J. Fd Hyg. Safety 18(2), 61–66 (2003)

*Vibrio parahaemolyticus*에 대한 Immunoglobulin yolk (IgY)의 생산과 특이성

심원보* · 김혜정* · 박선자** · 강동훈*** · 강진순**** · 정덕화*†
*경상대학교 식품공학과, **경상대학교 농업생명과학원
***경남 보건환경 연구원, ****진주국제대학 식품과학부 식품영양학과

Production and Specificity of Imunoglobulin yolk (IgY) on *Vibrio parahaemolyticus*

Won-Bo Shim*, Hye-Jung Kim*, Seon Ja Park, Dong Hoon Kang***, Jin-Soon Kang****, and Duck-Hwa Chung*†**
*Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Gyeongnam 660-701, Korea
**Institute of agriculture & life sciences, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea
***Gyeongsangnam-do Provincial Government Public Health & Environmental Research Institute, Sarim-dong, Changwon, Korea
****Department of Food and Nutrition, Jinju International University, Jinju, Gyeongnam 660-759, Korea

ABSTRACT – This study was conducted to produce the egg yolk immunoglobulin (IgY) on *Vibrio parahaemolyticus* from immunized hen with lipopolysaccharide (LPS). *Vibrio parahaemolyticus* is considered as a potentially pathogenic bacteria, the causative agents of the gastroenteritis. According as the LPS antigens were injected into laying hens in order to produce antibodies against *Vibrio parahaemolyticus* in egg yolk. After chickens were immunized four times in 2 weeks interval and three times booster in 2 weeks interval, the profile of antibody production was examined by ELISA. The production of antibody in egg yolk was started in 1 week after the first immunization, reached peak in 7 weeks and maintained until 13 weeks later. The antibody titre in serum showed similar tendency as IgY. No significant difference in antibody titre when the titre compared to water diluted IgY and commercial IgY kit. Purified IgY reacted with only Vibrio parahaemolyticus, but other *Vibrio species* and food-borne pathogenic bacteria. In conclusion, we showed that it is possible to obtain a high antibody titre in chicken with quite low amounts of LPS antigen. These results suggested that egg yolk antibodies could be a good source for production of specific antibodies to pathogenic bacteria inducing epidemic gastroenteritis.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, LPS (lipopolysaccharide), IgY, ELISA

*Vibrio parahaemolyticus*는 1950년 일본에서 처음 분리되었으며, 장염 비브리오 식중독을 일으키는 원인균이다. 장염 비브리오균은 해수에서 서식하는 세균으로 2~5% 농도의 식염에서도 잘 자란다. 장염 비브리오 식중독의 주원인은 불충분하게 가열되었거나 익히지 않은 해산물, 적절하게 조리된 후에 오염된 해산물의 섭취로 인한 것으로, 그 중에서도 특히 게(crab), 굴(oyster), 새우(shrimp)와 바다가재(lobster) 등이 주요 식품군에 속한다. 해산물을 날것으로 즐겨 먹는 일본, 대만 등에서는 이것이 유행성 위장염(epidemic gastroenteritis)의 주요 원인 균이 된다.[1] 병원성 비브리오균은 우리 나라 연안에서도 해수 및 어패류에서 빈번하게 검출되고 있고, 매년 여름철에는 이러한 세균에 의한 식중독 사고가 발생하여 식품 위생상 심각한 문제로 되고 있다.[2]

따라서, 이러한 문제에 대한 새로운 방안으로 난황항체를 이용한 수동면역을 통한 예방법에 관심이 집중되고 있다.[3] 난황 항체는 어미닭이 획득한 면역항체가 난황 중에 이행, 축적된 것으로, 분자량이 적은 전형적인 혈청 유래 항체로 조류, 파충류, 양서류 등에서 발견되며, 포유류의 IgG와 유사하나 물리화학적 성상에 차이가 있으므로 immunoglobulin yolk(IgY)라고 부른다.[4]

한 마리의 암탉으로부터 획득할 수 있는 IgY는 매달 1500 mg 정도이며 이 중 특이 항체는 2~10% 정도이며, 이것은 매달 200 mg의 양을 얻을 수 있는 IgG의 특이 항체 5%의 보유량에 비하면 더 나은 효율을 기대할 수 있을 것으로 판단된다.[5]

IgG는 대부분 혈장이나 초유에서 분리할 수 있는데, 난황

†Author to whom correspondence should be addressed.

을 이용하여 IgG를 대체할 수 있는 IgY를 분리함으로써 대량확보나 원료수급이 더욱 용이하게 되었으며, 이러한 IgY의 분리정제에 대한 많은 연구들이 최근에 이루어지고 있다.[6] 이렇게 분리가 쉽고 항혈청보다는 값싼 비용으로도 대량 확보가 가능한 IgY는, 항원과 특이적인 반응을 일으키는 특징 때문에 순수한 연구분야(research), 진단분야(diagnostics), 항생제 대용(antibiotics-alternative therapy) 등의 분야에서 폭넓게 이용되고 있다. IgY는 γ-livetin이라고도 부르며 분자량 64 KDa인 heavy chain과 분자량 28 KDa의 light chain으로 이루어져 있고 IgG 보다도 등전점이 산성에 가까우며 닭의 혈액에서 분리한 IgG와 같은 전기영동 경향을 보이는 것으로 보고되고 있다. 계란의 난황은 이외에도 α-livetin, β-livetin이라는 수용성 단백질과 인지질 성분으로 구성되어있다. 특히 항원으로서 LPS는 외막단백질(outer membrane protein)과 더불어 감염이 진행되는 동안 숙주와 Vibrio의 상호작용에 중요한 역할을 한다고 알려져 있기 때문에[7] 여러 가지 형태의 항원으로 면역 유도를 하여 생성된 병원균의 증식을 억제시켜 다양한 질병의 치료제로 이용할 수 있는 가능성을 보고하고 있으며, 항원과의 특이적인 반응을 일으키는 특징 때문에 항생제 대용치료제로서의 이용가능성에 큰 관심을 끌고 있다. 그러므로 본 연구에서는 항체의 효율적 이용방안을 모색하기 위하여 *V. parahaemolyticus*의 LPS층을 분리하여 이것을 항원으로 하여 암탉에 면역시킨 후 항비브리오 난황을 생산하고 항체 역가의 변화와 특이성을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

LPS 항원제조

항원 준비를 위하여 사용된 균주는 생명공학연구소 유전자센터에서 분양받은 Vibrio parahaemolyticus KCTC 2729였으며, 3% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth(TSB) 배지를 사용, 37°C에서 24시간 동안 진탕 배양하였다. *V. parahaemolyticus*의 LPS층은 Westphal과 Jann[8]의 phenol-hot water extraction method에 의하여 진탕 배양액을 2,500 rpm에서 원심분리(30 min, 4°C)후 응집물을 수집하여 0.85% 생리식염수 10 m*l*로 부유액을 만들었다. 이 부유액을 2,500 rpm에서 원심 분리하여 생성된 응집물에 75°C hot water 10 ml을 넣어서 75°C 수조에서 5분간 정치시켰다. 다음 단계로 75°C hot phenol 10 m*l*을 넣어 다시 75°C 수조에서 15분간 정치시켰다. 이와 같은 과정을 한 번 더 반복 후 water 층을 회수하여 3차 증류수에서 3일간 투석시킨 다음 polyethylene glycol(PEG)를 이용하여 농축 후 동결 건조시켜 면역을 위한 항원으로 사용하였다.

면역

분리한 LPS 항원(10 mg/mL)을 Larsson *et al.*(1998)[9]의 방법을 다소 변형하여 Freund's complete adjuvant(FCA)와 1:1로 유화(emulsified)시킨 후 1 m*l*을 19주령 된 산란용 암탉(Hylain Variet) 네마리를 실험용으로 구입하여 두 마리는 대조군으로 면역 일정에 맞추어 항원 없이 생리식염수 만 주사하였고, 나머지 두 마리를 실험군으로 하여, 양쪽 대퇴부위에 근육주사 방법으로 각각 0.5 m*l*씩 1차 면역을 하였다. 이후에 실시한 2, 3차 면역은 Freund's incomplete adjuvant (FIA)를 항원과 1:1로 유화(emulsified)시켜 동일한 방법에 의해 실시하였고, 4차 면역은 항원만 두 배 농도로 주사하였다. 추가면역(booster)은 마지막 정규 면역 후 2주 간격으로 6주간 실시하였다. 또한 1차 면역 후 체중과 식이 소비량을 매일 측정하였다.

계란 항체 정제

면역기간(12주) 동안 생산된 계란은 매일 수집하였고, Akita와 Nakai(1992)의 water-dilution[10]법에 의한 방법으로 anti-LPS IgY를 분리정제 하였다. 즉, 계란의 난황을 난백으로부터 분리하여 증류수로 세척하고 3 mM HCl로 10배 희석한 후, 10% acetic acid를 사용하여 pH 5로 조정하였다. Cold chamber에 6시간 이상 방치 후 10,000×g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상등액에 ammonium sulfate를 60%로 첨가하여 15분간 교반한 다음 다시 10,000×g에서 15분간 원심 분리하였다. 상층액은 버리고 침전물에 60% ammonium sulfate 용액을 50 m*l* 넣어 10,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 phosphate-buffered saline(PBS) 10 m*l*에 침전물을 현탁하여 사용하였다. 또한 본 실험에서 시행한 IgY 정제 방법의 평가를 위해 EGGstract™ IgY purification system kit(Promega, USA)로 IgY를 추출하여, water-dilution법으로 정제한 IgY와 그 정제 정도를 비교 실험하였다.

ELISA에 의한 혈청항체와 난황항체의 역가 측정

*V. parahaemolyticus*에 대한 항혈청과 IgY의 역가를 조사하기 위하여 Larsson *et al.*(1998)[9]의 방법으로 면역시킨 암탉의 날개 정맥에서 항혈청을 채취한 다음, 손동화(1998)[11]의 방법을 변형하여 indirect competitive ELISA법으로항체 역가를 측정하였다. 즉, *V. parahaemolyticus*의 formalin killed cell(FKC)을 carbonate buffer에 10^8 cell/100 μ*l* 농도로 희석하여 coating한 다음 4°C에서 하룻밤 동안 정치시켰고, PBST로 3회 세척 후 PBS 100 m*l*에 녹인 0.5% bovine serum albumin(BSA) 200 μ*l*를 넣어 4°C에서 하룻밤 동안 blocking 하였다. Phosphate Buffer Saline Tween

20(PBST)로 4회 세척하고 각 well에 역가가 가장 안정된 농도의 1,000배 희석된 항혈청 또는 IgY를 100 μl씩 넣어 37℃에서 1시간 반응시킨 후 PBST로 5회 세척하였다. Phosphate Buffer Saline(PBS)로 10,000배 희석된 peroxidase-conjugated affinity pure rabbit anti-chicken IgY를 100 μl씩 넣어 37°C에서 1시간 반응시킨 후 기질용액 [ABTS; 2,2-azino-bis(3-ethylbenz-thiazolin)sulfonic acid] 100 μl를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 반응정지용액으로 반응을 중지시킨 후 ELISA Reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

교차반응성 측정

정제된 IgY의 *V. parahaemolyticus*와 다른 *Vibrio* 속들과의 교차반응성과 *V. parahaemolyticus*와 다른 식중독성 세균들(*Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *E-coli*)과의 교차반응성을 상기와 동일한 방법의 ELISA 실험방법으로 조사하였다. FKC를 carbonate buffer 10^8 cell/100 μl 농도로 coating한 microtitre plate를 4°C, overnight 반응시켰다. 반응시킨 microtitre plate를 PBST로 3회 세척 후 *Vibrio* 속과 다른 식중독 균을 200배 희석된 계란항체에 37°C에서 1시간 경쟁반응을 시킨 후 세척하였다. 이어서 1:10,000배 희석된 peroxidase-conjugated affinity pure rabbit anti-chicken IgY로 37°C로 1시간 반응 시킨 후 기질로서 ABTS를 첨가한 후 30분 경과한 다음 반응정지 용액을 첨가하여 ELISA Reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Electrophoresis

단백질의 농도결정은 Fryer *et al.*(1986)[12]의 방법을 이용하였으며, SDS-PAGE는 Laemmli[13]의 방법에 따라서 5% stacking gel과 12% separating gel(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)을 사용하였으며, Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하여 분리된 band를 확인하였다.

결과 및 고찰

ELISA에 의한 혈청 항체의 역가 측정

*V. parahaemolyticus*의 LPS 층을 항원으로 사용하여 산란용 암탉에 1차 면역 후 1주 간격으로, 7일(1주), 21일(3주), 35일(5주), 49일(7주), 63일(9주), 77일(11주), 91일(13주)의 혈액을 채취, 혈청을 분리하여 10,000배 희석시킨 항혈청에 대한 역가를 indirect competitive ELISA로 측정하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 1주째부터 *V. parahaemolyticus*에 대한 항체가 생성되기 시작하여 3주 후부터 높은 역가를 가진 항체가 생성되었으며, 5주째 항체역가는 최고에 달하고 그 이후는 약간 감소하거나 비슷한 결과를 보였다. 이때 2

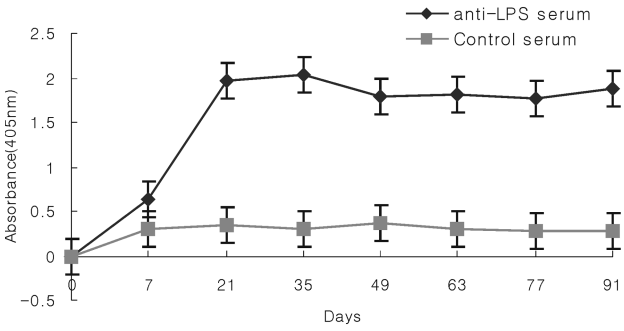

Fig. 1. Antisera titration of LPS immunized hen (Antisera was diluted as 10,000×).

회 반복 측정에 의한 항체의 평균 흡광도는 2.023이었으며 이것은 같은 시기의 항원을 면역시키지 않은 대조구의 0.302와 비교하여 1.721(S.D. 0.053)의 현저한 차이를 보여주고 있다. 노 등(1999)[14]은 17주령과 30주령 닭에서 만들어진 Streptococcus mutans-specific IgY의 경우 2주 간격으로 5회 면역을 하였을 때 specific IgY 생성효과가 월등히 좋았으며 산란률은 30주령의 닭이 훨씬 높은 것으로 보고하였다. 그러므로, 조금 더 성숙된 닭에 면역을 하였을 경우 stress에 더 잘 견디며, 산란률의 증가로 더 많은 항체를 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 본 실험에 사용된 닭은 19주령이었으며, 또한 2주 간격으로 4회 정규 면역과 56일(8주), 70일(10주), 84일(12주)째의 3회 추가 면역을 각각 실시하였지만 실제 보인 역가는 3주째의 역가보다 낮게 나타났다. 특히 역가가 나타난 1주째의 경우 시기적으로 아직 2차 면역이 시행되지 않은 시점이었으므로 본 실험에서 정제한 LPS가 항원으로서의 역할이 뚜렷하였음을 확인할 수 있었다.

계란항체의 분리정제

면역시킨 산란계의 난황은 특이항체를 포함하고 있어서 직접 재료로 사용할 수도 있으나 항체의 항원에 대한 작용을 방해할 수 있는 다양한 물질을 제거하고 난 후에 사용하는 것이 특이성이 더 높다. 따라서 효과적인 계란 항체 분리법으로 보고되고 있는 Akita and Nakai(1993)[15]의 방법을 적용하여 anti-LPS IgY를 분리 정제한 다음 SDS-PAGE로 정제여부를 확인하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 64 KDa의 heavy chain 과 28 KDa의 light chain으로 구성된 IgY를 확인할 수 있었고 이는 IgY를 γ-livertin이라 부른 Shimazi(1988)[16]의 결과와도 일치하였다.

IgY의 수용성 단백질을 분리하는 과정에서 자연 침전보다는 원심분리에 의한 방법이 회수율을 10% 증가시키며 효율적이다. 또한 이때 원심분리단계에서 χ-carrageenan 같은 첨가물을 사용하면 인지질이나 지단백 제거에 효과적이다.[17]

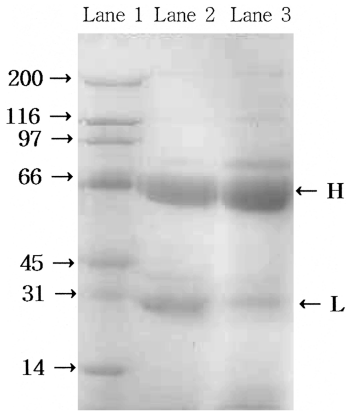

Fig. 2. SDS-PAGE patterns of purified IgY from egg yolk. Lane 1: Standard protein (molecular masses are in kilodaltons), Lane 2: Normal IgY before immunization, Lane 3: IgY after LPS immunization. H: heavy chain, L: light chain).

또한 Stalberg *et al.*(2001)[18]는 chicken antibody의 분리에 있어 난황 내에 많이 존재하는 지질의 제거가 가장 큰 문제이기 때문에 triton X-100과 phosphate를 사용하여 지질은 detergent가 풍부한 상층에 분리되고 IgY는 phosphate가 풍부한 아래층에 분리되게 만들어 IgY의 회수율이 97%에서 총 지질 함량은 25% 이하가 되도록 최적 조건을 만들 수 있었다고 보고 하였다. 그러나, 실제로 water-dilution 법이 IgY의 전처리에 더 빠르고 효율적이라는 보고[15]에 근거하여 본 연구의 IgY 전처리 방법 또한 유효하였다고 판단된다.

ELISA에 의한 IgY의 역가 측정

혈청에서의 항체생성을 확인 후 같은 주의 암탉으로부터 얻은 계란의 난황으로부터 앞서의 방법과 같이 정제된 IgY를 1,000배로 희석시킨 다음 anti-LPS IgY에 대한 역가를 ELISA법으로 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 난황으로부터 정제된 IgY는 암탉 혈청이 보여주는 역가와는 다소 늦게 항체가 생성되고, 그 역가도 혈청보다는 낮게 나타났다. 그러나 IgY 항체는 혈청 항체와 마찬가지로 면역후 1주일째부터 생성되기 시작하였으나 면역에 따른 스트레스 때문인지 암탉이 계란을 생산하지 않아 할 수 없이 계란이 생산된 7주째의 IgY로부터 역가를 측정하게 되었다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 7주째의 anti-LPS IgY의 ELISA에서 나타난 흡광도가 2.217로 높게 측정되었으며, 그 후 13주까지 생산된 IgY와 비교하여 어떤 경우도 7주째의 IgY 반응결과 보다는 낮게 나타났다. 그러나 면역 후 한동안 암탉이 계란을 생산하지 않았는데, 만약 면역에 대한 스트레스 없이 계란을 계속 생산하게 되었더라면 2주부터 6주까지의 IgY 항체 역가도 항혈청과 비교하여 동일하게 상승하였을것으로 추정할 수 있다. 따라서 적어도 25-30 주령 정도 되는 암탉을 면역시킨다면 스트레스에 견디는 능력이 커서 계란 생산이 정상적으로 진행되어 지속적인 IgY 생산이 이루어질 것으로 판단된다.[14] 결과적으로 7주째부터 다시 계란 생산이 시작되었으며 이 때 anti-LPS IgY의 역가는 같은 시기의 혈청 항체역가인 1.794보다 상당히 높았으며 대조군의 IgY가 7주째에 보인 ELISA 결과인 0.354와 비교하여 1.863(S.D. 0.062)의 큰 차이를 나타내고 있다.

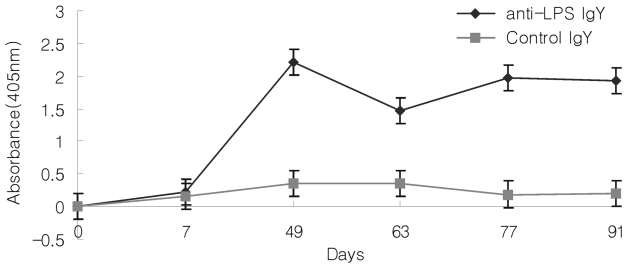

Fig. 3. Anti-LPS IgY titration of LPS immunized hen (IgY was diluted as 1,000×).

이때 대조구의 경우 LPS 항원을 면역시키지 않았지만 ELISA 결과가 0.354로 나타난 것은 IgY 속에 함유된 단백질을 포함한 여러 가지 IgY 구성성분이 matrix effect로 나타났기 때문으로 생각된다. Lee 등(2000)[19]은 Yersinia ruckeri에 대한 무지개송어(rainbow trout)의 수동 면역원으로서 IgY의 효과에 대한 연구에서 1차 면역 후 30~40일 사이에 면역 반응이 최고에 달하였으며, 이것은 whole cell 항원에 대한 항체가 이며 이와 비교하여, purified LPS 로 면역시킨 닭에서는 whole cell 항원에 비하여 저조한 면역반응을 나타내었다고 하였다. 또한 신 등(2000)[20]은 난황에서의 항체 생성은 1차 면역 후 2주부터 나타나기 시작하며 6~8주에 최고 치에 도달하고 이 역가는 12주까지 지속되었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 purified LPS 항원에 의한 면역으로 1차 면역 후 1주부터 이미 항체가 생성되기 시작하였으며, 7주에 최고치에 도달하였고, 이 항체가는 13주에도(91일) 떨어지지 않았으므로 계속 수주 이상 계란 IgY 중에 *V. parahaemolyticus*에 대한 항체 생산이 지속될 것으로 보인다. Akita와 Nakai(1992)[10]는 IgY를 정제하는 실험에서 pH에 따른 IgY와 지질함량을 비교 분석한 결과 pH 5.0과 5.2 사이에서 IgY의 생성량이 최대였으며, pH를 낮추는 것은 IgY의 생성량을 증가시킬 뿐 아니라 방해 물질인 지질의 양을 감소시키는 효과를 가지며, salt precipitation의 농도는 60%로 하였을 때 비특이 단백질의 발현이 줄었다고 보고하였다. 이에 따라 본 연구에서 IgY 정제를 위한 pH 5.0과 60% salt precipitation이 유효하다고 판단되었으며, 실제로 SDS-PAGE에 의한 단백질 분석에서도 비특이 단백

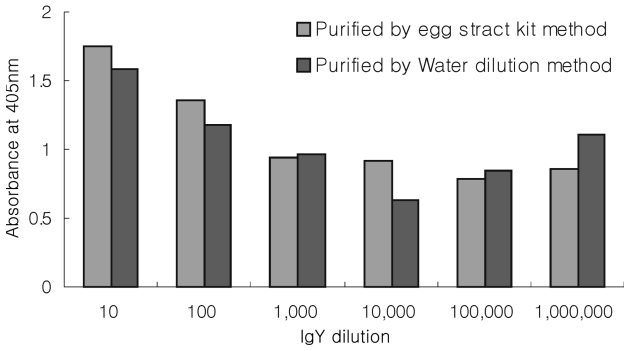

Fig. 4. Comparison of EGGstract™ IgY purification system kit and water dilution method for the extraction of IgY.

질이 거의 없음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 한편, 본 실험에서 사용된 IgY 정제법의 정제도에 대해 검증을 하기 위해 9주에 생산되어 같은 항체역가를 가진 동일한 난황을 재료로 하여 시판되는 EGGstract™ IgY purification system kit(Promega, USA)를 사용하여 정제한 IgY와 본 실험의 water-dilution 법에 의해 정제된 IgY의 역가를 비교 측정한 결과는 Fig. 4와 같았다. 즉, Fig. 4에서 나타난 바와 같이 희석 배수가 낮을 때는 EGGstract™ IgY purification system kit에 의한 역가가 다소 높은 반면, 10^5 이상의 희석 배수에서는 오히려 water-dilution 법에 의해 정제된 IgY의 역가가 높았으며, 전체적으로 두 방법에 의해 정제된 IgY의 역가에 큰 차이가 없음이 확인되었으므로 water-dilution 법에 의한 정제가 빠르고 경제적인 방법임을 알 수 있었다.

교차반응성

LPS층 면역에 의해 생성된 계란항체에 대해 *V. parahaemolyticus*와 다른 *Vibrio* 속 및 *V. parahaemolyticus*와 다른 식중독 균인 *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus* 등에 대한 특이성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 anti-LPS IgY는 다소 민감도가 떨어지긴 하였지

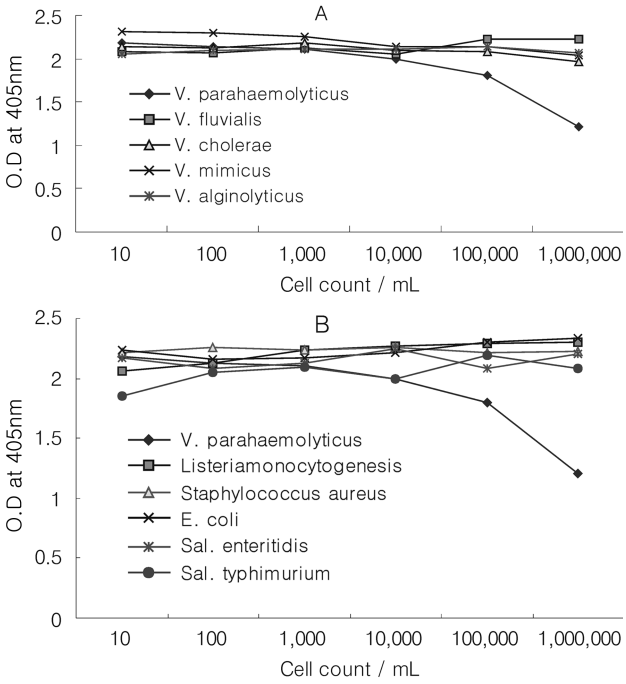

Fig. 5. Cross-reactivity of anti LPS-IgY on *V. parahaemolyticus* and other Vibrios (A), *V. parahaemolyticus* and non-*Vibrios* (B).

만 *V. parahaemolyticus*와 10,000 cell/ml에서부터 경쟁반응을 보였으며, 다른 *Vibrio* 속들과는 교차반응을 나타내지 않았다. 또한 *Vibrio*외 *Listeria*, *Staphylococcus*, *E-coli* 및 *Salmonella* 속들과의 교차반응을 실험한 결과 anti-LPS IgY가 *V. parahaemolyticus*와 선택적으로 반응하는 항체가가 있음이 나타났고, 특히 10^4 cell/ml 농도 부터는 더욱 뚜렷한 변별력을 보였다. 따라서 분리 정제된 anti-LPS IgY를 *V. parahaemolyticus*의 검색을 위한 효소면역분석법의 확립에 활용하거나 *V. parahaemolyticus*의 증식을 억제시켜 *Vibrio* 식중독예방을 위한 항생제 대용물질로서의 이용 가능성을 생각할 수 있다.

국문요약

본 연구는, *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 면역 글로블린 Y(IgY)를 생산하기 위하여 시행되었다. *Vibrio parahaemolyticus*는 중요한 병원성 균이며, 위장염을 유발시키는 원인 균이다. 따라서, 난황에서 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 항체를 생산하기 위하여 항원 LPS(lipopolysaccharide)를 암탉에 주사하였다. 면역은 2주 간격으로 4차까지 실시하였으며, 추가면역으로 2주 간격으로 3차 까지 실시한 후 ELISA로 그 항체 역가를 측정하였다. 난황에서의 항체생성은 1차 면역 후 1주일부터 나타나기 시작하였으며, 7주에 최고 역가에 도달하였고, 이러한 역가는 13주 이후까지 지속되는 것으로 나타났다. 한편 혈청에서의 항체 역가도 난황에서의 경향과 유사하였다. 정제시킨 IgY를 본 연구의 water-dilution 방법과 상업용 IgY 분리 kit로 그 정제 정도를 비교해본 결과 큰 차이를 나

타내지 않았으며, *Vibrio parahaemolyticus*외의 다른 *Vibrio* 속 및 세균들과의 교차반응성 조사에서 특별한 교차반응이 없었다. 본 연구에 나타난 결과로, 아주 적은 양의 LPS 항원으로 역가가 높은 항체의 생산이 가능하였으며, 이러한 결과들로 보아 난황은 유행성 위장염을 유발하는 병원성 균의 특이 항체 개발을 위한 좋은 공급원이 될 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Chiou, A., Chen, and Chen, S.K.: Foodborne illness in Taiwan, 1981-1989. *Food Aust.*, **43**, 70-71 (1990).
2. Yang, H.C., Hong, S.S., Kim, K.H., Choi, S.H. and Chung, H.J.: Distribution of Vibrio vulnificus in Chonnam coastal area, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 70-74(1999).
3. Weltzin R., Monath T.P.: Intranasal antibody prophylaxis for protection against viral disease. *Clin. Microb. Rev.*, **12**(3), 383-393 (1999).
4. Hsu E., Flajnik M.F., Pasquier L.D.: A third immunoglobulin class in amphibians. *J. Immunol.*, **135**(3), 1998-2004 (1985).
5. Schade, R., Burger, W. Schoneberg, T., et al.: Avian egg yolk antibodies. The egg -laying capacity of hens following immunization with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *Altex Alternative Zu Tierexp.*, **11**, 75-84 (1994).
6. Hansen, P., J.A. Scoble, B. Hanson and N.J. Hoogenraad: Isolation and purification of immunoglobins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J. Immunol. Methods*, **215**, 1-7 (1998).
7. Tetsuro Koga, Tomio Kawata: Isolation and Characterization of Outer Membrane from *Vibrio parahaemolyticus*. *J. General Microbiology*, **129**, 3185-3196 (1983).
8. Westphal, O., Jann, K.: Bacterial lipopolysaccharides. *Methods Carbohydr. Chem.*, **5**, 83-91 (1965).
9. Larsson, A.: David Carlander and Martin Wilhelmsson: Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. *Food and Agricultural Immunology*, **10**, 29-36 (1998).
10. Akita, E. M. and Nakai, S.: Immunoglobulin from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Sci.*, **57**, 629-634 (1992).
11. 손동화, 노정해, 김영붕, 한찬규, 성기승, 이남형: 난황으로부터 항 충치 항체의 분리 및 특성. *한국식품과학회지*. **30**, 1029-1030 (1998).
12. Fryer, H.J., Davis, G.E., Manthorpe M., Varon, S.: Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. *Anal. Biochem.*, **153**(2), 262-266 (1986).
13. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
14. 노정해, 김영봉, 한찬규, 이남형, 성기승, 손동화: 산란계의 연령과 면역주기에 따른 난황중의 *Streptococcus mutans* 특이 항체 함량. *Kor. J. Anim. Sci.*, **41**(5), 563-574 (1999).
15. Akita, E. M., Nakai, S.: Comparison of four purification methods for the production of immunoglobins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Methods*, **160**, 207-214 (1993).
16. Shimizu M., Fitzsimmons R. C. and Nakai S.: Anti-E. coli immunoglobulin Y isolated form egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.* **53**, 1360-1366 (1988).
17. 김인호, 이용택, 이청희, 정봉현: 계란 면역 단백질(IgY)의 정제 연구. *한국생명공학회지*, **14**(6), 677-681 (1999).
18. Stalberg J. and Larsson A.: Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. *Ups J. Med. Sci.*, **106**(2), 99-110 (2001).
19. Seung Bae Lee, Yoshinori Mine: Effects of Hen Egg Yolk Immunoglobulin in Passive Protection of Rainbow Trout against Yersinia ruckeri. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 110-115 (2000).
20. 신나리, 김종만, 유한상: 난황항체를 이용한 돼지 호흡기 질병 방제에 관한 연구 I. *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* 및 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 의 주요 면역원 분석 및 IgY 생산. *대한수의학회지*. **40**(3), 551-561 (2000).
21. Tsung C. Chang, Chi H. Chen, and Hui C. Chen: Development of Latex Agglutination Test for the Rapid identification of Vibrio parahaemolyticus. *J. Food Protection*, **57**(1), 31-36 (1994).
22. T. Honda, Y. Ni, M. Yoh, and T. Miwatani: Production of monoclonal antibodies against thermostable direct hemolysin of Vibrio parahaemolyticus and application of the antibodies for enzyme-linked immunosorbent assay. *Med. Microbiol. Immunol.*, **178**, 245-253 (1989).
23. Shahjahan Kabir: Composition and Immunochemical proterties of the Cell Surface Proteins of *Vibrio Cholerae*. *J. General Microbiology*, **132**, 2235-2242(1986).
24. Antonio Verdoliva, Giancarlo Basile, Giorgio Fassina: Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. *Journal of Chromatography*, **749**, 233-242 (2000).