

## In Vitro 소화시 IgY 항체 활성의 안전성에 대한 계란 성분의 효과

이 승 배 · 최 석 호  
상지대학교 응용동물과학부

### Effect of Egg Component on Stability of IgY Antibody Activity to In Vitro Digestion

S. B. Lee and S. H. Choi

Division of Applied Animal Sciences, Sangji University

#### Abstract

The stability of anti-*Y. ruckeri* IgY activity during *in vitro* digestion of the IgY after addition of egg component was investigated using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Though heavy chain and light chain of anti-*Y. ruckeri* IgY were partially hydrolyzed during *in vitro* digestion with pepsin for 2hr after addition of egg fractions(egg yolk and egg white), they were clearly seen in SDS-PAGE. The anti-*Y. ruckeri* IgY activities after digestion of the mixtures containing egg yolk and egg white were 35% and 61% in ELISA, respectively. SDS-PAGE showed that the heavy chain of anti-*Y. ruckeri* IgY disappeared after digestion with pepsin for 1hr of the mixtures containing egg white components (ovalbumin, ovomucin, lysozyme and ovomucoid), but it was seen in the mixture containing ovotransferrin. The light chain of anti-*Y. ruckeri* IgY was not seen in the mixture containing ovomucin and ovomucoid, but was seen in the mixtures containing ovalbumin, ovotransferrin and lysozyme after digestion with pepsin for 1hr. The light chain of anti-*Y. ruckeri* IgY was clearly seen in the mixtures containing ovotransferrin and lysozyme even after digestion for 2hr. Among digestion with pepsin for 1hr of the mixtures containing egg white components(ovalbumin, ovomucin, lysozyme, ovomucoid and ovotransferrin), the anti-*Y. ruckeri* IgY activities were found only in the mixtures containing ovotransferrin and were 38%, and 15% in ELISA after digestion for 1hr and 2hr, respectively. After digestion with stomach extract from rainbow trout for 2hr the anti-*Y. ruckeri* IgY activities were 14% and 69% in the mixtures containing egg white and whole egg, respectively.

Key words : *in vitro* digestion, anti-*Y. ruckeri* IgY, egg, SDS-PAGE, ELISA.

#### 서 론

토끼, 쥐 및 염소 등과 같은 포유동물을 면역시킨 후 혈청으로부터 분리한 항원특이성 항체가 생물학적 연구 및 진단 분야에 폭넓게 사용되어 왔다. 항체의 중요한 적용 분야 중에는 세균이나 바이러스에 의한 장관 감염성 질환을 막기 위해 병원성 미생물에 대해 생산한 특이성 항체를 구강으로 섭취시키는 수동면역 요법이 있다. 이 수동면역 요법을 실시하기 위해서

는 많은 양의 항체를 필요로 하나 토끼, 쥐, 염소 등에서 채혈을 통해 다량의 항체를 얻기는 어려움이 많다. 최근 산란계에 특이 항원을 면역시키면 기술적으로 혈액 채취없이 계란으로부터 항원특이성 IgY 항체를 얻을 수 있고 산란계는 대량생산이 가능하므로 많은 양의 항체를 생산 분리할 수 있다<sup>(1~4)</sup>. 질병 감염을 막기 위해 계란으로부터 분리한 IgY 항체를 구강을 통해 수동 면역시킨 연구를 보면 *Streptococcus mutans*에 의한 충치<sup>(5~6)</sup>, 돼지의 *Escherichia coli*에 의한 설사<sup>(7)</sup>, rotavirus에 의한 설사<sup>(8,9)</sup>, 뱀장어에 *Edwardsiella tarda*에 의한 Edwardsiellosis 증<sup>(10)</sup> 등이 있다. IgY 항체는 pH 2정도의 낮은 산도와 펩신이 존재시 급속

Corresponding author : S. B. Lee, Division of Applied Animal Sciences, Sangji Uni., Wonju city 220-702, Korea. E-mail : sblee@mail.sangji.ac.kr

히 분해되며, pH 4이하의 산도에서는 급속히 IgY 항체 활성이 떨어진다고 Shimizu 등<sup>(11)</sup>과 Otani 등<sup>(12)</sup>이 보고하고 있다. Lee 등<sup>(13)</sup>에 의하면 무지개송어는 사료섭취 직후 pH가 4.5~5.0이나 30분 후에는 2.6~3.0으로 떨어지며, 그 후 2시간까지는 낮은 pH를 유지하므로 무지개송어가 IgY 항체를 섭취 2시간 후에는 IgY 항체 활성이 거의 없는 것으로 보고하고 있다. 그러므로 IgY 항체를 수동면역시 구강을 통해 위를 통과하게 되므로 위의 낮은 pH나 펩신으로부터 IgY 항체 활성을 유지시키기가 어려우므로 이런 문제점을 해결하는 연구가 필요한 실정이다. 본 연구에서 IgY는 계란의 난황으로부터 분리한 성분이므로 계란의 난황, 전란 및 난백성분이 *in vitro* 소화시 IgY항체 활성을 얼마나 유지시켜 주는가를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

Anti-*Yersinia ruckeri* IgY는 Lee 등<sup>(13)</sup>의 방법에 따라 *Y. ruckeri* 균주를 사용하여 닭에 면역시킨 다음 생산된 계란으로부터 Akita와 Nakai<sup>(14)</sup>의 방법으로 lipoprotein을 침전시킨 후 수용성 분획에서 분리한 다음 동결 건조한 후 사용하였다.

동결건조된 anti-*Yersinia ruckeri* IgY을 증류수에 ml당 10mg을 녹인 후에 전란, 난황 및 난백은 1ml로 사용하고, 캐나다 Guelph 대학 식품학과 Mine 박사로부터 얻은 Ovomucin과 Ovalbumin(Sigma), Ovomuroid(Sigma), Lysozyme(Sigma) 및 Ovotransferrin(Sigma)은 각각 100mg/ml로 섞어서 사용하였다.

### *in vitro* 소화

*in vitro* 소화는 Shimizu 등<sup>(11)</sup>방법을 응용하여 돼지위장점막에서 분리된 펩신(Sigma)을 1:80(w/w)의 비율로 시료에 넣은 후 1N HCl 가지고 pH 2로 조절한 다음 37°C에서 2시간 동안 반응시키면서 각 반응 후 즉시 2M Tris로 중화시켜 펩신 활성을 억제시킨 다음 잔존하는 anti-*Yersinia ruckeri* IgY 항체 활성을 ELISA 방법으로 측정하였다. 무지개송어(Rainbow trout)의 위액을 추출하기 위해 무지개송어로 부터 분리한 위에 0.05M sodium acetate buffer

(pH 2) 10ml을 섞은 다음 homogenize한 후 6,000×g 원심분리시켜 얻은 상등액을 1N HCl을 가지고 pH를 2.0으로 조정하여 위 추출액으로 사용하였다. 위 추출액 1ml에 전란과 난백 시료 1ml을 각각 섞어서 37°C에서 2시간동안 반응시키면서 각 반응 후 즉시 2M Tris로 중화시킨 다음 잔존하는 anti-*Yersinia ruckeri* IgY 항체 활성을 ELISA 방법으로 측정하였다.

### Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

난황항체의 활성은 PBS buffer(0.12M phosphate, 0.04M NaCl, pH 7.2)로 *Y. ruckeri*를 10<sup>8</sup>/ml의 농도로 희석한 후 96 well polystyrene plate(Corning Costar)에 100μl씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하여 coating 하였다. PBS-T(0.05% Tween 20)로 세 번 세척한 후 2% Bovine serum albumin(BSA, Sigma)이 포함된 PBS-T를 150μl씩 넣고 37°C에서 2시간 반응시킨 후 PBS-T로 상기와 같은 방법으로 세척하였다. 적절히 희석한 시료를 100μl씩 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 다시 PBS-T로 세척하였다. alkaline phosphatase(Sigma)가 결합된 이차 항체인 rabbit anti-chicken IgG(Sigma)용액을 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 기질용액(p-nitrophenyl phosphate, 1mg/ml diethanolamine buffer, pH 9.8; Sigma) 용액을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 3N NaOH를 50μl씩 사용하여 반응을 정지시킨 다음 405nm의 파장에서 ELISA reader(BIO-RAD, Model 550, USA)로 각 well의 흡광도를 측정하여 ELISA value로 나타내었다.

### 전기영동

Polyacrylamide gel electrophoresis 실험은 Laemmli<sup>(15)</sup>의 방법에 따라 실시하였다. Separating gel은 12% acrylamide, stacking gel은 4% acrylamide로 제조된 1mm 두께의 slab gel을 사용하였다. 단백질 염색은 0.05%(w/v) coomassie blue R 250 염색액을 사용하였으며, 탈색은 7% acetic acid와 30% methanol이 함유된 탈색액을 사용하였다.

## 결 과

산란계에 *Y. ruckeri* whole cell을 면역주사하여 생산된 계란으로부터 분리한 anti-*Y. ruckeri* IgY항체에 계란의 난황과 난백을 혼합시킨 후 펩신에 의해 소화된 단백질 성분을 SDS-PAGE로 전기영동한 형태를 Fig. 1과 2

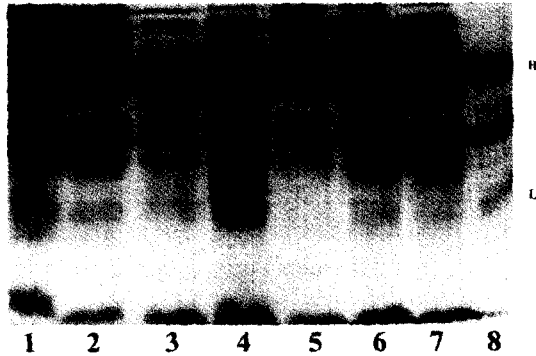


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of the mixture of IgY and egg yolk after digestion with pepsin (E/S ratio ; 1/80, w/w) for 2hr at 37°C. 1 : mixture of IgY and egg yolk, 2~4 : mixture of IgY and egg yolk after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively, 5~7 : egg yolk after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively, 8 : crude IgY, heavy chain(H), light chain(L).

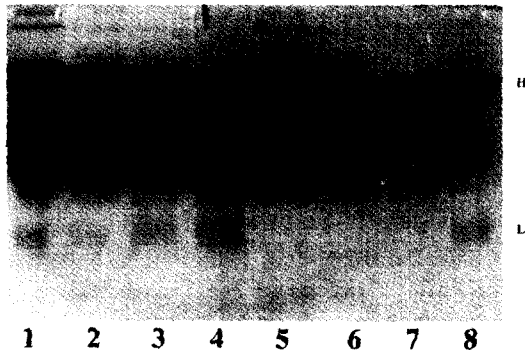


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of the mixture of IgY and egg white after digestion with pepsin (E/S ratio ; 1/80, w/w) for 2hr at 37°C. 1 : mixture of IgY and egg white, 2~4 : mixture of IgY and egg white after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively, 5~7 : egg white after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively, 8 : crude IgY, heavy chain(H), light chain(L).

에 나타내었다. 분리된 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체를 Fig. 1의 lane 8에서 보면 heavy chain과 light chain을 볼 수 있고 중간에 나타난 밴드는 Lee 등<sup>(13)</sup>에 의하면 분자량이 35,000인  $\beta$ -livetinin로 본 실험의 결과와도 일치하는 것을 알 수 있으며 분리된 IgY항체의 순도는 약 80% 정도로 나타났다. 난황과 anti-*Y. ruckeri* IgY항체가 혼합된 후 펩신에 의해 소화된 형태 (Fig. 1)에서 lane 2와 6을 비교해 보면 lane 2에서는 원래 난황에 존재하는 IgY와 혼합된 anti-*Y. ruckeri* IgY가 공존하므로 heavy chain과 light chain의 밴드가 난황만 있는 lane 6에 비해 두껍게 나타났다. 펩신 소화 2시간 후에는 heavy chain과 light chain이 부분적으로 분해는 되지만 어느 정도 밴드가 존재하는 것을 볼 수 있다. 난백과 혼합된 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체를 펩신에 의해 소화된 형태를 나타낸 Fig. 2의 경우에는 난백과 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체가 존재하는 Lane 2와 난백만 존재하는 lane 5를 비교해 보면 lane 5에는 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체의 heavy chain과 light chain이 없는 것을 볼 수 있다. 펩신 소화 2시간까지도 약간의 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체가 분해되었지만 heavy chain과 light chain이 존재하는 것을 볼 수 있다. 이런 결과는 Shimiz 등<sup>(11)</sup>이 IgY 항체만 가지고 펩신으로 소화시킨 후 SDS-PAGE로 조사한 결과 pH 2에서 거의 항체의 단백질이 분해되어 밴드가 없는 것으로 보고하고 있는 점과 비교해 보면 난백과 혼합된 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체가 상당히 분해되지 않은 사실은 매우 의의가 있다고 생각된다.

난황과 난백을 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체에 혼합한 후 펩신을 가지고 소화시 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체의 활성을 알아보기 위해 ELISA로 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 2시간 후 보면 난백을 첨가한 것의 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체의 활성은 61%를 유지하고 있는 것에 비해 난황을 첨가한 군에서는 35%정도로 낮게 유지하는 것을 알 수 있었다. 이런 결과는 난백이 펩신 소화시 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체의 활성을 상당히 유지시켜 주는 것으로 생각되므로 난백 중 어떤 성분이 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체 형태를 유지시켜 주는지를 조사하기 위해 오보알부민, 오보뮤우신, 라이소자임, 오보트란스웨린 및 오보뮤코이드를 anti-*Y. ruckeri* IgY 항

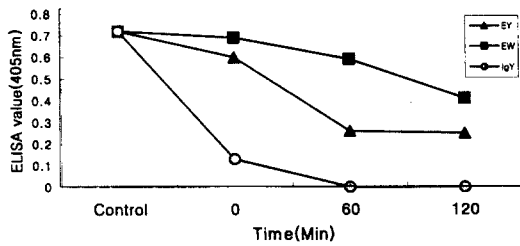


Fig. 3. Effect of egg yolk and egg white on antibody stability of anti-*Yersinia ruckeri* IgY during digestion with pepsin at 1:80 ratio(w/w) for 2h at 37°C. Stability of anti-*Y. ruckeri* IgY was measured by ELISA using the whole cells as an antigen. EY: egg yolk + IgY, EW : egg white + IgY.

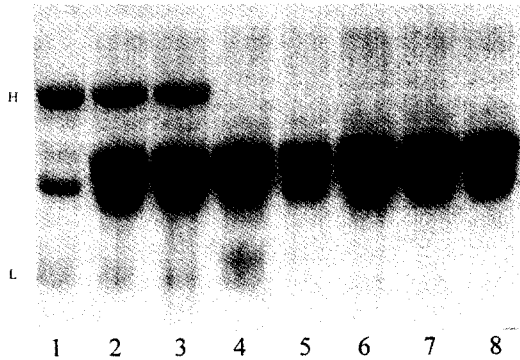


Fig. 4. SDS-PAGE pattern of the mixture of IgY and ovalbumin after digestion with pepsin (E/S ratio ; 1/80, w/w) for 2hr at 37°C. 1 : crude IgY heavy chain(H), light chain(L), 2 : mixture of IgY and ovalbumin, 3~5 : mixture of IgY and ovalbumin after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively, 6~8 : ovalbumin after digestion for 0hr, 1hr, and 2hr, respectively.

체와 혼합한 후 펩신에 의해 소화된 단백질 성분을 SDS-PAGE로 전기영동한 형태로 Fig. 4~8에 나타내었다. Anti-*Y. ruckeri* IgY 항체와 오보알부민, 오보뮤우신, 라이소자임, 오보뮤코이드를 혼합 후 펩신으로 소화시킨 경우 1시간 후에는 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체의 heavy chain의 밴드가 완전히 소실되는 것을 볼 수 있으나 오보트란스헤린(Fig. 7)의 경우 항체의 heavy chain 밴드를 어느 정도 볼 수 있는 형태

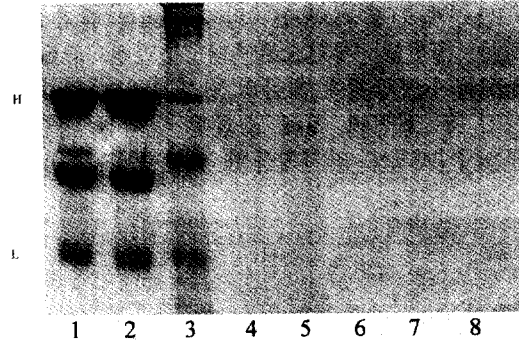


Fig. 5. SDS-PAGE pattern of the mixture of IgY and ovomucin after digestion with pepsin (E/S ratio ; 1/80, w/w) for 2hr at 37°C. 1 : crude IgY, heavy chain(H), light chain(L), 2 : mixture of IgY and ovomucin, 3~5 : mixture of IgY and ovomucin after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively, 6~8 : ovomucin after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively.

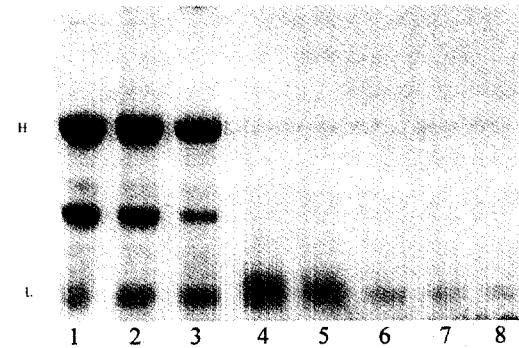


Fig. 6. SDS-PAGE pattern of the mixture of IgY and lysozyme after digestion with pepsin (E/S ratio ; 1/80, w/w) for 2hr at 37°C. 1 : crude IgY, heavy chain(H), light chain(L), 2 : mixture of IgY and lysozyme, 3~5 : mixture of IgY and lysozyme after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively, 6~8 : lysozyme after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively.

로 나타났으며, Anti-*Y. ruckeri* IgY 항체의 light chain의 경우 오보뮤우신(Fig. 5)과 오보뮤코이드(Fig. 8)가 혼합되어 펩신으로 소화시킨 경우 1시간 후에 밴드를 거의 볼 수 없었으

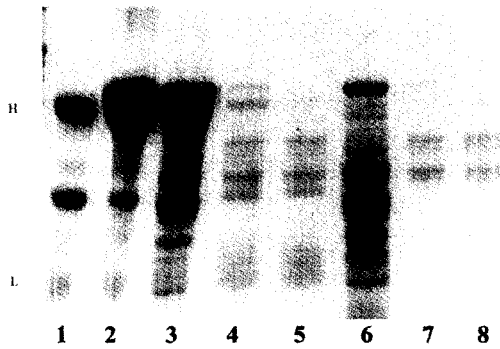


Fig. 7. SDS-PAGE pattern of the mixture of IgY and ovotransferrin after digestion with pepsin(E/S ratio ; 1/80, w/w) for 2hr at 37°C. 1 : crude IgY, heavy chain(H), light chain (L), 2 : mixture of IgY and ovotransferrin, 3~5 : mixture of IgY and ovotransferrin after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively, 6~8 : ovotransferrin after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively.

나 오보알부민(Fig. 4.), 오보트란스페린(Fig. 7) 및 라이소자임(Fig. 6)이 혼합된 시료에서는 밴드를 관찰할 수 있었다. 특히, 라이소자임(Fig. 6) 및 오보트란스페린(Fig. 7)이 혼합된 경우 펩신 소화 2시간 후에도 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체의 light 밴드가 관찰되었다. 펩신 소화시 난백 단백질이 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체의 활성을 안정화 시키는 정도를 ELISA로 조사한 결과를 나타낸 Fig. 9를 보면 오보알부민, 오보뮤우신, 라이소자임 및 오보뮤코이드와 혼합된 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체는 펩신 소화 후 1시간 내에 항체 활성이 소실되는 것으로 나타난 반면 오보트란스페린은 38% 정도의 활성을 유지하는 것으로 나타났고 2시간 후에도 15% 정도까지 유지하는 것을 볼 수 있었다.

Fig. 10은 무지개송어의 위에서 추출한 소화액을 이용하여 난백 및 전란을 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체와 섞은 시료를 37°C에서 *in vitro* 소화시험을 한 후 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체의 활성을 ELISA로 측정할 결과를 나타낸 것으로 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체만은 소화액과 섞은 직후 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체의 활성이 18%로 떨어지는 반면 난백과 전란을 혼합한 것은 각각 96%와 97%의 활성을 보여주었으며, 1시

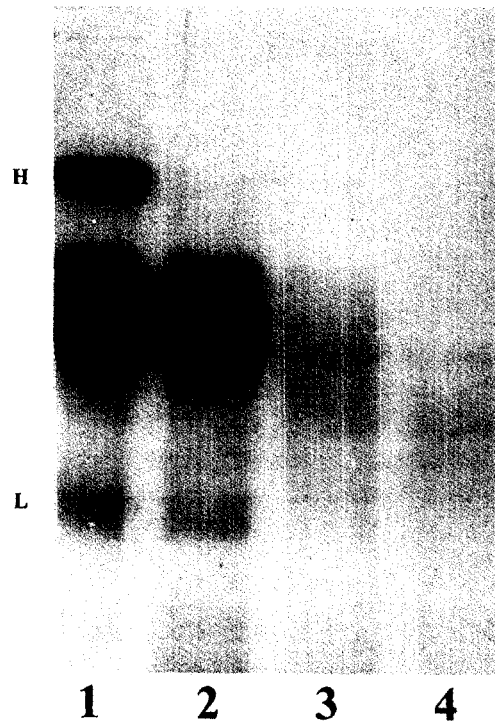


Fig. 8. SDS-PAGE pattern of the mixture of IgY and ovomucoid after digestion with pepsin(E/S ratio ; 1/80, w/w) for 2hr at 37°C. 1 : mixture of IgY and ovomucoid; heavy chain(H), light chain(L), 2~4 : mixture of IgY and ovomucoid after digestion for 0hr, 1hr and 2hr, respectively.

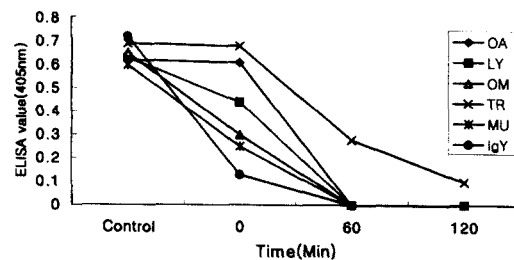


Fig. 9. Effect of egg white component on antibody stability of anti-*Yersinia ruckeri* IgY during digestion with pepsin at 1:30 ratio(w/w) for 2h at 37°C. Stability of anti-*Y. ruckeri* IgY was measured by ELISA using the whole cells as an antigen. OA : ovalbumin+IgY, LY : lysozyme+IgY, OM : ovomucoid+IgY, TR : ovotransferrin+IgY, MU : ovomucin+IgY.

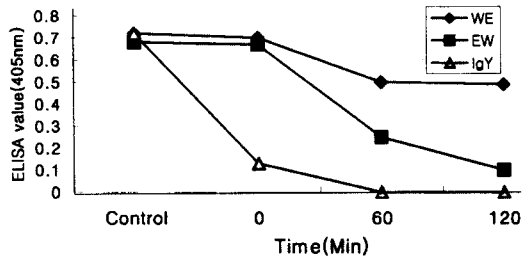


Fig. 10. Effect of whole egg and egg white on antibody stability of anti-*Yersinia ruckeri* IgY during digestion with rainbow trout stomach extract (adjusted pH 2.0 with 1M HCl) for 2h at 37°C. Stability of anti-*Y. ruckeri* IgY was measured by ELISA using the whole cells as an antigen. WE : whole egg+IgY, EW : egg white+IgY.

간 소화 후에 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체만은 활력이 거의 없는 것에 비해 난백과 전란은 혼합한 것은 각각 35%와 69%의 활력을 보여주었다. 특히, 소화 2시간 후에는 난백을 혼합한 것은 14%로 활력이 감소한 반면 전란을 혼합한 것은 68%로 매우 높은 활력을 유지하는 것으로 나타났다.

## 고 찰

IgY를 구강으로 투여시 문제되는 것은 위의 낮은 pH와 펩신의 영향을 받아 IgY 항체 활성을 잃어버리는 것이 문제이다<sup>(11)</sup>. 본 실험에서는 계란의 성분인 난황, 난백이 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체를 펩신 소화시 얼마나 활성을 보호해주는가를 ELISA로 조사한 결과(Fig. 3)에서 난백이 난황보다 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체의 활성을 더 보호해 주는 것으로 나타나서, 난백 성분이 IgY 활성유지에 어떠한 영향을 미치는가를 보기 위해 오보알부민, 오보뮤우신, 라이소자임, 오보트란스웨린, 및 오보뮤코이드와 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체를 혼합한 후 펩신으로 소화시킨 결과를 보면(Fig. 9) 다른 난백 성분에 비해 오보트란스웨린이 미약하나마 어느 정도 IgY항체의 활력을 유지시켜 주는 것을 볼 수 있다. 그러므로 난백이 IgY항체활성을 펩신 소화로부터 유지시켜 주는데 제일 관여하는 단백질은 오보트란스웨린이라고 생각되나 Fig. 3

에서 보면 오보트란스웨린 단독보다 난백 단백질이 공동으로 IgY 항체를 활력을 유지시켜준다고 볼 수 있다. Shimizu 등<sup>(16)</sup>에 의하면 실험이 IgY 항체를 안정화 시키는데 영향 미치는 것은 아직까지 그 기작은 확실하지 않으나 IgY 항체의 구조를 약간 변형시켜서 안정화에 영향을 주는 것이라고 보고한 점에 비추어 보면 당단백질인 오보트란스웨린의 당부분이 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체 활성을 보호하는데 약간에 영향을 준 것으로 생각된다.

전란과 난백을 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체와 혼합한 것을 무지개송어의 위 추출액으로 소화시킨 경우 난백보다 전란이 IgY 항체 활성을 안정화시키는데 영향을 준 것으로 나타났다. 이런 점은 난황과 난백을 혼합된 전란이 IgY 항체를 소화효소로부터 더욱 보호해 준다는 사실로 매우 의미 있는 것으로 사료된다.

일반적인 모든 계란은 IgY 항체를 갖고 있고, 식품으로 많이 섭취하고 있으므로 수동면역요법을 위해 IgY항체를 구강을 통해 섭취하는 것은 안전하다고 생각된다. 그러므로 식품과 사료에 계란성분을 사용할 수 있으므로 전란을 IgY 항체와 혼합하여 사용하면 질병을 막는 수동면역시 전란이 IgY 항체 활성을 유지시킬 수 있을 것으로 기대되나, 펩신 소화 2시간 후에 난백을 섞은 그룹에서 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체를 61% 정도로 활력을 유지시킨 것(Fig. 3)에 비해 무지개송어의 위 추출액으로 2시간 동안 소화시킨 후에는 14% 밖에 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체 활력을 유지시키지 못한 점(Fig. 10)을 볼 때 *in vitro* 소화 실험에서도 펩신 소화와 위액 추출물 소화와는 차이가 나는 것으로 생각되므로 수동면역요법을 위한 임상 적용을 하기 위해서는 전란이 IgY 항체 활성을 유지시키는데 관여하는지에 대한 *in vivo* 실험을 통한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

*In vitro* 소화시 계란성분이 anti-*Y. ruckeri* IgY 항체 활성을 안정화시키는데 어떻게 관여하는지를 SDS-PAGE와 ELISA로 조사한 결과는 다음과 같다.

Anti-*Y. ruckeri* IgY 항체와 난황 및 난백으로 혼합 후 펩신으로 소화시킨 경우 2시간 후