 처리구의 plaque 형성력이 감소하는 경향을 보였다는 결과와 유사하였다. 따라서 면역화된 닦으로부터 생산된 계란에서 추출된 crude IgY를 사용하여 S. mutans균으로부터 발생된 충치를 예방할 수 있을 것으로 사료되었다.

요약

본 연구는 면역화된 산란계로부터 생산된 계란 난황중에 들어있는 S. mutans균주의 specific IgY를 분리하여 면역화 여부, Specific IgY 농도별 및 균수별에 따른 항균력을 현미경적 및 탁도측정에 의한 IgY의 항균력 효과를 검토하고자 실시하였다. 면역화 여부에 따른 탁도시험 결과 면역처리된 처리구에 crude IgY를 10%와 20% 첨가에 의해 항균 효과가 있었다. 면역을 하지 않은 닦에서 생산된 계란으로부터 추출한 IgY를

Fig. 7. Photomicrograph of S. mutans in sediment of BHI broth with 10% specific IgY where S. mutans was inoculated by 10⁵ cfu/mL cell.

이 모든 균들이 독립된 형태로 존재하였고 agglutination이 되지 않았다. 10⁵ cfu/mL 접종구에서는 균체들이 매우 크게 응집되는 것을 나타내었으며 10⁸ cfu/mL 접종구는 더욱 더 agglutination 되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 현미경을 통한 관찰에서는 균들이 많을수록 IgY첨가에 의해 균체들이 많은 응집반응을 나타내었다(Fig. 7). 탁도에서는 Table 1에서 보는바와 같이 배양 24시간 후 탁도에서는 0% IgY첨가구의 경우 10²접종구에서는 -0.009였으나 10⁸접종구는 0.611로 탁도가 매우 높게 나타나 균들이 많이 성장하였음을 알 수 있었다. 반면에 10% IgY첨가구는 배양 24시간 후 대조구 및 10²접종구에서는 -0.009였으며 10⁸접종구는 0.169로 10⁸접종구가 10²접종구보다는 탁도가 높게 나타났지만 0%의 첨가구에 비해서는 현저하게 탁도가 낮게 나타났다. 균들이 성장이 억제되어 낮게 나타났다고 할 수 있으며 이는 IgY의 첨가에 의한 효과라고 할 수 있겠다. 배양 48시간에는 0% IgY첨가구의 경우

Table 1. Changes of turbidity of S. mutans culture inoculated with 0% and 10% crude IgY

Items Times(hrs)	IgY Conc.	0%			10%		
		10 ² cfu/mL	10 ⁵ cfu/mL	10 ⁸ cfu/mL	10 ² cfu/mL	10 ⁵ cfu/mL	10 ⁸ cfu/mL
Turbidity	24	-0.009	0.170	0.611	-0.009	0.010	0.169
	48	0.572	0.630	0.566	0.063	0.066	0.090

Table 2. Comparison of plaque formation on teeth treated with specific concentration of IgY

Conc. of IgY	Tooth weight (g)		Difference(A-B)	Plaque(%)
	Before Incubation(A)	After Incubation(B)		
0%	0.4105	0.4294	18.9 mg	100.0
5%	0.3908	0.4113	20.5 mg	108.5
10%	0.4056	0.4236	18.0 mg	95.2
15%	0.4194	0.4239	4.5 mg	23.8

10% 첨가구와 대조구에서는 응집반응을 나타내지 않았다. 그러나 *S. mutans*로 면역화된 닭에서 생산된 계란에서 추출한 IgY의 10%첨가구는 상동액과 침전물에서는 균들이 응집되는 현상을 보였다. 면역화된 조난황 specific IgY를 첨가한 처리구가 대조구 보다 *S. mutans*균들이 응집되는 정도에 있어서 확실한 효과를 나타내었다. 조난황 specific IgY의 농도별 시험에서는 5%이상 첨가구 들에서는 전반적으로 균체들의 응집현상이 나타났으며 IgY를 2.5% 이하로 첨가한 처리구에는 확연한 차이를 보였다. 탁도에 있어서도 조난황 specific IgY 농도별 시험에서는 첨가농도에 따라 차이가 있었지만 10% 이상 첨가구에서는 탁월한 효과를 나타내었다. 응집된 균괴의 크기는 IgY첨가량이 증가할수록 점점 더 커져가는 현상을 나타내었다. 균수별에서는 10^5 cfu/mL 이상 접종구에서는 균체들이 응집되는 현상을 보였으며 균수가 많을수록 더욱 응집되는 현상을 나타내었다. Plaque 형성력은 감소하는 경향을 보였으며 IgY 농도 15%에서는 plaque 형성이 약 75%가 저해되었다. 따라서 면역화된 닭으로부터 생산된 계란에서 추출된 crude IgY를 사용하여 *S. mutans* 균으로부터 발생된 충치를 예방할 수 있을 것으로 사료되었다.

문 헌

- Patterson, R., Younger, J.S., Weigle, W.O. and Dixon, F.J. 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)
- Han, S.H., Choi, S.H., Lee, S.B., Ko, T.S. and Jang, M.J. Studies on the Production and Properties of IgY Antibody in Hen Egg Yolk. *Korean J. Food sci. Ani. Res.* 16: 85-88 (1996)
- Bartz, C.R., Conklin, R.H., Tunstall, C.B. and Steele, J.H. Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. *J. Infect. Dis.* 142(3): 439-441 (1980)
- Ebina, T., Sato, A., Umeju, K., Ishida, N., Ohyama, S., Oizumi, A., Aikawa, K., Katagiri, S., Katsushima, N., Imai, A., Kitaoka, S., Suzuki, H. and Konno, T. Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing anti-human rotavirus antibody. *Med. Microbiol. Immunol.* 174: 177-185 (1985)
- Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M. and Yamamoto, T. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(7): 1077-1081 (1993b)
- Otani, H., Matsumoto, K., Saeki, A. and Hosono, A. Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 24: 152-158 (1991)
- 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*. *Infection and Immunity* 59(11): 4161-4167 (1991)
- Otake, S., Nishihara, Y., Makimura, M., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T. and Hirasawa, M. Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody(IgY). *J. Dent. Res.* 70(3): 162-166 (1991)
- Ma J.K.C., Smith, R. and Lehner, T. Use of monoclonal antibodies in local immunization to prevent colonization of human teeth by *streptococcus mutans*. *Infection and Immunity* 55: 1274-1278 (1987)
- Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M. and Yamamoto, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(3): 450-454 (1993a)
- Jensenius, J.C., Anderson, I., Hau, J., Crone, H.M. and Koch, C. Eggs; Conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods* 46: 63-68 (1981)
- Hamada, S., and Slade, H.D. Biology, immunology, and cariogenicity of *streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* 44(2): 331-384 (1980)
- Hatta, H., Tsuda, K., Ozeki, M., Kim, M., Yamamoto, T., Otake, S., Hirasawa, M., Katz, J., Childers, N.K. and Michalek, S.M. Passive Immunization against dental plaque formation in humans : Effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies(IgY) specific to *S. mutans*. *Caries Res.* 31: 268-274 (1997)
- Olsson, J. and Krasse, B. A method for studing adherence of oral streptococci to solid surfaces. *Scand. J. Dent. Res.* 8: 20-28 (1976)
- Koga, T., Okahashi, N., Asakawa, H. and Hamada, S. Adherence of *S. mutans* to tooth surfaces. In *Molecular Microbiology and Immunobiology of Streptococcus mutans*. Elsevier Science Pub. 111-120 (1986)
- Orstvik, D., Kraus, F.W. and Henshaw, C. In vitro attachment of Streptococci to the tooth surface. *Infection and Immunity* 5: 794-800 (1974)
- Kozai, K., Miyake, Y., Kohda, H., Kamataka, S., Yamasaki, K., Suginaka, H. and Nagasaka, K. Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic acid and urosonic acid. *Caries Res.* 21(2): 104-108 (1987)
- Namba, T., Tsunezuka, M., Hattori, M., Kadota, S. and Kikuchi, T. Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines screening of crude drugs for inhibitory action on plaque formation. *Proc. Symp. WAKAN-YAKU*. 15: 179-186 (1982)
- Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M. and Yamamoto, T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*. *Agr. Biol. Chem.* 53(9): 2307-2311 (1989)
- You, Y. S., Park, K. M. and Kim, Y. B. Antimicrobial

- Activity of Some Medical Herbs and Spices against *Streptococcus mutans*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21(2), 187-191 (1993)
21. Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". Agric. Biol. Chem. 54(10): 2531-2535 (1990)
22. Rho, J.H., Kim, Y.B., Han, C.K., Lee, N.H., Sung, K.S. and Shon, D.H.: The effect of age of Hens and vaccination on anti-*Streptococcus mutans* specific IgY level in eggs. Korean J. Anim. Sci. 41(5): 563-574 (1999).
23. Takashi, T., Kenji, T., Kouji, S. and Shigeo, F. Separation of anti-E.coli IgY, water soluble proteins from egg yolk and its specificity against *E. coli*. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 42(4): 225-229 (1995)
24. Baek, B.S. Productivity, properties and antimicrobial activity of egg yolk antibody(IgY) against food poisoning bacteria. A master's thesis. Graduate school Kyungsan University (1999)

(2000년 4월 24일 접수)